



Des sPLA2 de venins de serpents à leurs homologues de Mammifères: Rôles de ces enzymes dans la fécondation

Jessica Escoffier

► To cite this version:

Jessica Escoffier. Des sPLA2 de venins de serpents à leurs homologues de Mammifères: Rôles de ces enzymes dans la fécondation. Physiologie [q-bio.TO]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00441813

HAL Id: tel-00441813

<https://theses.hal.science/tel-00441813>

Submitted on 17 Dec 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTÉ
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant



THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie

*Des sPLA2 de venins de serpents à leurs
homologues de Mammifères:
Rôles de ces enzymes dans la fécondation.*

Présentée et soutenue publiquement
par

Jessica ESCOFFIER

Le 25 novembre 2009

Devant le jury composé de

Président :	Pr. Stéphan NONCHEV
Rapporteurs :	Dr. Valérie CHOUMET Pr. Joël DREVET
Examineurs :	Dr. Gerard LAMBEAU Dr. Christophe ARNOULT

Thèse réalisée à l'institut des neurosciences de Grenoble (GIN)
Au sein de l'équipe 3: Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies
INSERM U 836–Grenoble

Remerciements

Je remercie les membres du jury : Madame **Valérie Choumet** et monsieur **Joel Drevet** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que messieurs **Gerard Lambeau** et **Stéphan Nonchev** d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier Christophe pour m'avoir fait confiance durant ces 4 ans, pour son encadrement riche en apprentissage, pour son soutien, son aide et l'attention qu'il a porté à l'ensemble de mon travail et enfin pour sa patience les jours où je n'étais pas très performante.

Je remercie Michel De Waard pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour ses conseils avisés et sa diplomatie.

Je remercie sincèrement l'ensemble de l'équipe « Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies » et plus particulièrement Michel Ronjat, Fabienne Pirollet et Maud Barbado, pour m'avoir aussi bien accueillie et pour m'avoir aidée et soutenue tout au long de ces 4 années.

Je tiens aussi à remercier sincèrement les étudiants, Hicham qui a toujours le mot pour rire, Narendra avec qui j'ai appris à m'exprimer en anglais, enfin je crois, Cathy qui a toujours des bonnes idées pour s'éclater, Katell et sa bonne humeur bretonne, Julien pour sa gentillesse et son beau phrasé et enfin Norbert qui s'est révélé être un énorme soutien moral.

Je n'oublie pas aussi les étudiants qui sont parti, mais qui m'ont beaucoup aidé Sonia, Paola, Gina, Ryadh, Julien, Emilie et bien sûr Abir.

Merci à tous...

Je n'oublierai pas de remercier également,

Cyril,

Merci pour ton soutien et ta complicité. Merci de partager mon quotidien et de me remonter le moral quand il va mal. Merci de partager mes joies, mes peines. Merci de t'être intéressée à mon travail et d'avoir cherché avec moi des solutions ... En fait, merci pour tout ton amour.

Sabrina, Naima, Sylvie, Aurélie, Djam, Denis, Florian et Hervé

Merci pour votre soutien. Merci de m'avoir remontée le moral lorsque celui-ci n'étaient pas au beau fixe. Merci de partager mes joies, mes peines. Merci de s'être intéressée à mon travail. Merci pour tout.

Maman, Beau papa,

Merci de m'avoir donné le goût et les moyens de faire des études. Merci de m'avoir soutenu durant ma longue formation. Merci de vous être tenus au courant de l'avancée de mes recherches. Merci de votre réconfort. Merci pour tout. Cette réussite est aussi la vôtre.

Mes sœurs : Sandrine, Deborah, Maureen et Leslie et mes beaux frères : Minou, François, Noy, et Yannick

Merci à l'ensemble de ma (nombreuse) famille pour leur soutien mais aussi pour les discussions animées des repas familiaux et pour les questions récurrentes : « Mais quand est-ce que tu auras réellement fini ? », « A quoi servent tes recherches ? » et les « à quand le contraceptif masculin ? »...

Un grand merci à vous tous,

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Les principes, les étapes et les exigences de la fécondation	1
Chapitre 1 : Le spermatozoïde de Mammifère	2
I. La tête du spermatozoïde	2
II. Le flagelle	3
1. La partie motrice principale du flagelle : complexe microtubulaire	3
2. Les dynéines axonémales	4
3. Les fibres denses (ODF)	7
4. La gaine de mitochondries	7
5. La gaine fibreuse de la pièce principale	7
III. Les systèmes de transport ionique du spermatozoïde	9
1. Les ATPase membranaires	10
2. Les échangeurs ioniques	10
3. Les canaux ioniques	11
➤ Les canaux sodiques	11
➤ Les canaux potassiques	11
➤ Les canaux chlorures	12
➤ Les canaux sensibles aux nucléotides cycliques (canaux CNG)	13
4. Diversité des canaux calciques présents au niveau du spermatozoïde	14
➤ Les canaux calciques dépendant du potentiel.	15
➤ Les canaux de type SOC « Store Operated Channels »	17
➤ Les récepteurs canaux.	19
➤ Les canaux calciques du réticulum.	19
Chapitre 2 : La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes	22
I. Modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation	23
1. La membrane plasmique du spermatozoïde avant capacitation	23
2. Le bicarbonate induit des modifications lipidiques de la membrane	26
3. Les lipoprotéines présents au niveau du tractus génital femelle induisent un efflux de cholestérol	27
II. Modifications ioniques lors de la capacitation	29

III. L'hyperactivation flagellaire.	31
1. Mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique symétrique	31
2. Voies de signalisation de régulation de la mobilité spermatique symétrique	32
3. Voie de signalisation AMP _c /PKA	33
4. Voie de signalisation Calmoduline/CamK/Calcineurine dépendante du calcium	34
5. Mécanisme moléculaire de l'hyperactivité flagellaire	35
 Chapitre 3: La réaction acrosomique	 38
I. Liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide	38
II. La réaction acrosomique	42
III. Mécanisme moléculaire de la réaction acrosomique	43
1. Les protéines SNAREs	43
➤ Modèle de fusion membranaire par les protéines SNAREs	47
2. La réaction acrosomique est contrôlée par une signalisation biphasique de calcium	49
3. La réaction acrosomique est également contrôlée par des messagers lipidiques produits par les phospholipases	52
➤ Les phospholipases sont les générateurs des messagers lipidiques spermatiques	53
 Chapitre 4 : Liaison et fusion des spermatozoïdes avec l'ovocyte	 60
I. Pénétration de la zone pellucide	60
II. Liaison et fusion des spermatozoïdes avec la membrane ovocytaire	60
 Problématique	 65
 Méthodologie	 73
II. Fractionnement des venins par chromatographie	75
II. Modèle biologique : la mobilité spermatique	75
 Résultats	 79
I. Découverte de nouveaux outils pharmacologiques à partir de venins d'animaux.	81
1. Introduction	81

Article 1: sPLA2 from snake venom as a source of molecule modulating sperm physiology: Phospholipases of the toxic snakes <i>Oxyuranus scutellanus</i> strongly modulate sperm motility, sperm acrosome reaction and in vitro fertilization	83
2. Discussion	85
II. Évaluation du rôle des sPLA2 de mammifère dans la physiologie spermatique	87
3. Introduction	87
Article 2: Mammalian Group X secreted phospholipase A2 regulates specifically sperm motility	89
Article 3: Group X phospholipase A2 is secreted during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome.	91
4. Discussion	93
➤ Identification d'une nouvelle voie moléculaire de contrôle de la mobilité spermatique (Article 2).	93
➤ mGX est exprimée au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes et relâché durant la réaction acrosomique (article 3).	94
➤ Rôle de mGX dans la physiologie spermatique (article 3).	94
III. Évaluation du rôle fonctionnel et physiologique des canaux Ca_v3.1 et Ca_v3.2 dans une étape physiologie spermatique : La réaction acrosomique	97
5. Introduction	97
Article 4: Expression, Localization and Functions in Acrosome Reaction and Sperm Motility of CaV3.1 and CaV3.2 Channels in Sperm Cells: an evaluation from CaV3.1 and CaV3.2 Deficient Mice	99
6. Discussion	101
➤ Les courants calciques dépendant du voltage de type T des cellules germinales est due seulement à l'activation du canal Ca _v 3.2	101
➤ Le canal Ca _v 3.1 est absent des spermatozoïdes matures	101
➤ Seule la signalisation calcique des spermatozoïdes Cav3.2 ^{-/-} est affectée lors de la réaction acrosomique	102
➤ Les canaux Ca _v 3.2 ne sont pas les seuls canaux calciques impliqués dans la signalisation de la RA	102
Conclusion générale et perspectives	105
Régulation de la physiologie spermatique par les phospholipases A₂ secrétées	107
Implication des canaux calciques de type T dans la régulation de la réaction acrosomique	114
Références Bibliographiques	117

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique des étapes de la fécondation chez la souris	1
Figure 2 : Coupe longitudinale observée au microscope électronique de la tête de spermatozoïde de souris et sa représentation schématique.....	2
Figure 3 : Représentation schématique d'un spermatozoïde de Mammifère	3
Figure 4 : Coupe longitudinale observée au microscope électronique de la jonction entre la pièce intermédiaire et la pièce principale d'un spermatozoïde de souris.....	3
Figure 5 : Structure de l'axonème du flagelle d'un spermatozoïde de mammifère.....	4
Figure 6 : Organisation de la dynéine axonémale..	6
Figure 7 : Représentation schématique de la gaine fibreuse.....	7
Figure 8 : Représentation schématique des voies métaboliques de synthèse de l'ATP du spermatozoïde	9
Figure 9 : Représentation schématique de la distribution des canaux calciques dans le sperme de mammifères	14
Figure 10 : Représentation schématique de la structure des canaux calciques dépendants du voltage.....	15
Figure 11 : Représentation schématique du canal CatSper.	17
Figure 12 : Organisation structurale d'un monomère des TRPCs	18
Figure 13 : Représentation schématique d'un monomère du récepteur à l'IP ₃	20
Figure 14 : Représentation schématique de la structure du récepteur à la ryanodine.....	21

Figure 15 : Formules chimiques de quelques phospholipides communément observés et du cholestérol.....	24
Figure 16 : Formules chimiques de la phosphatidylcholine (PC), choline plasmalogène et de la sphingomyéline (SM).....	24
Figure 17: Membrane plasmique des spermatozoïdes immatures	26
Figure 18 : Modèle des voies signalisations de la modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifère.....	29
Figure 19 : Modifications ioniques lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères.	30
Figure 20 : Photo des trajectoires des têtes de spermatozoïdes de souris établis par un appareil de mobilité spermatique (CASA)	31
Figure 21 : Représentation schématique simplifiée du mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique.	32
Figure 22 : Représentation schématique de la voie de signalisation AMPc/PKA qui régule la mobilité spermatique des mammifères	33
Figure 23 : Représentation schématique de la voie de signalisation Calmoduline/CamK/Calcineurine qui régule la mobilité spermatique des mammifères	34
Figure 24 : Représentation hypothétique du mécanisme de régulation de l'hyperactivité flagellaire induite lors de la capacitation.	35
Figure 25 : La réaction acrosomique	38
Figure 26 : La zone pellucide de l'œuf.....	39

Figure 27 : Représentation schématique des récepteurs spermatiques impliqués dans la liaison avec la Zone pellucide.....	41
Figure 28 : Photos de coupes sagittales de la tête de spermatozoïde de souris en microscopie électronique à transmission représentant les étapes morphologiques de la réaction acrosomique.	43
Figure 29 : Représentation schématique du complexe SNARE présent au niveau des membranes acrosomiques et plasmiques du spermatozoïde.....	47
Figure 30 : Représentation schématique de l'action des acides gras sur la syntaxine I.	47
Figure 31: Représentation du cycle de fonctionnement des protéines SNAREs.....	49
Figure 32 : Représentation schématique de la signalisation calcique biphasique au cours de la réaction acrosomique.	50
Figure 33: Représentation schématique du mécanisme moléculaire de la réaction acrosomique.....	51
Figure 34 : Représentation schématique de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par les phospholipases A ₁ , A ₂ , C et D.	54
Figure 35 : Représentation schématique du contrôle lipidique du mécanisme de la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris	58
Figure 36 : Représentation schématique des protéines impliquées dans la fusion gamétique des mammifère	62
Figure 37 : Analyse automatique du mouvement spermatique par le système CASA.....	75
Figure 38 : Paramètres de mobilité CASA des spermatozoïdes de souris OF1.....	76
Figure 39 : Comparaison des paramètres CASA de mobilité spermatique des spermatozoïdes de souris OF1 capacité et non capacités <i>in vitro</i>	77

Figure 40: Modèle de la régulation de la physiologie spermatique par la phospholipase A ₂ sécrétée mGX.....	107
--	-----

Introduction

Les principes, les étapes et les exigences de la fécondation

Chez les espèces à reproduction sexuée, la formation d'un nouvel individu repose sur la fusion des matériels génétiques haploïdes du gamète mâle, le spermatozoïde, et du gamète femelle, l'ovocyte, au cours d'une étape appelée fécondation. Les gamètes, et plus particulièrement le spermatozoïde, font l'objet de processus de maturation précoces et tardives, indispensables au bon fonctionnement du spermatozoïde.

La fécondation s'effectue en plusieurs étapes individualisées. Après avoir traversé le cumulus oophorus, le spermatozoïde ayant un acrosome intact se fixe de façon spécifique à ZP3, une des trois glycoprotéines de la zone pellucide (ZP) qui entoure l'ovocyte (fixation primaire). Une fois lié, il subit la réaction acrosomiale (RA). La RA correspond à l'exocytose de la vésicule de sécrétion (l'acrosome) située au niveau de la tête du spermatozoïde. Le spermatozoïde se fixe alors plus solidement à la zone pellucide (fixation secondaire) et la pénètre. Une fois l'espace périvitellin atteint, il se lie alors à la membrane plasmique ovocytaire avec laquelle il fusionne. La fusion du spermatozoïde induit l'exocytose des granules corticaux qui modifient la ZP afin de bloquer la polyspermie. L'ovocyte est alors fécondé (Figure 1).

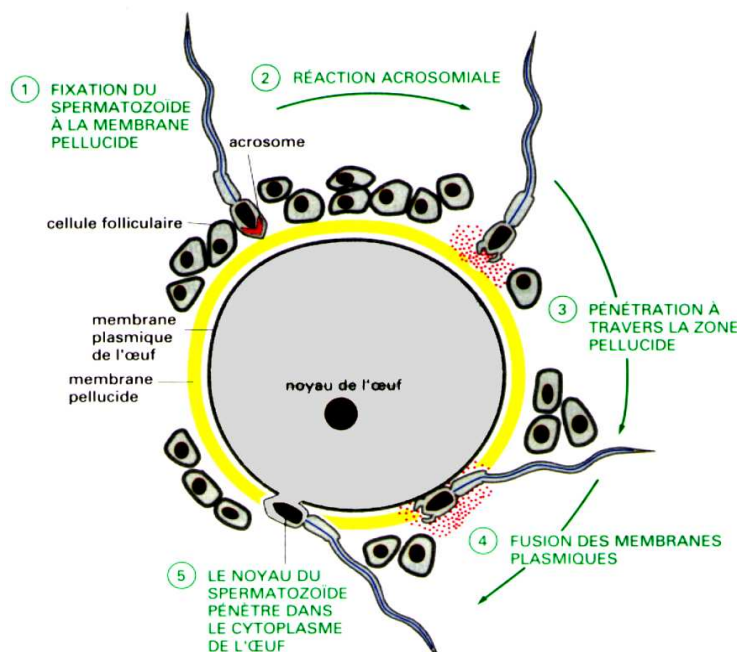


Figure 1 : Représentation schématique des étapes de la fécondation chez la souris. L'ensemble des étapes de la fécondation durent en moyenne 90 min chez la souris.

Pour que la fécondation réussisse, les deux gamètes doivent se rencontrer à un moment et un état de maturité propice. L'ovocyte doit être entouré des cellules folliculaires et bloqué en métaphase de deuxième division méiotique. Le spermatozoïde doit se trouver dans un état compatible, il doit être mobile afin de pouvoir traverser l'oviducte et être capable d'interagir avec la zone pellucide et rentrer dans l'ovocyte.

Chapitre 1 : Le spermatozoïde de Mammifère

Le spermatozoïde est une cellule autonome qui mesure 100 à 150 μm de long. Il est constitué de deux parties distinctes : la tête et le flagelle.

I. La tête du spermatozoïde

La tête du spermatozoïde (8 μm sur 4 μm) contient un noyau haploïde allongé recouvert sur ses deux tiers antérieurs par la vésicule acrosomiale ou acrosome. Le noyau haploïde renferme les chromosomes à l'état de chromatine compacte, condensation nucléaire renforcée par l'association de l'ADN à des protamines.

L'acrosome est un organe intracellulaire dérivé de l'appareil de Golgi. Il contient plusieurs enzymes hydrolytiques et protéolytiques telles que : la β -N-acétylglucosaminidase, la hyaluronidase, la phosphatase acide et l'acrosine qui participent à la rupture des pontages entre ZP1, ZP2 et ZP3, (Suarez 1987; Suarez, Vincenti et al. 1987; Ho and Suarez 2001; Ho, Granish et al. 2002; Turner 2003; Turner 2006; Buffone, Foster et al. 2008)

La tête du spermatozoïde est constituée : d'une membrane plasmique, d'un espace péri-acrosomique, d'une membrane acrosomique externe, d'un contenu acrosomique, d'une membrane interne acrosomique, d'un espace sous acrosomique et d'un noyau haploïde (figure 2).

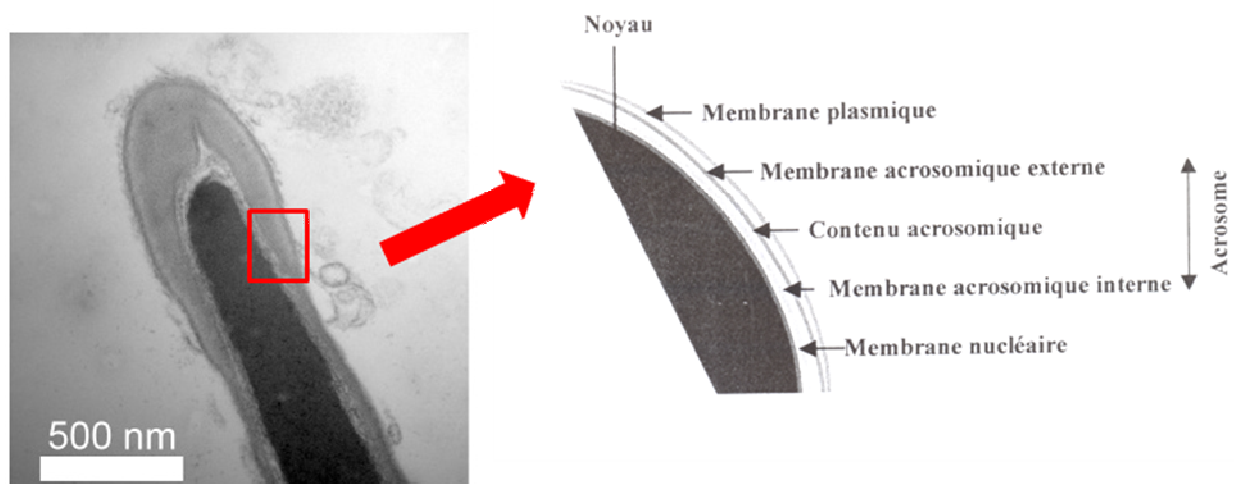


Figure 2 : Coupe longitudinale observée au microscope électronique de la tête de spermatozoïde de souris et sa représentation schématique.

La tête du spermatozoïde est reliée au flagelle par un col court et rétréci. Ce dernier est constitué des centrioles proximaux et distaux, qui sont à l'origine de l'axonème (Figure 3).

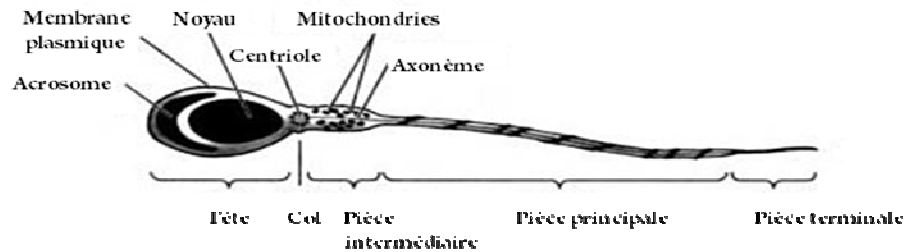


Figure 3 : Représentation schématisque d'un spermatozoïde de Mammifère

II. Le flagelle

Le flagelle est un organe très complexe qui permet au spermatozoïde de se mouvoir. Il est composé d'une pièce intermédiaire, d'une pièce principale cinq fois plus longue que l'ensemble tête-col-pièce intermédiaire et d'une pièce terminale courte (figure 3).

1. La partie motrice principale du flagelle : complexe microtubulaire

La partie motrice principale du flagelle est appelée l'axonème. L'axonème est une structure protéique très complexe, où les microtubules et leurs protéines associées sont organisés en un long cylindre selon le schéma appelé 9 + 2 (Ho and Suarez 2001). L'axonème est un complexe microtubulaire entouré de fibres denses externes (ODF) et de mitochondries (M) au niveau de la pièce intermédiaire, et d'une gaine fibreuse (FS) au niveau de la pièce principale (figure 4).

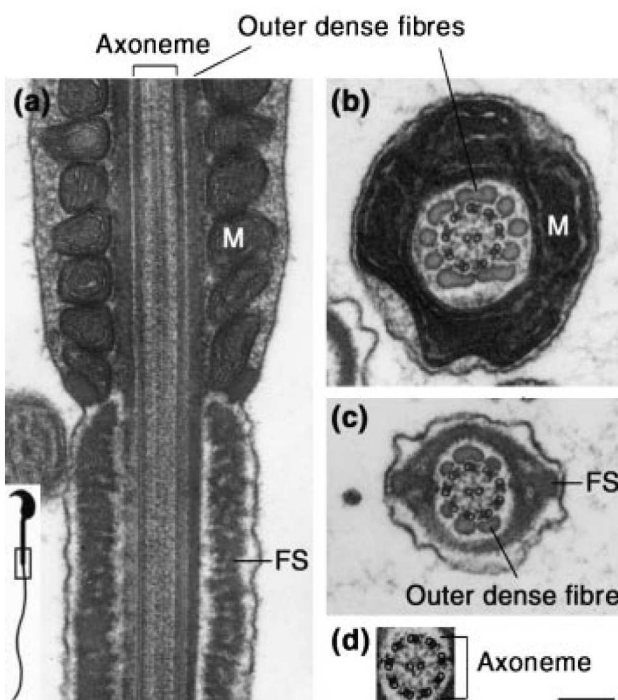


Figure 4: (a) Coupe longitudinale observée au microscope électronique de la jonction entre la pièce intermédiaire et la pièce principale d'un spermatozoïde de souris. L'axonème, partie centrale du flagelle est principalement constitué de microtubules, de dynéine et de plus de 250 protéines associées. Il est entouré de fibres denses externes (ODF) et de mitochondries (M) dans la pièce intermédiaire, et d'une gaine fibreuse (FS) dans la pièce principale. (b),(c) Coupe transversale observée au microscope électronique de la pièce intermédiaire et de la pièce principale, respectivement. (d) Coupe transversale observée au microscope électronique de l'axonème seul, montrant le modèle appelé « 9 + 2 », avec une paire de microtubules centrale entourée d'un cercle de 9 paires de microtubules. La barre d'échelle représente 200 nm (Ho and Suarez 2001).

L'axonème, dont le diamètre mesure environ 0.2 μm , est constitué d'un cercle de 9 doublets microtubulaires et d'une paire centrale composée de deux microtubules simples. Les microtubules de l'axonème sont formés par association d'unités de tubuline α et β , deux molécules très semblables. Ces dernières s'empilent de façon alternée afin de former des protofilaments. Un microtubule est dit « complet » lorsqu'il est constitué de 13 protofilaments. Les 9 doublets microtubulaires de l'axonème sont constitués en avant d'un microtubule A « complet » de 13 protofilaments et en arrière d'un microtubule B « incomplet » de 10 protofilaments (figure 5).

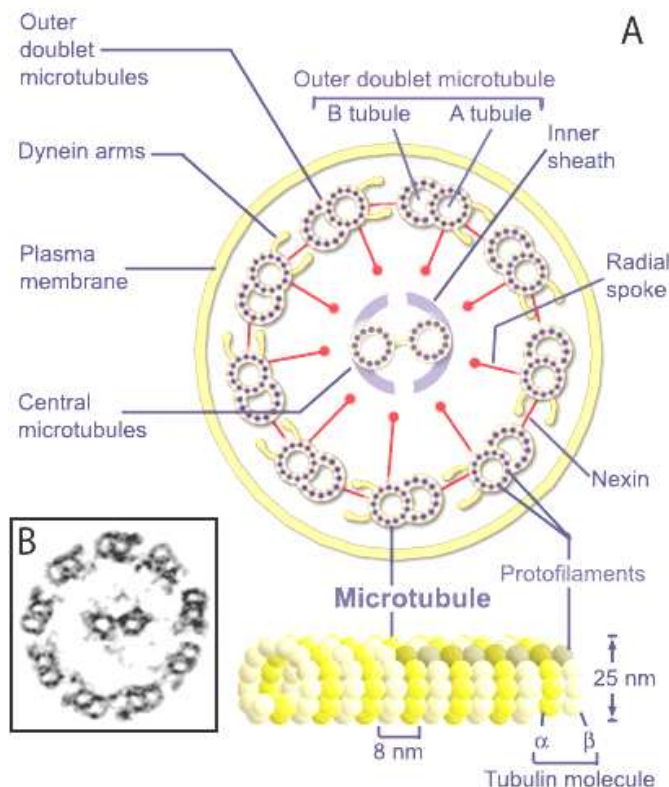


Figure 5 : Structure de l'axonème du flagelle d'un spermatozoïde de mammifère. A) Représentation schématique d'un axonème de spermatozoïde de mammifère. L'axonème est constitué d'un cercle de 9 doublets microtubulaires (A et B) et d'une paire centrale composée de deux microtubules. Les microtubules de l'axonème sont formés par association d'unités de tubuline α et β . les différents doublets sont associés entre eux par des ponts de nexine. Les microtubules A sont reliés à la gaine centrale (Inner sheat) par des fibres rayonnantes (Radiale spoke). Les microtubules A portent les bras de dynéine. B) Photographie de l'axonème d'un spermatozoïde de mammifère par microscopie électronique (Inaba 2007).

Les différents doublets sont associés entre eux par des ponts très élastiques constitués principalement de nexine. Les microtubules A portent par ailleurs des bras de dynéine ATPasique qui permettent de s'accrocher au microtubule B du doublet adjacent. L'interaction cyclique de la dynéine avec le microtubule B génère un phénomène de « glissement » des microtubules entre eux, permettant le mouvement flagellaire (cf page 32).

2. Les dynéines axonémales

Les dynéines sont des ATPases de haut poids moléculaire 1-2 MDa, impliquées dans l'ondulation des cils et flagelles et dans le transport des vésicules le long des microtubules. Les dynéines ont été découvertes il y a 50 ans (Gibbons 1996). Ces enzymes sont composées de plusieurs chaînes lourdes qui portent l'activité ATPasique et qui sont codées par une

famille multigénique très conservée (Cosson 1996; Milisav 1998).

Les dynéines axonémales forment 2 rangées de bras portés par les microtubules A de chaque doublet. On distingue les bras dits « externes » situés du côté de la membrane plasmique et les bras dits « internes » situés du côté des microtubules centraux (figure 5). Ces bras sont espacés tous les 24 nm le long des microtubules A. Les bras externes et internes de dynéine sont des complexes multiprotéiques formés d'une vingtaine de polypeptides. (Cosson 1996; Inaba 2003; Turner 2006).

La structure des bras de dynéines axonémales a été beaucoup étudiée. L'organisme modèle utilisé pour caractériser la structure des bras de dynéine axonémale est une algue unicellulaire biflagellée, le *Chlamydomonas reinhardtii* (Yamamoto, Yanagisawa et al. 2006). Des études chez *Chlamydomonas reinhardtii*, chez l'oursin et le verrat ont permis de caractériser la structure des bras internes de dynéines axonémales. Elles sont composées de deux chaînes lourdes α et β (500 kDa) (trois pour *Chlamydomonas reinhardtii*), de trois à cinq chaînes intermédiaires (120-60 kDa) et de six chaînes légères (30-80 kDa) (huit *Chlamydomonas reinhardtii*). La structure des bras de dynéines internes est plus complexe et moins étudiée, car la purification des bras de dynéines internes est beaucoup plus difficile (Gatti, Nicolle et al. 1994). Les bras de dynéines internes sont composés comme les bras internes de chaînes lourdes (deux à six selon les espèces), de chaînes intermédiaires (trois à cinq) et de chaînes légères (deux à huit). (Figure 6)

La partie C-terminale de chaque chaîne lourde (DHC) est constituée d'une tête globulaire contenant le site ATPase, de deux hélices qui permettent la flexibilité et la mobilité de la dynéine et d'une petite unité globulaire de liaison aux microtubules B. La tête globulaire est constituée de six domaines ATPasiques nommés AAA1-6 (ATPase Associated with cellular Activities). L'équipe de Talahide Kon a pu identifier par l'élaboration d'un mutant du domaine AAA1 (remplacement de la lysine K1975 par la Thréonine) le site ATPasique qui permet de générer la force de glissement des microtubules. En effet, ce site serait localisé au niveau du domaine AAA1 (Kon, Nishiura et al. 2004).

Des expériences de cartographie de sites de phosphorylation de la chaîne lourde α du bras de dynéine externe ont permis d'établir plusieurs sites de phosphorylations. Les sites majeurs de phosphorylations de la dynéine sont situés près du domaine AAA1 et de l'unité globulaire de liaison aux microtubules B (King and Witman 1994). Ces sites de phosphorylation vont permettre la régulation de l'activité ATPasique des dynéines (Dillman and Pfister 1994). Dans chaque espèce, il existe plusieurs gènes codant les différentes DHC : il y en a 12 pour

Chlamydomonas reinhardtii (Milisav 1998), 13 chez l'oursin (Milisav 1998), 12 chez la souris (Vaughan, Mikami et al. 1996) et 13 chez l'homme (Chapelin, Duriez et al. 1997).

Au niveau de la partie N-terminale des chaînes lourdes, on retrouve les chaînes intermédiaires qui permettent d'augmenter l'interaction entre la dynéine et le microtubule A, les chaînes légères et une série de protéines régulatrices de la dyénine.

Les chaînes légères (LC) vont réguler l'activité de la dynéine par des interactions avec protéines régulatrices dépendantes du calcium comme la calmoduline et Tctex2. La calmoduline va interagir avec les chaînes légères de la dynéine au niveau de son domaine LC8. L'identification du domaine d'interaction des chaînes légères avec la calmoduline a été caractérisée (Narisawa, Hecht et al. 2002) par des expériences de co-immupréciptation par l'équipe de Yang (Yang, Diener et al. 2001). Tctex2 lui aussi va interagir avec les chaînes légères de la dynéine, mais au niveau de son domaine LC1, la phosphorylation de Tctex2 par la protéine kinase A spécifique au spermatozoïde (testis-spécifique PKA) va permettre la régulation de l'activité ATPasique des dynéines (Inaba, Kagami et al. 1999).

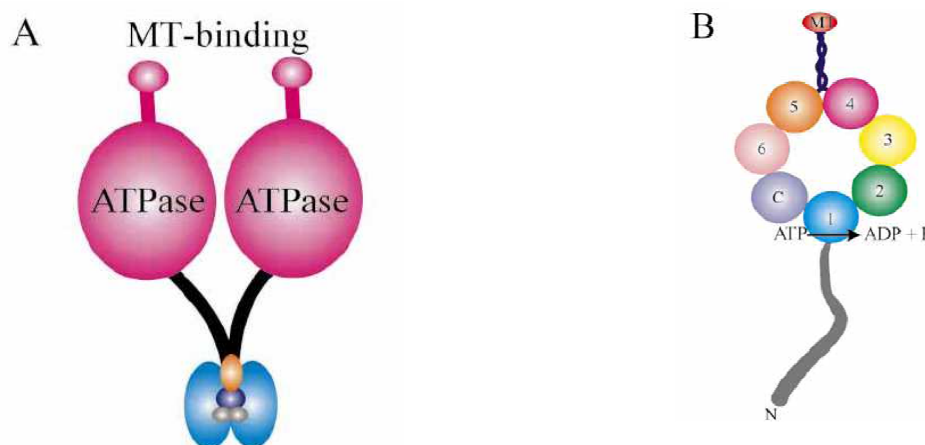


Figure 6 : Organisation de la dynéine axonémale. A) Représentation schématique d'un bras de dynéines axonémale constitué de deux chaînes lourdes. La partie C-terminale de chaque chaîne lourde est constituée d'une tête globulaire contenant les sites ATPasiques, de deux hélices qui permettent la flexibilité et la mobilité de la dynéine et d'une petite unité globulaire de liaison aux microtubules B (MT-binding). La base de la dynéine se compose de la partie N-terminale des chaînes lourdes, des chaînes intermédiaires qui augmentent l'interaction entre la dynéine et le microtubule A, des chaînes légères. Les chaînes légères permettent l'ancrage du bras de dynéine au microtubule A et la régulation de l'activité de la dynéine par des interactions avec des protéines kinase et la calmoduline, et une série de protéines régulatrices de la dynéine. B) Représentation schématique de l'organisation d'une chaîne lourde. La tête globulaire se compose de six domaines AAA (ATPase Associated with cellular Activities), dont le domaine catalytique de l'ATP est le domaine AAA1 (King 2000).

3. Les fibres denses (ODF)

Les fibres denses sont composées de 14 polypeptides, de protéines de filaments intermédiaires, de protéines riches en cystéine ou en prolines. À l'heure actuelle, les fibres denses ont été peu étudiées. Différentes équipes ont émis l'hypothèse (Oko 1988; Shao, Tarnasky et al. 1997) que ces fibres joueraient un rôle de maintien et d'élasticité du spermatozoïde.

4. La gaine de mitochondries

La gaine, générateur énergétique (ATP) du spermatozoïde, est régulièrement disposée en spirale au niveau de la pièce intermédiaire. Les mitochondries spermatiques sont extrêmement différenciées et spécifiques. En effet, elles sont principalement constituées d'isoformes des cellules somatiques. La gaine de mitochondrie va produire, grâce au processus de phosphorylation oxydative, une partie de l'énergie nécessaire à la mobilité spermatique (figure 8). Cependant, l'étude du phénotype d'une souris, dont le gène du cytochrome C (protéine de transfert d'électron indispensable à la phosphorylation oxydative) a été invalidé, a montré que la phosphorylation oxydative n'est pas le seul processus de fabrication d'ATP au niveau du spermatozoïde. En effet, les spermatozoïdes provenant de souris invalidées pour le cytochrome C sont mobiles, présentent un niveau basal d'ATP quasi normal et finalement sont fertiles (Narisawa, Hecht et al. 2002).

5. La gaine fibreuse de la pièce principale

La gaine fibreuse est une structure unique du flagelle des spermatozoïdes. Elle entoure l'axonème et les fibres denses ODF au niveau de la pièce principale. Elle se compose de deux colonnes longitudinales reliées entre elles par des stries de fibres (Circumferential Ribs). Les colonnes longitudinales sont reliées au niveau des doublets microtubules 3 et 8 de l'axonème (Eddy 2007).

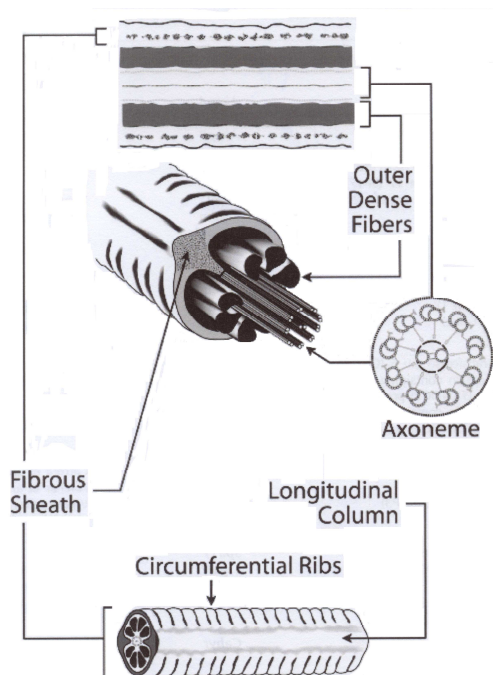


Figure 7 : Représentation schématique de la gaine fibreuse. La gaine fibreuse entoure l'axonème et les fibres denses ODF au niveau de la pièce principale du flagelle du spermatozoïde. Elle se compose de deux colonnes longitudinales reliées entre elles par des stries de fibre (Circumferential Ribs). Les colonnes longitudinales sont reliées au niveau des doublets microtubules 3 et 8 de l'axonème (Eddy 2007).

La gaine fibreuse est constituée de polypeptides, de protéines de filaments intermédiaires (keratine-like) (Eddy, O'Brien et al. 1991), de protéines riches en cystéines ou en prolines et de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation ou métaboliques comme la signalisation des PKA, des Rho, et la glycolyse (Eddy, Toshimori et al. 2003; Eddy 2007).

Près de la moitié des protéines de la gaine fibreuse, isolées à partir du sperme de souris, sont des protéines AKAP (A Kinase Anchoring Protein). Les protéines AKAP sont une famille de protéines d'ancrage. Elles vont permettre, par une simple fixation sur des sous-unités protéiques, de réguler la localisation des protéines kinases dépendantes de l'AMP_c (PKA), des phosphatases et d'autres enzymes de signalisation (Edwards and Scott 2000). Au niveau de la gaine fibreuse, on retrouve les protéines AKAP 3, TAKAP-80 et AKAP 4, protéines d'ancrage des protéines kinases dépendantes de l'AMP_c (PKA). Elles sont impliquées dans la structure et l'assemblage de la gaine fibreuse (Miki, Willis et al. 2002). Les souris déficientes en protéines AKAP 3 et AKAP 4 ont des spermatozoïdes qui présentent une mobilité spermatique déficiente, ceci entraînant une infertilité. Au niveau morphologique, la gaine fibreuse est déstabilisée et le flagelle raccourci (Miki, Willis et al. 2002).

AKAP 3 est aussi une protéine d'ancrage des ropporines. Les ropporines sont impliquées dans la voie de signalisation des Rho. Cette voie de signalisation permet la réorganisation de l'actine, la régulation de la motilité et la cytokinèse (Bishop and Hall 2000; Takai, Sasaki et al. 2001).

La gaine fibreuse est comme la gaine mitochondriale, un générateur d'ATP (figure 8). La gaine fibreuse va produire l'énergie nécessaire à la mise en place de l'hyperactivité flagellaire et ainsi permettre au spermatozoïde de traverser la zone pellucide. L'énergie est produite par le processus de glycolyse grâce à la présence au niveau de la gaine fibreuse d'enzymes glycoliques spermatogéniques telle que la lactate déshydrogénase isoenzyme C4 (Burgos, Maldonado et al. 1995), l'hexokinase de type 1 (Mori, Nakamura et al. 1998) et la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDS).

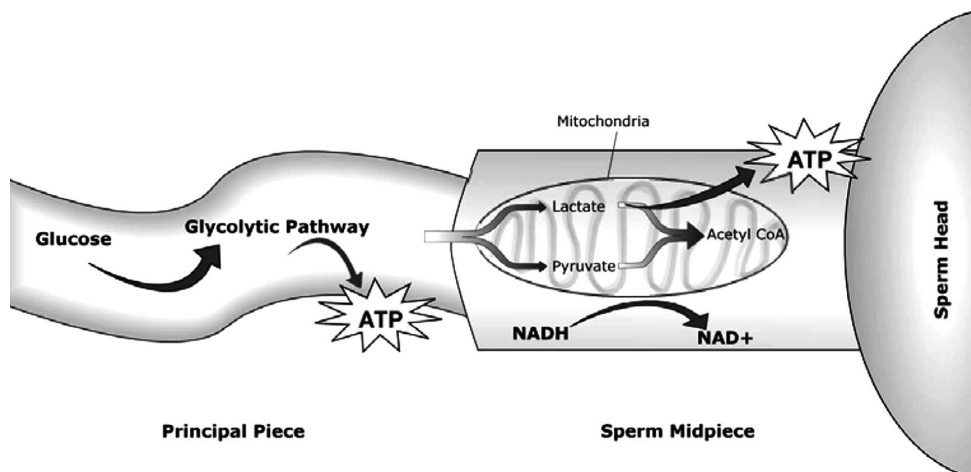


Figure 8 : Représentation schématique des voies métaboliques de synthèse de l'ATP du spermatozoïde (Vadnais, Galantino-Homer et al. 2007).

La gaine fibreuse est une structure cytosquelettique spermatique importante. Elle permet :

- la régulation des voies de signalisations impliquées dans la mobilité spermatique, la capacitation et l'hypéraction flagellaire grâce à ses protéines d'ancrage.
- la production d'énergie nécessaire pour traverser la zone pellucide.

III. Les systèmes de transport ionique du spermatozoïde

Le spermatozoïde de mammifères est équipé de nombreux systèmes de transport ionique, similaires à ceux présents dans les cellules somatiques. Les canaux ioniques, surtout calciques, seront plus particulièrement détaillés, du fait de leur importance considérable dans les processus de signalisation du spermatozoïde (Darszon, Nishigaki et al. 2005).

Dans le spermatozoïde, il existe trois types de systèmes de transport ionique :

- Les Adénosines tri phosphatase (ATPase) membranaire, consommant de l'adénosine tri phosphate (ATP), permettant d'expulser ou de faire rentrer des ions contre leur gradient électrochimique.
- Les échangeurs ioniques, à l'inverse des ATPases membranaires sont des systèmes où deux, voire trois transferts ioniques sont couplés.
- Les canaux ioniques sont des systèmes dont le fonctionnement ne dépend que du gradient électrochimique. Ils présentent une capacité de transfert ionique élevée et ont le plus souvent une sélectivité pour un ion donné, ainsi qu'une cinétique de fonctionnement spécifique.

1. Les ATPase membranaires

Deux sortes d'ATPases membranaires sont particulièrement importantes :

- Les ATPases Sodium (Na^+) / Potassium (K^+), ont pour rôle le maintien d'un gradient transmembranaire d'ion Na^+ et K^+ selon un transport actif de 3 ions Na^+ vers l'extérieur et de 2 ions K^+ vers l'intérieur. Les ATPases Na^+/K^+ permettent le contrôle du potentiel de repos membranaire et sont impliquées dans la régulation de la capacitation, la réaction acrosomique et la mobilité des spermatozoïdes (Mrsny and Meizel 1981; Mrsny, Siiteri et al. 1984; Mrsny and Meizel 1985).
- L'ATPase calcique, permet l'expulsion de deux ions Ca^{2+} par molécule d'ATP dégradée. Des ATPases calciques sont présentes au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde (Gordon and Barnett 1967; Ashraf, Peterson et al. 1982; Breitbart and Rubinstein 1982; Breitbart, Stern et al. 1983). L'étude de Roldan and Fleming 1989, a permis d'établir l'implication des ATPases calcique dans la signalisation calcique régulant la capacitation, la réaction acrosomique et la mobilité spermatique. Cette implication a été montrée par l'utilisation d'antagonistes des ATPases calciques.

2. Les échangeurs ioniques

Les échangeurs ioniques, à l'inverse des ATPases membranaires, sont des systèmes où deux, voire trois transferts ioniques sont couplés. L'énergie étant fournie par le mouvement de l'un des ions qui suit son gradient électrochimique. Parmi les nombreux co-transporteurs connus, quatre sont importants dans la physiologie spermatique :

- L'échangeur sodium/proton (Na^+/H^+) (NHX) assurant la régulation du pH interne, entre 7.0 et 7.4, dont le maintien est indispensable à un déroulement correct des voies de signalisation de la physiologie spermatique (Cross 2007).
- L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), de nature électrogénique, présente une stoechiométrie de 3 molécules de Na^+ pour une de Ca^{2+} . L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) est présent au niveau du spermatozoïde et permet le maintien de l'homéostasie calcique. Le blocage de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), par des inhibiteurs tels que le bepridil, 3'-4' dichlorobenzamil hydrochloride, et KB-R7943, induit une modulation du potentiel de membrane et une immobilité spermatique (Krasznai, Krasznai et al. 2006; Shiba, Marian et al. 2006).
- L'échangeur chlore/bicarbonates ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), utilisant dans les conditions normales le gradient entrant de Na^+ pour produire l'extrusion de protons hors de la

cellule. L'échangeur chlore/bicarbonate ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) permet une augmentation intracellulaire de bicarbonate, première étape des modifications physiologiques, intracellulaires ou membranaires du spermatozoïde qui lui permettra de féconder l'ovocyte (Visconti, Muschietti et al. 1990; Gadella and Harrison 2000; Flesch, Brouwers et al. 2001; Harrison and Gadella 2005). De plus, des études fonctionnelles ont démontré qu'il existait dans les spermatozoïdes de souris deux systèmes régulant le pH : un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dépendant du Na^+ et un système inhibé par des antagonistes des canaux Cl^- mais qui ne possède pas toutes les caractéristiques des échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ indépendants du Na^+ (Zeng, Oberdorf et al. 1996).

3. Les canaux ioniques

➤ Les canaux sodiques

Deux types de canaux sodiques sont actuellement bien décrits, des canaux sodiques activés par une dépolarisation de la membrane ($\text{Na}_v.x$) et des canaux sodiques couplés aux protéines G. Actuellement, aucun enregistrement de flux sodique n'a été décrit dans le spermatozoïde de mammifères, mais récemment l'équipe de Pinto (Pinto, Ravina et al. 2009) a montré par une technique d'immunofluorescence la présence des canaux sodiques dépendant du voltage $\text{Na}_v1.1$ à 1.9 au niveau des spermatozoïdes humains à l'exception de $\text{Na}_v1.1$ et $\text{Na}_v1.3$. L'équipe de Pinto a aussi montré un possible rôle de ces canaux dans la régulation de la mobilité spermatique, car l'application de veratridine, un activateur des canaux Na_v , sur les spermatozoïdes induit une augmentation de leur mobilité.

➤ Les canaux potassiques

Les ions K^+ participent principalement à l'établissement et à la modulation du potentiel de membranaire (E_m). Les canaux potassiques permettent la diffusion passive et sélective des ions K^+ à travers la membrane plasmique. Dans les conditions physiologiques, le flux est presque systématiquement dirigé vers l'extérieur permettant le maintien du potentiel électrique à une valeur proche de celle du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ . Il existe une grande diversité de canaux potassiques qui se distinguent par des mécanismes modulant leur activité. Ces canaux sont des multimères dont les sous-unités α forment le pore ionique et déterminent le mode de régulation. Ils peuvent ainsi se différencier en plusieurs catégories ceux dépendants du voltage, ceux sensibles au calcium, ceux couplés à une protéine G, ceux sensibles à l'ATP et ceux à deux domaines P (K2P) (Lesage, Barhanin et al. 2000).

De nombreux canaux potassiques ont été identifiés dans les spermatozoïdes, ils sont soupçonnés de jouer un rôle dans la maturation des spermatozoïdes. Au niveau des spermatozoïdes, différents canaux potassiques ont été retrouvés, des canaux dépendants du voltage tel que $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v3.1$, K_{sper} , $Slo3$ et un canal couplé à une protéine G GIRK. Ils ont été localisés au niveau de la pièce principale du flagelle et au niveau de la tête du spermatozoïde (Schreiber, Wei et al. 1998; Felix, Serrano et al. 2002; Barfield, Yeung et al. 2005; Navarro, Kirichok et al. 2007). L'étude de Munoz 2001 a permis de mettre en évidence le rôle des canaux potassiques dépendants du voltage à rectification entrante dans le mécanisme de capacitation des spermatozoïdes. En effet, cette étude montre que le blocage des courants K^+ à l'aide de baryum et césium empêche l'hyperpolarisation de la membrane plasmique (élément clef de la capacitation) et diminue le taux de réaction acrosomique induit par la zone pellucide (Munoz-Garay, De La Vega-Beltran et al. 2001).

L'étude de Navarro et al, 2007 a permis de mettre en évidence le rôle K_{sper} dans l'hyperpolarisation de la membrane plasmique durant la maturation du spermatozoïde. De plus cette équipe a posé la question de savoir si K_{sper} et $Slo3$ ne sont pas le même canal potassique. En effet, diverses observations vont dans ce sens, $Slo3$ et K_{sper} sont des canaux potassiques régulés par le pH, ils présentent le même seuil d'activation de dépolarisation de la membrane (-16 mV) et le gène codant pour K_{sper} est quasi identique au gène codant pour $Slo3$ (Schreiber, Wei et al. 1998; Navarro, Kirichok et al. 2007).

➤ **Les canaux chlorures**

Comparés aux autres canaux ioniques, les canaux Cl^- ont longtemps joué le rôle d'*outsiders* intéressants, mais marginaux. Cela est dû en partie à ce que les conductances Cl^- sont plus difficiles à détecter que d'autres et que les fonctions des canaux Cl^- de la membrane plasmique sont mal définies dans la plupart des tissus. Trois types de canaux chlorures sont plus étudiés et retrouvés au niveau des spermatozoïdes (Meizel 1997) :

- Les canaux Cl^- couplés au récepteur $GABA_a$, dont l'activation entraîne un influx de Cl^- sont responsable d'une hyperpolarisation de la membrane.
- Les canaux Cl^- couplés à un récepteur glycine, complexe membranaire oligomérique formé de sous-unités protéiques.
- Les canaux Cl^- dépendants du voltage (ClC). Les ClC sont des protéines d'environ 680 à 910 acides aminés (70 à 95 kDa). Ils possèdent 13 domaines hydrophobes qui s'organisent en hélice α , mais seulement 10 à 12 domaines seraient

effectivement transmembranaires. Les CLC s'organiseraient en homo- ou hétéromultimères (par 2 ou par 4) pour former un canal fonctionnel.

Des récepteurs GABA_a sont présents au niveau de la membrane du spermatozoïde humain (Aanesen, Fried et al. 1996; Ritta, Calamera et al. 1998). Ils sont localisés dans la région du segment équatorial (Wistrom and Meizel 1993). Chez l'homme, le GABA initie la réaction acrosomique de façon dose dépendante selon un mécanisme dépendant du calcium extracellulaire (Shi, Yuan et al. 1997). Cet effet sur la réaction acrosomique est principalement lié à l'activation des récepteurs de type GABA_a (Calogero, Burrello et al. 1999).

Les cellules spermatogoniques de souris possèdent aussi des canaux Cl⁻ ouverts à des potentiels au-dessus de -50 mV et sensibles à l'acide niflumique, inhibiteur anionique (Espinosa, De la Vega et al. 1998). Chez la souris, ce dernier inhibe la réaction acrosomique induite par différents inducteurs tels que la zone pellucide, la progestérone et le GABA (Espinosa, De la Vega et al. 1998) (Espinosa, de la Vega-Beltran et al. 1998; Darszon, Labarca et al. 1999). L'étude de Yeung 2005 a permis d'établir la présence de deux canaux chlore dépendant du voltage : le CLCN3 et CLNS1A au niveau des spermatozoïdes humains. Ces canaux sont impliqués dans la régulation du volume cellulaire des spermatozoïdes humains (Yeung, Barfield et al. 2005).

➤ *Les canaux sensibles aux nucléotides cycliques (canaux CNG)*

Les canaux sensibles aux nucléotides cycliques font partie de la famille des canaux ioniques activés par des ligands. Les CNG sont des canaux ioniques non sélectifs (Kaupp, Niidome et al. 1989). Ces derniers sont activés par des nucléotides cycliques tels que l'AMP_c et le GMP_c (Dzeja, Hagen et al. 1999). Les CNG sont des tétramères. Chaque monomère est composé de six segments transmembranaires et d'un domaine cytoplasmique de liaison aux nucléotides cycliques.

Des études d'immunohistochimie ont montré la présence de deux canaux CNG au niveau du flagelle des spermatozoïdes, CNGA3 et CNGA1 (Wiesner, Weiner et al. 1998; Kobori, Miyazaki et al. 2000). Des études utilisant un analogue du GMP_c, le 8-BrcGMP a permis de montrer l'implication des canaux CNG dans la signalisation calcique spermatique. En effet, ces études montrent que le 8-BrcGMP induit d'une part la réaction acrosomique (Rotem, Zamir et al. 1998) et d'autre part une vague calcique au niveau de la tête des spermatozoïdes

(Kobori, Miyazaki et al. 2000). Cependant, l'invalidation du gène GNCA3 n'induit aucune infertilité spermatique (Biel, Seeliger et al. 1999). La découverte d'une nouvelle famille de canaux calciques dépendant du voltage et de l'activation par AMP_c : « Catsper » au niveau du flagelle des spermatozoïdes (Ren, Navarro et al. 2001), jette un doute sur le rôle des canaux CNG dans la signalisation calcique spermatique.

4. Diversité des canaux calciques présents au niveau du spermatozoïde

Le calcium constitue un messager intracellulaire essentiel n'ayant ni précurseur ni produit de dégradation. Il est mobilisable soit à partir du compartiment extracellulaire, soit à partir des stocks internes comme le réticulum endoplasmique et l'espace intermembranaire du noyau.

Afin de répondre à la pluralité de fonctions cellulaires du calcium au sein d'une même cellule, les canaux calciques présentent une variabilité moléculaire importante et permettent à la cellule de mettre en place une large gamme de signalisations calciques différentes, d'une élévation rapide, transitoire et localisée, à une augmentation persistante et généralisée. Le répertoire en canaux calciques des cellules germinales en général, et du spermatozoïde en particulier, est extrêmement étendu puisque nous retrouvons sur ces cellules des représentants de toutes les familles de canaux calciques. (Figure 9)

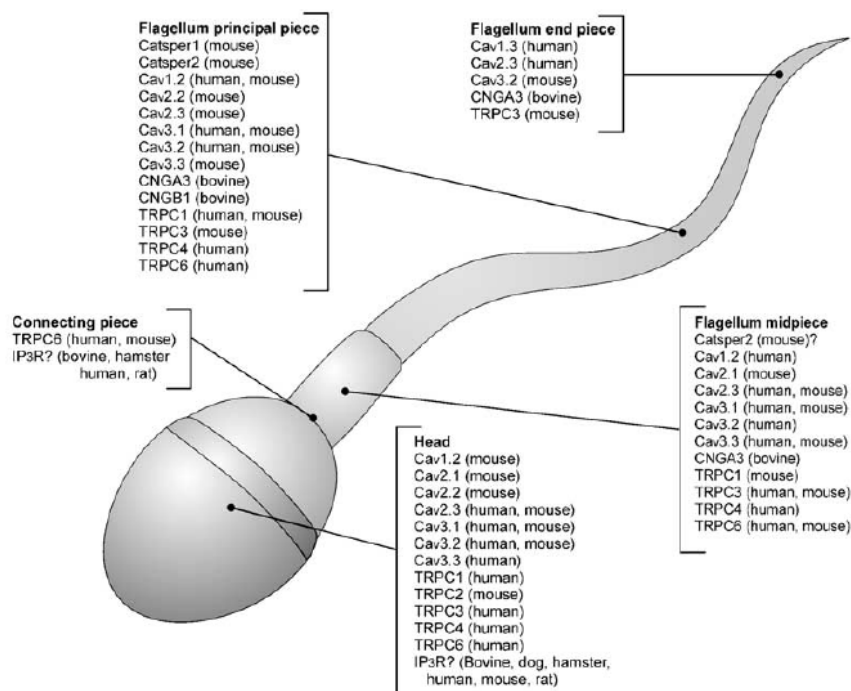


Figure 9 : Représentation schématique de la distribution des canaux calciques dans le sperme de mammifères (Darszon, Nishigaki et al. 2005).

Il a ainsi été décrit au niveau des spermatozoïdes :

➤ **Les canaux calciques dépendant du potentiel.**

Ces canaux sont des protéines hétéro-oligomériques (Figure 10), situés sur la membrane plasmique, qui s'ouvrent lorsque la cellule est soumise à une dépolarisation. Ces canaux sont impliqués dans la réaction acrosomique et la mobilité spermatique. Il existe deux classes de canaux calciques activés par le voltage. La classification de ces canaux a tout d'abord été fondée sur des critères biophysiques (Tsien, Ellinor et al. 1991) puis sur des critères pharmacologiques, avec la découverte de toxines spécifiques et enfin sur des critères phylogéniques par la comparaison de leurs séquences génomiques.

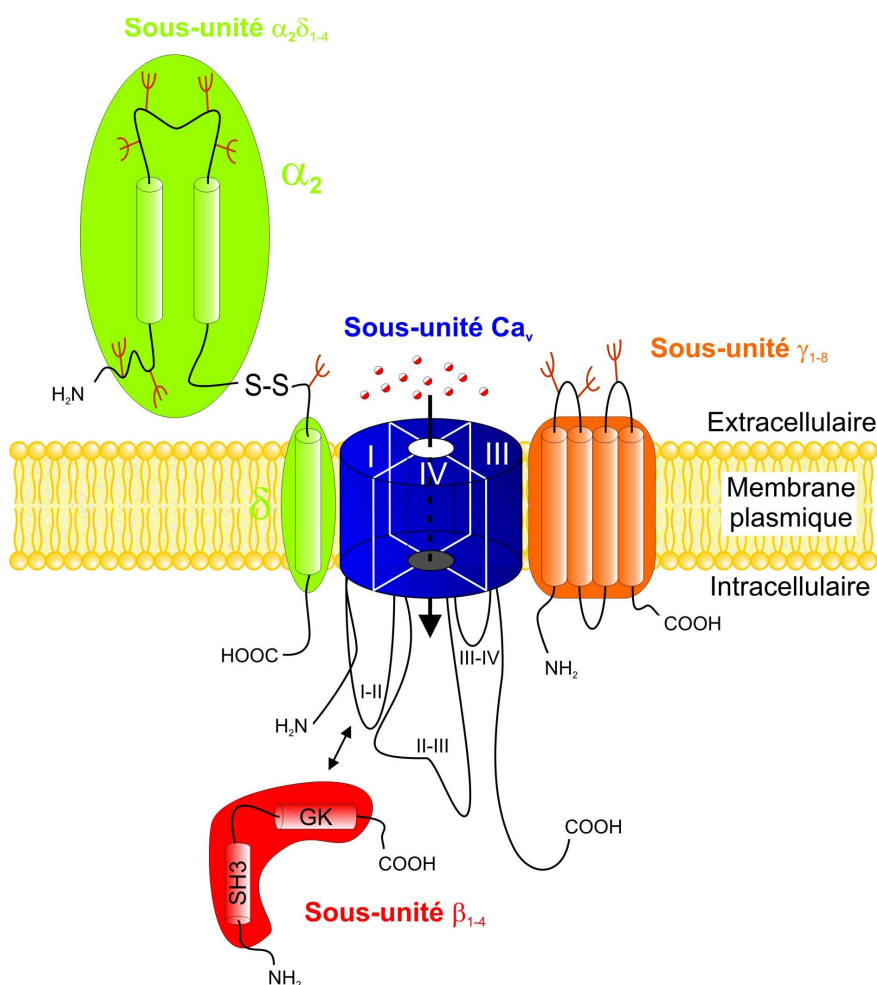


Figure 10 : Représentation schématique de la structure des canaux calciques dépendants du voltage. Les canaux calciques dépendants du voltage sont constitués d'une sous-unité principale α_1 qui constitue notamment le pore du canal. Elle comprend 4 domaines membranaires (I-IV) qui possèdent chacun 6 hélices transmembranaires (S1-S6) reliées par des boucles intra et extracellulaires. Pour les canaux HVA, la sous unité α_1 est associée à des protéines auxiliaires : α_2 , δ , β et γ (McCleskey 1994; Darszon, Nishigaki et al. 2005).

Six canaux ont été clairement identifiés et regroupés en deux grandes familles (Nargeot and Charnet 1994):

- La famille des canaux à haut seuil d'activation qui nécessitent de fortes dépolarisations de la membrane (de -90 mV à 0 mV) pour s'activer. Ces canaux appartiennent aux sous-familles $Ca_v1.x$ et $Ca_v2.x$
- La famille des canaux à bas seuil d'activation qui nécessitent de faibles dépolarisations de la membrane (de -90 à -50 mV) pour s'activer. Ils sont appelés LVA (« Low Voltage-Activated »). Ces canaux correspondent aux canaux de type T (« Transient ») ou $Ca_v3.x$. Ils sont caractérisés par un courant transitoire qui s'inactive avec des constantes de temps de l'ordre de 10 à 50 ms.

Au niveau des spermatozoïdes, des membres de ces deux familles sont présents : $Ca_v1.2$, $Ca_v2.1$, 2.2 et 2.3, $Ca_v3.1$, 3.2 et 3.3 (Florman, Corron et al. 1992; Aanesen, Fried et al. 1996; Goodwin, Leeds et al. 1998; Perez-Reyes 1998; Westenbroek and Babcock 1999; Goodwin, Karabinus et al. 2000; Wennemuth, Westenbroek et al. 2000; Park, Ahn et al. 2003; Trevino, Felix et al. 2004; Escoffier, Boisseau et al. 2007). Ces canaux sont impliqués dans la régulation de la réaction acrosomique (Florman and First 1988; Florman, Corron et al. 1992; Florman 1994; Arnoult, Cardullo et al. 1996; Arnoult, Zeng et al. 1996; Lievano, Santi et al. 1996; Bai and Shi 2002; Escoffier, Boisseau et al. 2007).

Récemment, une nouvelle famille de ces canaux calciques, nommée CatSper, a été découverte. Ce canal a été initialement trouvé par une recherche « in silico » basée sur des homologies de séquences avec les canaux calciques dépendant du voltage (CCDV) (Quill, Ren et al. 2001; Ren, Navarro et al. 2001). Cependant, contrairement aux CCDV, CatSper est composé d'un seul domaine de 6 hélices transmembranaires (S1-S6), autrement dit, 4 molécules ou sous-unités de CatSper sont nécessaires pour former un canal calcique fonctionnel, à l'image des canaux potassiques (Figure 11). Quatre gènes, situés sur des chromosomes différents codent actuellement pour 4 isoformes de CatSper (CatSper1, 2, 3 et 4) (Ren, Navarro et al. 2001; Carlson, Westenbroek et al. 2003; Lobley, Pierron et al. 2003; Carlson, Quill et al. 2005; Kirichok, Navarro et al. 2006). CatSper est associé à des protéines auxiliaires : CatSper β (Liu, Xia et al. 2007) et CatSper γ (Wang, Liu et al. 2009). Mais l'expression hétérologue des différentes isoformes de CatSper (séparément ou ensemble) n'a pas permis de mettre en évidence la fonction canal de ces protéines. On suppose actuellement que les canaux CatSper nécessitent d'autres sous-unités auxiliaires inconnues pour que la fonction canal s'exprime.

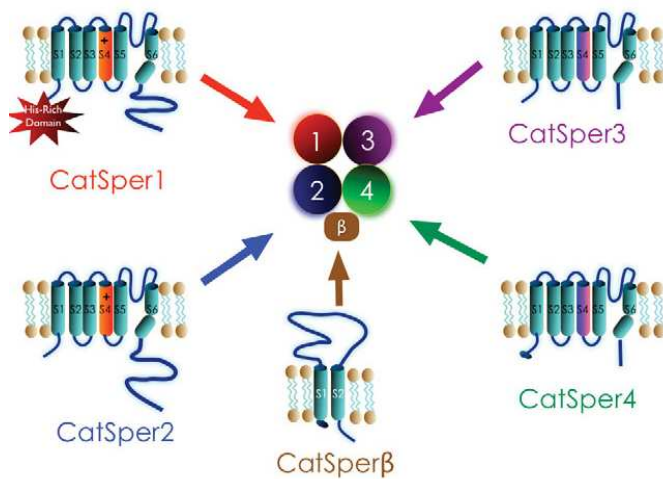


Figure 11 : Représentation schématic du canal CatSper. Le complexe CatSper est formé de CatSper 1-4 et d'une sous-unité auxiliaire : CatSper β . CatSper β est constitué de 2 domaines transmembranaires, séparés par une grande boucle extracellulaire (~ 1000 acides aminés). Comme les autres canaux calciques dépendant du voltage, les 4 isoformes de CatSper sont constituées de 6 domaines transmembranaires (S1-S6) reliés par des boucles intra et extracellulaires. Le domaine transmembranaire S4 constitue le senseur de potentiel (sensor voltage domain). Les domaines

transmembranaires S5, S6 et les boucles S5, S6 transmembranaire constitue le pore du canal. La sélectivité du canal pour le calcium est déterminée par une séquence consensus d'acides aminés négatifs ([T/S] $\times$ [D/E] $\times$ W) située au niveau du pore du canal (Navarro, Kirichok et al. 2008)

Les quatre membres de la famille CatSper sont exprimés presque exclusivement dans le testicule, et les spermatozoïdes de mammifère. Ces canaux sont localisés au niveau de la pièce principale du spermatozoïde. Bien que leur mode d'activation reste inconnu, ces canaux calciques sont impliqués dans l'hyperactivité du flagelle et la fertilité. L'invalidation d'un des 4 gènes de CatSper (CatSper 1, 2, 3 ou 4) chez la souris mâle induit une immobilité flagellaire et une infertilité (Ren, Navarro et al. 2001; Avidan, Tamary et al. 2003; Carlson, Westenbroek et al. 2003; Lobley, Pierron et al. 2003; Carlson, Quill et al. 2005; Qi, Moran et al. 2007; Navarro, Kirichok et al. 2008; Carlson, Burnett et al. 2009)

➤ *Les canaux de type SOC « Store Operated Channels »*

L'activation de ces canaux dépend du niveau de remplissage des stocks calciques internes, d'où leur nom. Parmi les canaux SOC, la sous-famille de canaux, appelée TRPC (7 gènes), semble majoritairement responsable de cette entrée de calcium (Figure 12). L'activation des SOC qui fait suite à la vidange des stocks est encore un mécanisme mal compris ainsi que leur rôle dans la physiologie spermatique. Quatre modes d'activations des TRPC ont été envisagés :

- un couplage conformationnel avec les canaux calciques des stocks intracellulaires IP3R ou RyR (Berridge 1995; Kiselyov, Xu et al. 1998).
- un recrutement des canaux vers la membrane plasmique par exocytose (Yao, Ferrer-Montiel et al. 1999).

- La vidange des stocks pourrait permettre le relâchement d'un facteur diffusant jusqu'à la membrane plasmique (Randriamampita and Tsien 1993).
- Depuis les 3 dernières années, une nouvelle famille de protéine senseur de calcium a été identifiée comme régulateur des TRPC : Les STIM (STromal Interaction Molecule). Elles permettraient l'activation des TRPC par une interaction fonctionnelle (Potier and Trebak 2008; Bojarski, Pomorski et al. 2009; Deng, Wang et al. 2009; Potier, Gonzalez et al. 2009).

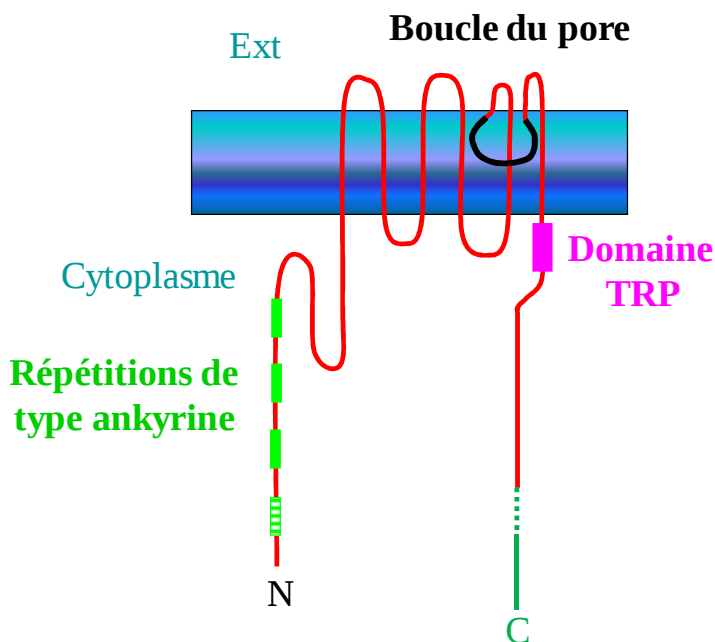


Figure 12 : Organisation structurale d'un monomère des TRPCs. Les TRPCs sont des tétramères formés de 4 sous-unités identiques. Chaque monomère comprend six domaines transmembranaires et une partie C-ter et N-ter intracytoplasmiques. En N-ter, il existe une succession de 4 motifs de type ankyrine. La région putative du pore se situe entre les segments transmembranaires 5 et 6. La partie C-ter comprend une région très conservée appelée « TRP box », une région d'interaction entre l'IP3R et la CaM appelée domaine CIRB et un motif de type coil-coil (Felix 2005). La structure générale des TRPC est similaire à

celle des canaux CNG et des canaux calciques dépendants du voltage, sauf que le domaine S4 ne possède pas de résidus positifs, ce qui leur confère une insensibilité aux variations de voltage. (Darszon, Nishigaki et al. 2005)

Plusieurs membres des TRPC ont été décrits dans le spermatozoïde comme TRPC 1, 2, 3, 4 et 6 (O'Toole, Arnoult et al. 2000; Jungnickel, Marrero et al. 2001; Stambouljian, Waard et al. 2002; Castellano, Trevino et al. 2003; Sutton, Jungnickel et al. 2004). L'implication de TRPC2 dans la physiologie spermatique a été mise en évidence par l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre TRPC2 qui permet l'inhibition des courants calciques dépendant du TRPC2. L'inhibition de ces courants calciques bloque la réaction acrosomique induite par ZP3 (Jungnickel, Marrero et al. 2001). Cependant, la souris KO TRPC2 reste fertile (Leypold et al., 2002), suggérant que les autres TRPCs présents pourraient se substituer à TRPC2.

➤ ***Les récepteurs canaux.***

Ces canaux, eux aussi localisés dans la membrane plasmique, s'ouvrent par la fixation d'une molécule sur leur domaine extracellulaire. Le récepteur à l'acétylcholine qui appartient à cette famille est lui aussi présent sur le spermatozoïde. Son rôle dans la physiologie spermatique reste encore mal défini. Il pourrait cependant être impliqué dans le contrôle de la RA (Son and Meizel, 2003).

➤ ***Les canaux calciques du réticulum.***

Ils permettent la vidange des stocks internes et sont de deux types : le récepteur à l'IP₃ activé par une augmentation de la concentration de l'IP₃ (3 gènes) et le récepteur de la Ryanodine (3 gènes), activé par le calcium ou grâce à un couplage mécanique avec des canaux dépendant du voltage de la membrane plasmique. Au niveau du spermatozoïde, on les retrouve majoritairement au niveau de la **membrane acrosomique** (Walensky and Snyder 1995).

Le récepteur à l'inositol 1.4.5 triphosphate (IP₃R) récepteur tétramérique est activé par la liaison de l'inositol 1.4.5 triphosphate (IP₃). L'IP₃ est un messager secondaire, provenant de la dégradation du phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) par la phospholipase C (PLC) en réponse à la stimulation d'un récepteur couplé aux protéines G ou d'un récepteur aux tyrosines kinases (Berridge, Lipp et al. 2000). En se liant au canal récepteur à l'IP₃ (IP₃R), l'IP₃ permet le relâchement de calcium contenu dans les stocks intracellulaires (figure 13). Du point de vue de sa structure, il s'agit d'un tétramère (Jiang, Thrower et al. 2002). La région du canal calcique possède des homologies avec le RyR et est localisée au niveau Cter de la protéine. Le filtre de sélectivité est codé par une séquence précise en acides aminés GVGD. La sélectivité au calcium est déterminée par un résidu Asp2550 (Boehning, Joseph et al. 2001). La protéine comprend six domaines transmembranaires et sa partie Cter se projette dans le cytoplasme. Le site de liaison pour l'IP₃ se situe au niveau Nter de la protéine. L'IP₃R est une très grosse protéine d'environ 1000 kDa.

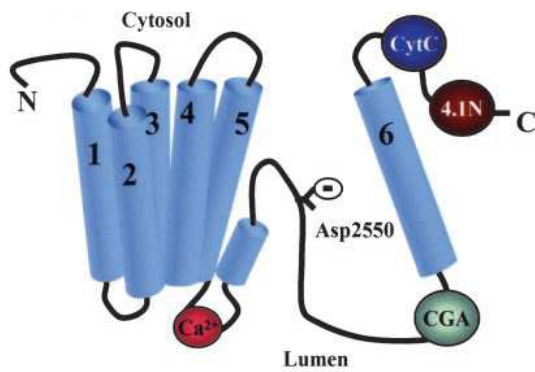


Figure 13 : Représentation schématique d'un monomère du récepteur à l'IP₃. Le récepteur l'IP₃R est un tétramère formé de 4 sous-unités identiques. Chaque sous-unité comprend six domaines transmembranaires et une partie Cter cytoplasmique. La sélectivité du canal pour le calcium est déterminée par un résidu Asp2550 (Patterson, Boehning et al. 2004).

L'IP₃R n'a pas qu'une fonction de canal calcique. En effet, de nombreuses protéines interagissent directement avec l'IP₃R qui est impliqué dans de nombreuses voies de signalisations. La régulation de cette protéine est assez complexe. Plusieurs acteurs peuvent réguler l'IP₃R :

- Le calcium contrôle l'IP₃R de façon biphasique. Le calcium à forte concentration intracellulaire (100 nM) active l'IP₃R et à faible concentration intracellulaire l'inhibe.
- La régulation de l'IP₃R peut s'effectuer par le biais de phosphorylations. L'IP₃R peut être phosphorylé par plusieurs protéines kinases. La phosphorylation de l'IP₃R modifie les caractéristiques spatiotemporelles du relâchement de calcium (Ferris, Cameron et al. 1991; Ferris, Haganir et al. 1991).
- L'ATP augmente l'influx de calcium via l'IP₃R quand sa concentration est de 100 μM. En revanche, lorsque sa concentration est élevée, l'ATP inhibe le relâchement de calcium induit par l'IP₃ (Ferris, Haganir et al. 1990).
- Régulation par des interactions protéine - protéines, plus de 25 protéines ont été identifiées comme interagissant avec l'IP₃R, comme l'anhrine, la calmoduline, la myosine, la caspase 3, la calpain, le cytochrome C, TRPC, etc...

Walensky et Snyder en 1995 ont réalisé une étude de référence sur la présence du récepteur à l'IP₃ dans le spermatozoïde mature. Ils ont montré que le spermatozoïde était une cellule très riche en IP₃R, que l'IP₃R se colocalisait essentiellement avec l'acrosome et que le signal disparaissait lors de la réaction acrosomique (Walensky and Snyder 1995). D'autres études ont par la suite démontré l'implication du récepteur à l'IP₃ dans la mise en place de la signalisation calcique qui induit la réaction acrosomique (Arnoult, Kazam et al. 1999).

Le Récepteur de la Ryanodine (RyR) forme une famille de récepteurs présentant de fortes homologues avec le récepteur IP₃. Comme pour le récepteur IP₃, le récepteur ryanodine est un tétramère formé de 4 sous-unités identiques de 560 kDa environ (Figure 14). Initialement, ces récepteurs ont été mis en évidence au niveau du réticulum sarcoplasmique

des muscles squelettiques (RyR1) et cardiaques (RyR2). Depuis les récepteurs ryanodine ont été identifiés dans beaucoup d'autres types cellulaires. Le RyR est présent dans les cellules spermatogéniques. Des études de protection à la RNase, d'hybridation in situ (Giannini et al., 1995) et d'immunocytochimie (Trevino et al., 1998) montrent que RyR1 et 3 sont présents dans les tubules séminifères au niveau des régions enrichies en spermatocytes et spermatides. RyR3 est le seul isoforme présent dans le spermatozoïde mature (Trevino, Santi et al. 1998). Une étude récente (Chiarella et al., 2004) montre une expression différentielle de RyR1 au cours de la spermatogénèse. Le RyR est fonctionnel dans les cellules spermatogéniques et la mobilisation du calcium via le RyR participerait à la maturation de la lignée germinale.

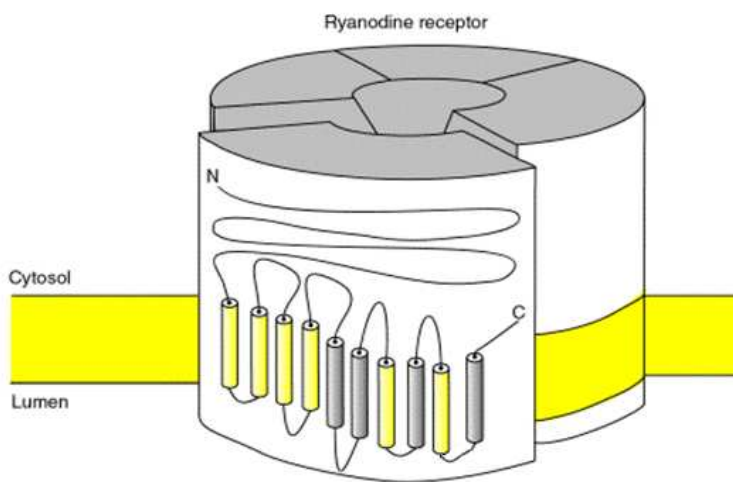


Figure 14 : Représentation schématique de la structure du récepteur à la ryanodine. La protéine comprend six domaines transmembranaires. Le domaine C-terminal constitue le pore ionique. Le domaine cytoplasmique N-ter interagit avec le récepteur aux dihydropyridines (DHP-sensible Ca^{2+} channels ou L-type calcium channel). Il y a 3 sites de fixation du Ca^{2+} dans la partie N-terminale, proche du canal.

Nous l'avons vu, le spermatozoïde est une cellule très complexe, hautement différencié. Il va subir tout au long de son existence une série de modifications physiologiques, intracellulaires ou membranaires qui lui permettront de féconder l'ovocyte. Ces changements s'accompagnent de signaux et d'activation des voies de transduction intracellulaires. Ils sont principalement composés de signaux ioniques et métaboliques. La première série de modifications est la capacitation. La capacitation est une étape de maturation des spermatozoïdes lors de leur ascension dans le tractus génital femelle. On appelle capacitation l'ensemble des changements physiologiques qui rendent les spermatozoïdes capables de féconder l'ovocyte.

Chapitre 2 : La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes

La capacitation est une étape de maturation des spermatozoïdes lors de leur ascension dans le tractus génital femelle. On appelle capacitation l'ensemble des changements physiologiques qui rendent les spermatozoïdes capables de féconder l'ovocyte. C'est un phénomène réversible, les spermatozoïdes capités peuvent être « décapités » s'ils sont incubés dans le plasma séminal (Vadnais, Kirkwood et al. 2005; Vadnais, Kirkwood et al. 2005). À l'heure actuelle, on ne connaît pas toutes les modifications moléculaires qui accompagnent la capacitation, cependant on en connaît quatre principales :

- Modification de la composition lipidique de la membrane caractérisée notamment par un efflux de cholestérol membranaire, induite par les protéines de l'albumine présentes dans le tractus génital femelle (Martinez and Morros 1996; Nolan and Hammerstedt 1997; Harrison and Gadella 2005; Visconti 2009) (Visconti, Galantino-Homer et al. 1999).
- Modifications ioniques intracellulaires et membranaires : hyperpolarisation de la membrane plasmique, augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et augmentation du pH interne (Arnoult, Kazam et al. 1999) (Zeng, Clark et al. 1995).
- Certaines protéines impliquées dans la fixation du spermatozoïde à la membrane pellucide de l'œuf et dans l'exocytose de la vésicule acrosomiale vont être phosphorylées au niveau de leurs résidus tyrosines (Jimenez, Gonzalez-Marquez et al. 2003) (Visconti, Bailey et al. 1995; Visconti, Moore et al. 1995; Salicioni, Platt et al. 2007).
- Hyperactivation flagellaire (Navarro, Kirichok et al. 2008).

I. Modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation

Lors de la capacitation, la membrane plasmique du spermatozoïde subit des modifications et notamment des modifications lipidiques. Ces dernières correspondent à des changements dans la distribution et la composition en lipides et phospholipides, ce qui conduit à une augmentation de la fluidité membranaire et à des changements de l'architecture et de la composition de la membrane (Baldi, Luconi et al. 2000; Gadella, Tsai et al. 2008).

1. La membrane plasmique du spermatozoïde avant capacitation

La composition lipidique des membranes des spermatozoïdes est inhabituelle par rapport à celle des autres cellules somatiques de mammifères (Mack, Everingham et al. 1986; Alvarez and Storey 1995; Martinez and Morros 1996) . En effet, ces membranes présentent :

- Un taux élevé de cholestérol (et de stérols-sulfates), distribué uniformément au niveau des zones apicales et équatoriales de la membrane de la tête du spermatozoïde.
- Des glycérophospholipides essentiellement sous forme de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) mais aussi de plasmalogènes (choline et éthanolamine) et des phosphatidylinositol (PI) à fort pouvoir antioxydant (figure 16)
- De la sphingomyéline (SM). La sphingomyéline est un sphingolipide constitué d'un céramide substitué sur l'alcool primaire par un groupement phosphorylcholine (figure x)
- Le rapport cholestérol/phospholipides (Chol/Pls) (indicateur de la fluidité membranaire) est élevé de 0,21 à 1 selon les espèces.
- Des acides gras polyinsaturés tels que les acides arachidoniques, docosapentanoïque et docosahexaénoïque fixés au niveau *sn*-2 des phospholipides (Ladha 1998).(figure 15)
- Des acides gras saturés tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique fixés au niveau *sn*-1 des PC et PE (Ladha 1998). (Tableau 1)

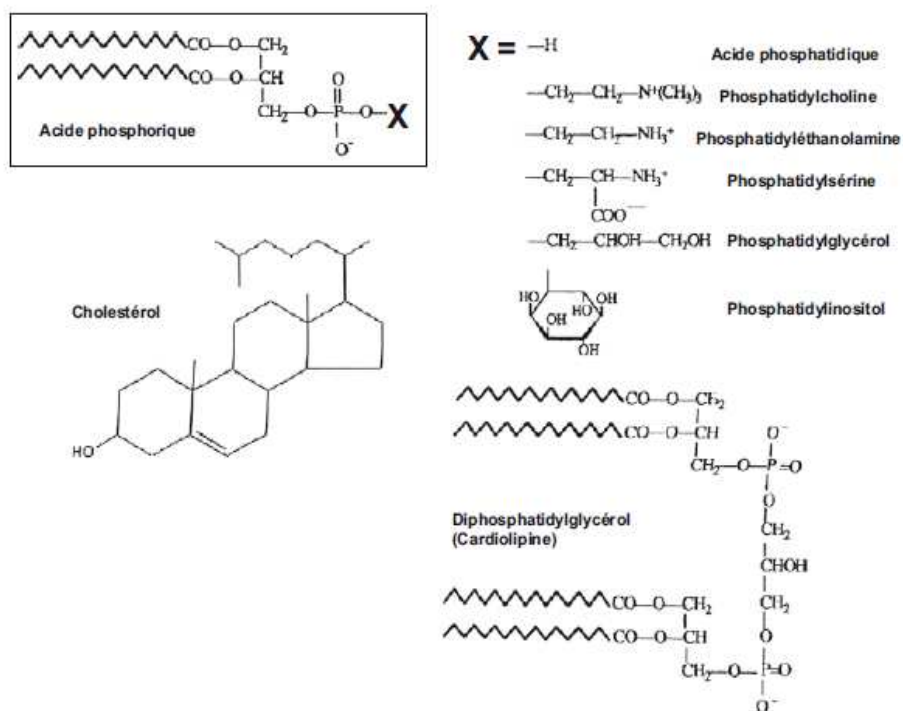


Figure 15 : Formules chimiques de quelques phospholipides communément observés et du cholestérol. La nature du substituant (X) fixé sur l'acide phosphorique définit la nature du phosphoglycéride (Rejraji, Saez et al. 2009).

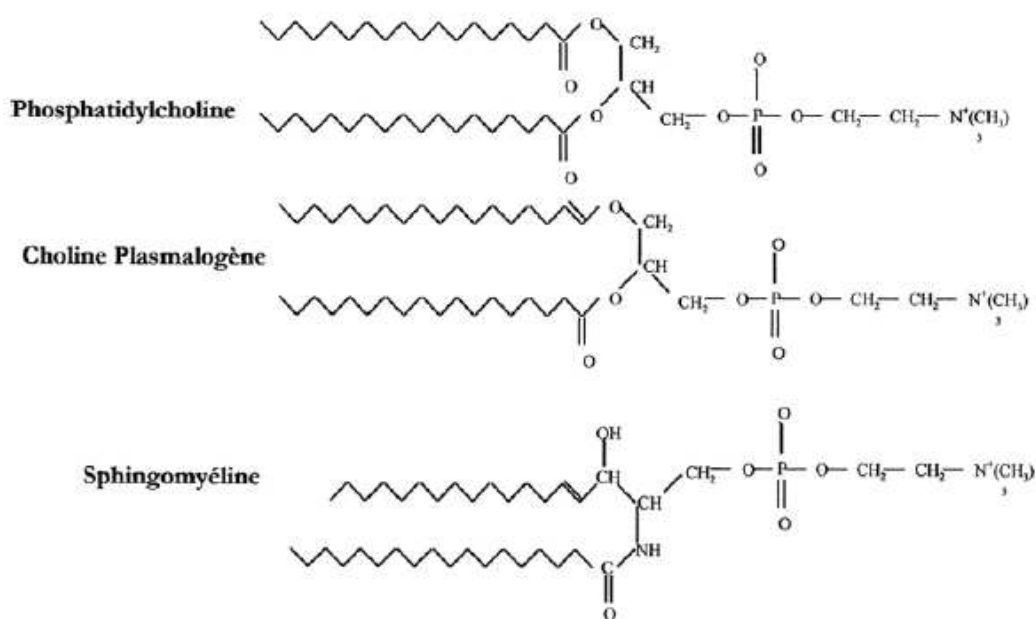


Figure 16 : Formules chimiques de la phosphatidylcholine (PC), choline plasmalogène et de la sphingomyéline (SM). Les plasmalogènes forment un groupe de phospholipides à résidu aldéhyde, contenant un AG estérifié avec un glycérol et un ester insaturé à longue chaîne carbonée. Leur hydrolyse donne un aldéhyde gras et un AG. La choline plasmalogène, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline possèdent le même groupement polaire phosphorylcholine (Rejraji, Saez et al. 2009).

Tableau 1: Noms et formules chimiques de quelques AG communément rencontrés dans les membranes cellulaires (Murray, Mayes et al. 1999)

Noms chimiques (vulgarisés)	Formules	Noms usuels
<i>Acides gras saturés</i>		
Tétradécanoïque	14 : 0	Myristique
Hexadécanoïque	16 : 0	Palmitique
Octodécanoïque	18 : 0	Stéarique
Eicosanoïque	20 : 0	Arachidique
Docosanoïque	22 : 0	Béhénique
Tétracosanoïque	24 : 0	Lignocérique
<i>Acides gras insaturés</i>		
Octadécénoïque	18 : 1n-9 (cis)	Oléique
Octadécadiénoïque	18 : 2n-6 (cis)	Linoléique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-9 (cis)	Linolénique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-3	Alphalinolénique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-6	Gammalinolénique
Eicosatetraénoïque	20 : 4n-6	Arachidonique (AA)
Eicosapentaénoïque (EPA)	20 : 5n-3	Timnodonique
Docosapentaénoïque	22 : 5n-3	Clupanodonique
Docosahexaénoïque (DHA)	22 : 6n-3	Cervonique

La quantité de lipides membranaires du spermatozoïde varie considérablement d'une espèce à une autre. Les PE et les PC sont les phospholipides majoritaires de la membrane des spermatozoïdes, quelques soient l'espèce animale ou l'état de maturité du spermatozoïde. En guise d'exemple, PE et PC représentent à elles seules 70 à 80 % des phospholipides de la membrane plasmique du spermatozoïde de bélier (Parks and Hammerstedt 1985; Parks, Arion et al. 1987). La PS et le PI représentent respectivement 4 et 3 % des phospholipides totaux des spermatozoïdes (Parks and Hammerstedt 1985). La SM représente en moyenne 15 % des lipides totaux des spermatozoïdes. Les stérols (cholestérol) sont des éléments essentiels des membranes cellulaires, ils représentent le deuxième constituant lipidique majeur des membranes spermatiques après les phospholipides. Il y a 26 fois plus de cholestérol présent dans les membranes spermatiques que dans les membranes des cellules somatiques (Mack, Everingham et al. 1986).

La présence, d'une part, d'un taux élevé de cholestérol et de glycérophospholipides contribuant à former des régions membranaires non diffusibles (Martinez and Morros 1996) et, d'autre part, de la sphingomyéline interagissant avec le cholestérol (Schroeder, Jefferson et al. 1991), conduit à rigidifier et à stabiliser la membrane. La fluidité membranaire (notamment la mobilité des phospholipides dans la bicouche) est limitée tout comme la perméabilité membranaire aux ions ou encore l'insertion de protéines (Schroeder, Jefferson et al. 1991; Martinez and Morros 1996).

La diffusion limitée des phospholipides induit une asymétrie de la membrane : les aminophospholipides (phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE)) sont de

façon prépondérante dans le feuillet interne (cytosolique) de la bicouche lipidique alors que les phospholipides neutres (phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline) sont davantage présents dans le feuillet externe (Flesch, Brouwers et al. 2001; Flesch, Wijnand et al. 2001; Gadella, Tsai et al. 2008). Une large proportion de lipides peut cependant diffuser latéralement dans la membrane (Gadella, Tsai et al. 2008).

Il existe également dans la membrane des spermatozoïdes des régions ou des microdomaines particuliers, appelés « lipid rafts », riches notamment en sphingolipides, en phospholipides à longues chaînes saturées et en cholestérol (Simons and Vaz 2004), mais aussi en protéines spécifiques (cavéoline-1 par exemple) (Simons and Toomre 2000) (Figure 17).

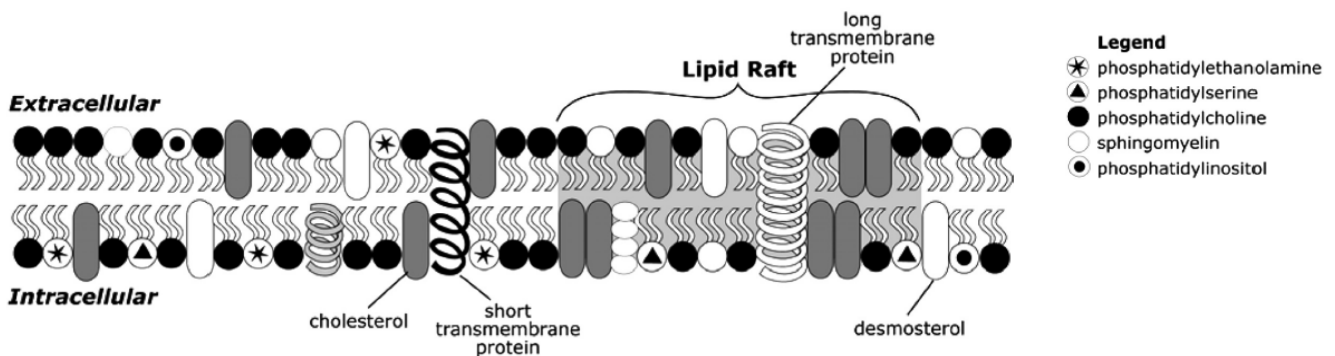


Figure 17: Membrane plasmique des spermatozoïdes immatures. Modifié d'après (Vadnais, Galantino-Homer et al. 2007)

2. Le bicarbonate induit des modifications lipidiques de la membrane

Le bicarbonate est un ion ubiquitaire considéré comme un agent essentiel de la capacitation. Les spermatozoïdes sont stockés au niveau de l'épididyme où le niveau de bicarbonate est maintenu à une concentration assez faible (3-4 mM). Lorsqu'il arrive au niveau du tractus génital femelle où le niveau de bicarbonate est plus élevé (>20 mM), ils subissent un afflux de bicarbonate effectué par les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et les échangeurs $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ qui induit la capacitation (Wang, Zhou et al. 2003).

L'élévation de bicarbonate constitue une des étapes essentielles dans l'initiation de la capacitation. Elle induit un changement de la structure de la membrane lipidique des spermatozoïdes par l'activation de **la voie de signalisation AMP_c /Protéine Kinase A (PKA)**.

L' AMP_c est produite à partir d'ATP par une enzyme : l'Adénylate-Cyclase (sAC ou SACY). L'adénylate cyclase du spermatozoïde est différente des autres adénylate-cyclases des cellules somatiques : sa forme soluble la rend unique en son genre et des quantités élevées d'ARNm codant pour cette enzyme s'accumulent dans les spermatides ronds de rat (Sinclair, Wang et

al. 2000). Ces caractéristiques sont différentes de celles des enzymes de la superfamille des adénylate cyclases transmembranaires qui interagissent avec les protéines G. Elle est insensible aux protéines G, à la toxine cholérique et aux GTP non hydrolysables (activateurs des protéines G) (Hess, Jones et al. 2005; Visconti 2009). L'activité de cette adénylate cyclase, qu'elle soit utilisée sous sa forme purifiée à partir de testicules, ou recombinante, ou exprimée dans une lignée cellulaire, est stimulée par l'ajout de bicarbonate (sous forme de NaHCO_3 ou KHCO_3) et de calcium (Litvin, Kamenetsky et al. 2003), et ceci, de façon indépendante des modifications du pH intracellulaire (Chen, Cann et al. 2000). Cette activation est aussi observée avec les ions bisulfites (Na_2SO_3 ou NaHSO_3) dont la structure est proche de celle des bicarbonates, mais pas avec les ions chlorures, sulfates ou phosphates.

L' AMP_c produite à partir d'ATP par sAC est capable d'activer des protéines telles que la protéine kinase A. La protéine kinase A activée va phosphoryler différentes protéines transmembranaires et intracellulaires, dont les protéines scramblases (Darszon, Acevedo et al. 2006; Vadnais, Galantino-Homer et al. 2007). La phosphorylation des protéines « Scramblase » par la PKA va induire l'externalisation des phosphatidyléthanamines et phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche lipidique.

3. Les lipoprotéines présents au niveau du tractus génital femelle induisent un efflux de cholestérol

L'efflux de cholestérol constitue une autre étape essentielle dans l'initiation de la capacitation. Les lipoprotéines présentes dans les liquides folliculaires ou de l'oviducte (notamment humains et bovins), plus spécifiquement les HDL (high density lipoproteines) vont capturer le cholestérol des membranes plasmiques des spermatozoïdes (Visconti, Ning et al. 1999). L'efflux de cholestérol est aussi induit par des protéines liant les lipides comme les protéines de type « bovine séminal plasma » (BSP) présentes en quantité abondante dans le plasma séminal bovin et humain (Aanesen, Fried et al. 1996; Moreau, Frank et al. 1999; Manjunath and Therien 2002). Des études réalisées chez les bovins, montrent que les protéines BSP pourraient être associées à des HDL du liquide folliculaire et donc avoir un effet synergique dans la capacitation (Therien, Bousquet et al. 2001). L'activation d'un transporteur de stérol, ressemblant au scavenger receptor de type 1, SRB-1 (Flesch, Brouwers et al. 2001) et l'activation d'une sphingomyélinase seraient également impliquées dans cet efflux de cholestérol (van Gestel, Brewis et al. 2005).

L'efflux de cholestérol induit une augmentation de la fluidité membranaire (Vadnais, Galantino-Homer et al. 2007) et permet la diffusion latérale du cholestérol restant (Travis and Kopf 2002). Ce dernier se retrouve concentré uniquement dans la zone apicale ou partie antérieure de la tête du spermatozoïde lors de la capacitation (Flesch, Brouwers et al. 2001). C'est également dans cette zone que l'on observe une perte de l'asymétrie des phospholipides due à leur réorganisation (Flesch, Brouwers et al. 2001).

À l'heure actuelle, il est difficile de savoir si la réorganisation des phospholipides est due à la perte du cholestérol ou si la perte de cholestérol est due à la réorganisation des phospholipides induite par l'augmentation de bicarbonate. En effet, différentes études montrent que la perte du cholestérol provoque une interaction entre les cavéolines-1 et les protéines de translocation de phospholipides appelées scramblases, ce qui conduit à leur activation et au passage des phospholipides d'un feuillet à un autre (« flip-flop » ou scramble) (Flesch, Brouwers et al. 2001; Travis and Kopf 2002). D'autres études montrent que le bicarbonate présent à forte concentration dans un milieu capacitant induit une translocation de phosphatidylcholine et de sphingolipides du feuillet externe au feuillet interne via l'activation des scramblases (Flesch, Brouwers et al. 2001; de Vries, Wiedmer et al. 2003; Gadella, Tsai et al. 2008). Et que le réarrangement de la bicouche lipidique par les scramblases, permet une relocalisation du cholestérol au niveau de la partie apicale de la tête du spermatozoïde. La relocalisation du cholestérol semble nécessaire à son élimination par les accepteurs de cholestérol tels que l'albumine, l'héparine ou le glycoaminoglycane (GAG) (figure 18).

La capacitation est également associée à l'augmentation de la méthylation des phospholipides et à l'origine d'une synthèse accrue de phosphatidylcholine à partir de phosphatidyl éthanolamine (Stojanoff, Bourne et al. 1988).

Les changements de propriétés de la membrane plasmique dans la zone antérieure de la tête du spermatozoïde vont ainsi affecter directement la redistribution de protéines notamment de la cavéoline-1 (Flesch, Brouwers et al. 2001) et de la flotilline- 1 (van Gestel, Brewis et al. 2005) suite à la modification de structure des « lipids rafts », ce qui favoriserait alors l'interaction de molécules de signalisation. Ils font aussi apparaître des zones membranaires fusiogènes et permettent l'externalisation de récepteurs spermatiques susceptibles d'intervenir dans la liaison primaire avec la zone pellucide de l'ovocyte. Ils sont aussi responsables de modifications de l'activité des canaux ioniques ou d'échangeurs d'ions augmentant ainsi la perméabilité de la membrane aux ions dont les ions bicarbonates et calciques. Toutes ces étapes sont indispensables à l'hyperactivation transitoire du spermatozoïde et à la réalisation de la réaction acrosomique.

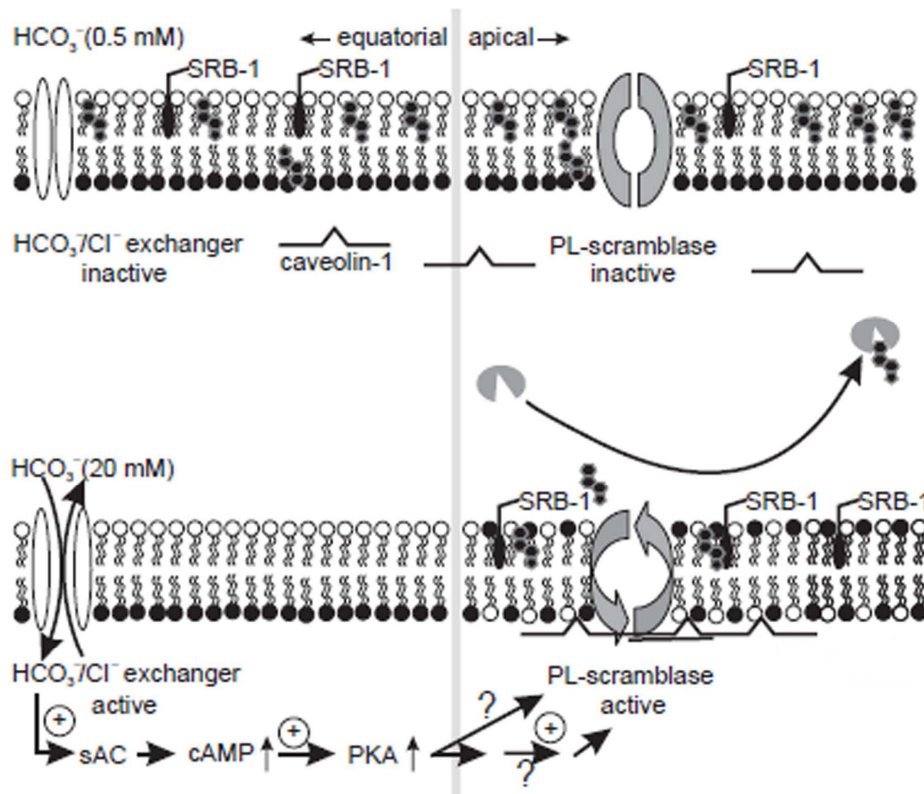


Figure 18 : Modèle des voies signalisations de la modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifère (Flesch, Brouwers et al. 2001). En absence de niveaux élevés de bicarbonate (c'est-à-dire dans l'épididyme ou le fluide séminal) et de lipoprotéines la réorganisation des phospholipides « scrambling » est bloquée. Le cholestérol est localisé au niveau apical et équatorial de la membrane plasmique de la tête des spermatozoïdes et les cavéolines-1 sont à l'extérieur des « lipids rafts ». En présence de niveaux élevés de bicarbonate soluble et de lipoprotéines, l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ va s'activer et induire une augmentation intracellulaire de bicarbonate. Le bicarbonate va activer l'adénylate cyclase. L'activation de l'adénylate cyclase par le bicarbonate initie la voie AMP_c/PKA aboutissant à la phosphorylation des protéines membranaire (Cheng et al., 2000). Cette voie conduit à l'activation des scramblases, localisées au niveau apical de la membrane plasmique de la tête des spermatozoïdes (Gadella and Harrison 2000) par l'intermédiaire d'une voie encore peu claire. L'activation de la scramblase va induire l'externalisation des phosphatidyléthanamines et phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche lipidique. Ce réarrangement des phospholipides coïncide avec la relocalisation du cholestérol par les SRB-1 (Scavenger Receptor de type 1) au niveau de la partie apicale de la tête du spermatozoïde (Fielding and Fielding 2000), son efflux par les lipoprotéines et la redistribution de protéines des « lipids rafts » notamment de la cavéoline-1.

II. Modifications ioniques lors de la capacitation

Les spermatozoïdes non-capacités présentent un pH interne (pHi) d'environ 6.6 et un potentiel de membrane de - 35 à - 45 mV (Arnoult, Kazam et al. 1999). Durant la capacitation des modifications des concentrations intracellulaires des ions K^+ , HCO_3^- , Na^+ et Cl^- , vont induire l'hyperpolarisation de la membrane plasmique, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et une augmentation du pH interne (Figure19).

Les modifications ioniques :

- L'entrée de bicarbonate par des échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ va entraîner une augmentation du pHi de 0.4 unité environ (Zeng, Oberdorf et al. 1996).
- L'hyperpolarisation de la membrane passant de -35/45 mV à -80 mV (Arnoult, Kazam et al. 1999) est en partie due à un efflux de potassium K^+ par les canaux potassiques de type Kir qui s'activent par une élévation du pHi (Darszon, Acevedo et al. 2006). L'hyperpolarisation de la membrane est aussi due à l'augmentation intracellulaire de HCO_3^- par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ et l'inactivation du canal sodique épithélial ENaC. L'hyperpolarisation de la membrane et l'augmentation du pHi permettent aux canaux calciques dépendants du voltage présents sur la membrane plasmique de passer d'un état inactivé à un état activable (Arnoult, Kazam et al. 1999).
- Augmentation de la concentration calcique intracellulaire de 70 nM à 250 nM (Fraser 1987; Baldi, Casano et al. 1991; Marin-Briggiler, Gonzalez-Echeverria et al. 2003) : L'élévation de Ca^{2+} cytoplasmique est produite par l'activation des canaux CNG par l'AMPc (produit par l'activation de l'adénylate cyclase activée par le bicarbonate), par des pompes calcium ATPasiques et des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (DasGupta, Mills et al. 1993; Yanagimachi 1994; Visconti, Bailey et al. 1995; Jagannathan, Publicover et al. 2002; Visconti, Westbrook et al. 2002).

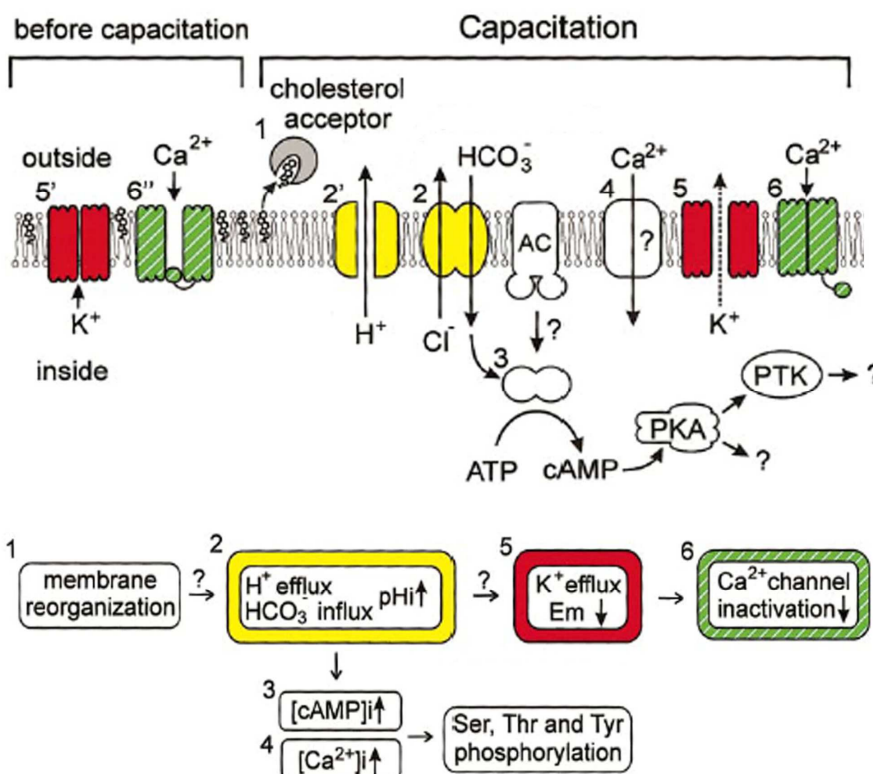


Figure 19 : Modifications ioniques lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères. (schéma modifié de (Darszon, Beltran et al. 2001))

III. L'hyperactivation flagellaire.

Les spermatozoïdes de mammifères présentent deux niveaux physiologiques de mobilité : une mobilité dite « symétrique » qui est intrinsèque et une dite « asymétrique » qui est acquise lors de la maturation des spermatozoïdes.

Lors de l'éjaculat, les spermatozoïdes présentent une mobilité symétrique. Cette mobilité est caractérisée par une faible amplitude de mouvement et une trajectoire rectiligne. (Turner 2003; Turner 2006)

La capacitation va permettre aux spermatozoïdes d'acquérir la mobilité asymétrique appelée aussi hyperactivation flagellaire (Ho and Suarez 2001). Cette hyperactivation va permettre aux spermatozoïdes de traverser le cumulus oophorus, la zone pellucide (membrane de glycoprotéines qui entoure l'ovocyte), et ainsi féconder l'ovocyte. Cette mobilité est caractérisée par une augmentation du battement flagellaire, une augmentation de l'amplitude du mouvement et une trajectoire dite curvilinéaire (Figure 20).

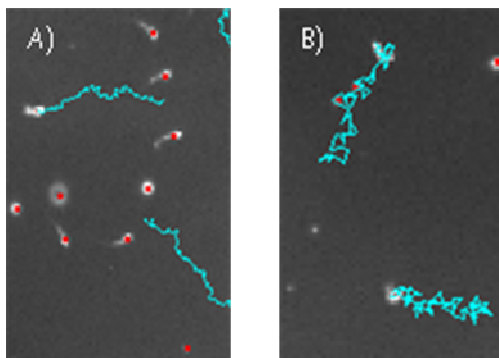


Figure 20 : Photo des trajectoires des têtes de spermatozoïdes de souris établis par un appareil de mesure de la mobilité spermatique (CASA). A) Spermatozoïdes immatures présentant une mobilité symétrique caractérisée par une trajectoire rectilinéaire. B) Spermatozoïdes matures présentant une mobilité asymétrique caractérisée par une trajectoire curvilinéaire.

1. Mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique symétrique

Le mouvement flagellaire est créé par l'interaction cyclique des bras de dynéines ATPasiques avec les microtubules β . Cette interaction génère un phénomène de « glissement » des microtubules entre eux. La génération de ce glissement microtubulaire nécessite la phosphorylation et la déphosphorylation des bras de dynéines ATPasique (Inaba 2003; Turner 2006). Après phosphorylation par la protéine kinase PKA, la dynéine ATPasique est activée. Elle va alors pouvoir hydrolyser l'ATP, l'énergie qui en résulte va permettre le glissement des bras de dynéine d'un microtubule à l'autre. La dynéine sera par la suite inactivée par déphosphorylation par l'action du complexe calmoduline-calcineurine phosphatase ou des sérines/thréonine phosphatases. Comme les bras de dynéines interagissent

toujours avec les mêmes microtubules adjacents, une activation et une inactivation asynchrone des bras de dynéines le long de l'axonème sont nécessaires pour générer le mouvement flagellaire symétrique (Figure 21).

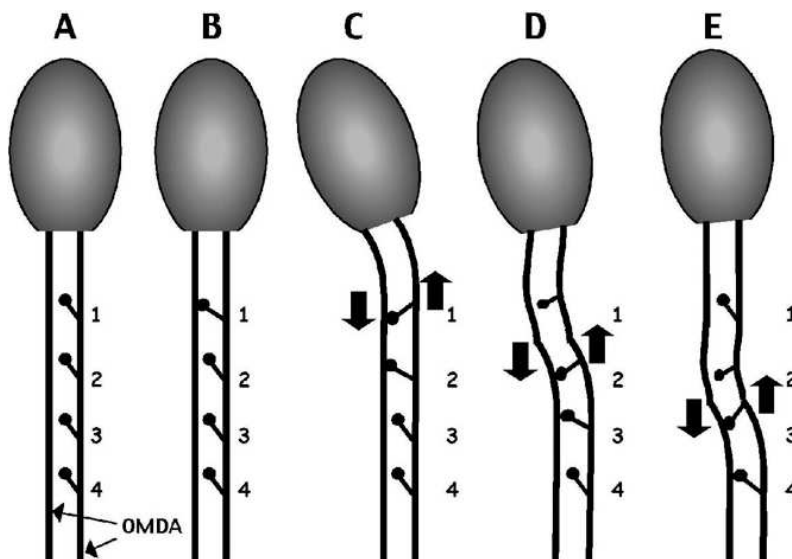


Figure 21 : Représentation schématisée simplifiée du mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique générée par le glissement des microtubules entre eux. Pour simplifier la figure, seulement 2 des 9 doublets de microtubules externes (OMDA) sont représentés. La paire centrale de microtubules n'est pas montrée. Chaque symbole représente les bras de dynéine ATPasique. (A) Aucun bras de dynéine ATPasique n'est activé, les doublets de microtubules restent droits, il n'y a pas de mouvement flagellaire. (B) Le premier bras de dynéine ATPasique (1) a interagi avec son doublet de microtubules adjacents. (C) Le premier bras de dynéine ATPasique a hydrolysé de l'ATP et généré une force de glissement des microtubules adjacents (grandes flèches), qui se traduit par une flexion de la tête du spermatozoïde. Le deuxième bras de dynéine ATPasique a interagi avec son doublet de microtubules adjacents. (D) Le premier bras de dynéine ATPasique a relâché son doublet de microtubules adjacents et revient à sa position initiale, tandis que le second bras de dynéine ATPasique hydrolyse de l'ATP et génère une force de glissement des microtubules adjacents. Il en résulte la propagation de la flexion du flagelle. (E) La flexion du flagelle se propage le long de l'axonème de la tête du spermatozoïde vers la partie terminale du flagelle. Cette coordination des bras de dynéine aboutit à un battement flagellaire symétrique. (Turner 2003; Turner 2006)

2. Voies de signalisation de régulation de la mobilité spermatique symétrique

À l'heure actuelle deux voies principales de signalisation de régulation de la mobilité spermatique symétrique ont été décrites : une voie contrôlée par la cascade de signalisation AMPc/PKA et une voie contrôlée par la cascade de signalisation CamK/Calcineurine (Suarez 1987; Suarez and Osman 1987; Suarez, Vincenti et al. 1987; Lindemann and Kanous 1989; Brokaw 1991; Visconti, Johnson et al. 1997; Ho, Granish et al. 2002). D'autres cascades de signalisation sont également susceptibles de jouer des rôles. Une cascade de signalisation

médiée par les protéines G a été récemment décrite (Hinsch, Habermann et al. 1993; Nakamura, Fujita et al. 1999; Fujita, Nakamura et al. 2000; Carr, Fujita et al. 2001) ainsi qu'une voie de régulation de la mobilité du à la modification du pH (Yanagimachi 1994). Toutefois, il y a eu relativement peu d'études sur ces dernières voies de signalisation.

3. Voie de signalisation AMP_c /PKA

La mobilité des spermatozoïdes est, au moins en partie, initiée et maintenue par la phosphorylation et la déphosphorylation des bras de dynéines via l'activité de la PKA, elle-même régulée par la concentration d' AMP_c (Visconti, Johnson et al. 1997). L' AMP_c est produit à partir d'ATP par l'adénylate cyclase (sAC ou SACY). L'activation de l'adénylate cyclase par le bicarbonate initie la voie AMP_c /PKA aboutissant à la phosphorylation des bras de dynéines ATPasique (Visconti, Johnson et al. 1997). La balance entre la phosphorylation et la déphosphorylation des bras de dynéines ATPasique est régulée par des sérines/thréonine phosphatase (Figure 22). Une autre famille de protéines kinases est importante dans cette cascade de phosphorylation : les protéines kinase d'ancrage AKAP. AKAP est une famille de protéines kinase qui est ancrée dans la gaine fibreuse (FS) du flagelle. Trois protéines d'ancrage sont majoritairement présentes au niveau de la gaine fibreuse AKAP 4, AKAP 3 et TAKAP-80. Les AKAP vont recruter les PKA qui ont été activées par l' AMP_c , au niveau des bras de dynéines ATPasiques. (Miki, Willis et al. 2002; Turner 2006). Les protéines AKAP vont permettre une régulation géospatiale de la cascade de phosphorylation PKA/tyrosine kinase au niveau du flagelle. Il en résulte une activation géospatiale des dynéines ATPasiques qui permet le glissement des microtubules.

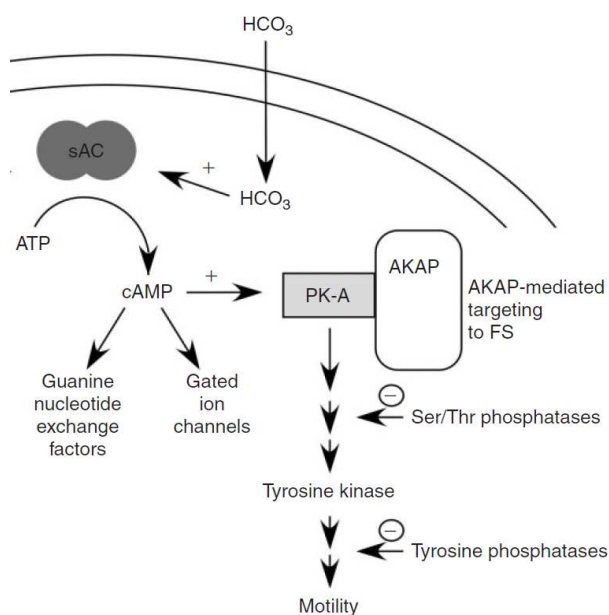


Figure 22 : Représentation schématique de la voie de signalisation AMP_c /PKA qui régule la mobilité spermatique des mammifères (Turner 2006)

4. Voie de signalisation Calmoduline/CamK/Calcineurine dépendante du calcium

La mobilité des spermatozoïdes est, aussi régulée par la phosphorylation et la déphosphorylation des bras de dynéines induite par la voie de signalisation Calmoduline/CamK/Calcineurine.

La calmoduline est une protéine monomérique de 148 acides aminés, ubiquitaire, capable d'interagir avec les ions Ca^{2+} présents dans le milieu cellulaire. Cette liaison induit un changement conformationnel de la protéine, permettant ainsi la formation d'un complexe calmoduline/calcium. Ce complexe permet l'activation par changement de conformation de nombreuses protéines.

En présence de calcium, la calmoduline située au niveau de l'axonème va former un complexe calmoduline/calcium/bras externes de dynéines au niveau du domaine LC8 de la dynéine. Le complexe va alors activer la cascade de phosphorylation de la calmoduline kinase CamK, qui à son tour va phosphoryler les bras de dynéines ATPasique situés dans son environnement immédiat (Visconti, Johnson et al. 1997). La balance entre la phosphorylation et la déphosphorylation des bras de dynéines ATPasiques est régulée par des phosphatases particulières : les calcineurines. Cette cascade de signalisation CamK/Calcineurine va permettre de contrôler la mobilité spermatique (Figure 23).

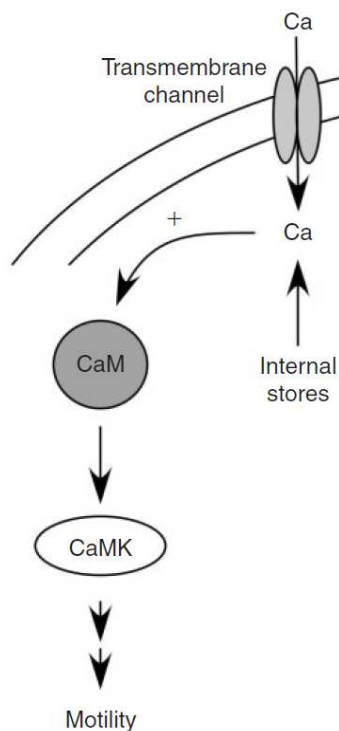


Figure 23 : Représentation schématique de la voie de signalisation Calmoduline/CamK/Calcineurine qui régule la mobilité spermatique des mammifères (Turner 2006)

C'est la synergie entre les deux voies de signalisation AMP_c /PKA et CamK/Calcineurine qui va permettre la mise en place de la mobilité spermatique. L'absence de la cascade de signalisation induite par la calmoduline peut être compensée par la voie de signalisation AMP_c /PKA. Par contre, la cascade de signalisation induite par la calmoduline ne suffit pas à la mise en place de la mobilité spermatique. En effet, les spermatozoïdes de souris présentant l'invalidation du gène de l'adénylate cyclase soluble, premier effecteur de la voie AMP_c /PKA sont immobiles (Wu, Ribar et al. 2000; Ignatz and Suarez 2005; Marin-Briggiler, Jha et al. 2005).

5. Mécanisme moléculaire de l'hyperactivité flagellaire

La capacitation va permettre aux spermatozoïdes d'acquérir la mobilité asymétrique appelée aussi hyperactivation flagellaire. Cette mobilité est caractérisée par une augmentation du battement flagellaire, une augmentation de l'amplitude du mouvement et une trajectoire curvilinéaire. Le mécanisme d'activation de l'hyperactivité flagellaire n'est pas complètement connu. On sait seulement que l'augmentation intracellulaire de HCO_3^- , Ca^{2+} , d' AMP_c lors de la capacitation est indispensable à l'hyperactivité flagellaire.

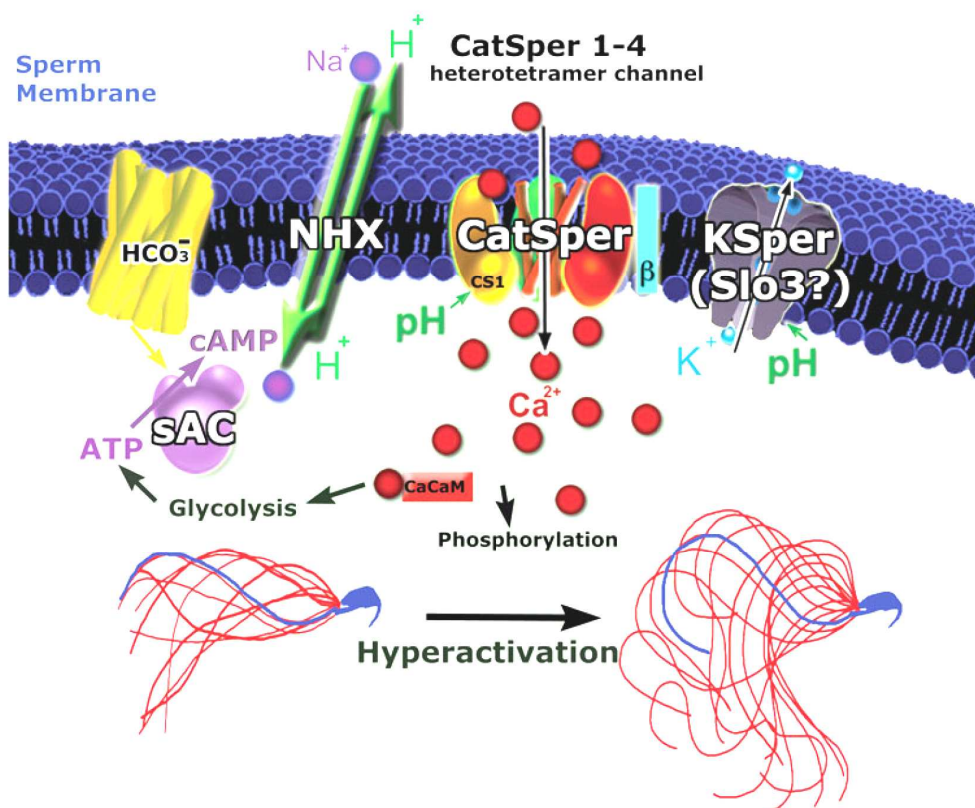


Figure 24 : Représentation hypothétique du mécanisme de régulation de l'hyperactivité flagellaire induite lors de la capacitation (Navarro, Kirichok et al. 2008).

L'augmentation intracellulaire de bicarbonate lors de la capacitation va activer l'adénylate cyclase permettant ainsi la production d'AMP_c. L'AMP_c de manière directe ou indirecte va activer un échangeur Na⁺/H⁺(NHX), ce qui permet alors une augmentation du pH interne. L'augmentation du pH interne va activer les canaux potassiques appelés KSper (ou Slo3). L'activation de KSper va permettre l'hyperpolarisation de la membrane plasmique du spermatozoïde. L'augmentation du pH interne et l'hyperpolarisation de la membrane induite par KSper vont permettre l'activation d'une famille de canaux dépendants du voltage : CatSper, situés au niveau de la pièce principale du spermatozoïde. L'activation des canaux CatSper va induire une forte augmentation intracellulaire de calcium (Figure 24). La modification de la balance de calcium intracellulaire par les canaux CatSper va permettre aux spermatozoïdes d'acquérir la mobilité asymétrique c'est-à-dire l'hyperactivation flagellaire.

L'inactivation d'un des 4 gènes de CatSper (CatSper 1, 2, 3 ou 4) chez la souris mâle induit une immobilité flagellaire et une infertilité (Ren, Navarro et al. 2001; Avidan, Tamary et al. 2003; Carlson, Westenbroek et al. 2003; Lobley, Pierron et al. 2003; Carlson, Quill et al. 2005; Qi, Moran et al. 2007; Navarro, Kirichok et al. 2008; Carlson, Burnett et al. 2009).

À l'heure actuelle, on connaît seulement deux voies de signalisation qui pourraient être régulées par la modification de la balance de calcium : la voie de phosphorylation par les Camk et la voie de la glycolyse.

- L'implication de la voie de phosphorylation par les Camk a tout d'abord été montrée par l'étude de Brokaw and Nagayama 1985. Cette étude montre que l'addition de calmoduline sur des spermatozoïdes sans membrane plasmique induit l'hyperactivation flagellaire. De plus, l'exposition d'inhibiteur des Calmodulines tel que le W7 et calmidazolium (CZ) sur des spermatozoïdes hyperactifs change la caractéristique de leur mobilité. Ils réacquièrent une mobilité symétrique. Cette perte de mobilité asymétrique est corrélée avec une diminution de phosphorylation des protéines spermatiques (Tash and Means 1987; Si and Olds-Clarke 2000); Tash, Krinks et al. 1988).
- La régulation de la voie glycolyse par la modification de la balance de calcium a été mise en évidence tout d'abord par le fait intéressant que les spermatozoïdes CatSper1^{-/-} montraient un taux faible d'ATP par rapport aux spermatozoïdes Wt et ensuite par le fait que spermatozoïdes CatSper1^{-/-} ne montraient aucune production de NADH,

produit intermédiaire de la voie de la glycolyse (Xia, Reigada et al. 2007; Navarro, Kirichok et al. 2008).

Nous l'avons vu, la capacitation est une étape de maturation des spermatozoïdes lors de leur ascension dans le tractus génital femelle. C'est une série de modifications physiologiques, intracellulaires ou membranaires qui lui permettront de féconder l'ovocyte. Ces changements s'accompagnent de signaux et d'activation des voies de transduction intracellulaires. Cette étape lui permet de se trouver dans un état compatible, afin de pouvoir traverser l'oviducte et d'être capable d'interagir avec la zone pellucide. Lorsqu'ils rentrent en contact avec la zone pellucide, les spermatozoïdes subissent une modification physiologique ultime la Réaction Acrosomique (RA). La RA correspond à l'exocytose de la vésicule de sécrétion (l'acrosome) située au niveau de la tête du spermatozoïde. Les gamètes males ne seront ensuite plus la cible de modifications, mais participeront à la transformation profonde de l'ovocyte et à la création d'un nouvel individu.

Chapitre 3: La réaction acrosomique

Les spermatozoïdes de mammifères contiennent une seule vésicule de sécrétion, ou acrosome, située sur la partie antérieure de la tête. Le contenu de cette vésicule de sécrétion est libéré lors du contact du spermatozoïde avec la zone pellucide qui entoure l'ovocyte (Figure 25). Cette exocytose de la vésicule de sécrétion est connue sous le nom de réaction acrosomique. Les spermatozoïdes doivent effectuer la réaction acrosomique pour pouvoir en premier lieu se lier à la zone pellucide (externalisation de protéines nécessaires à la liaison du spermatozoïde), puis traverser la zone pellucide et enfin fusionner avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Si l'exocytose est effectué prématurément, les spermatozoïdes ne peuvent plus se lier à la zone pellucide, traverser la zone pellucide et donc féconder l'ovocyte. La réaction acrosomique, première étape de la fécondation, est irréversible et indispensable (Cummins, Fleming et al. 1986).

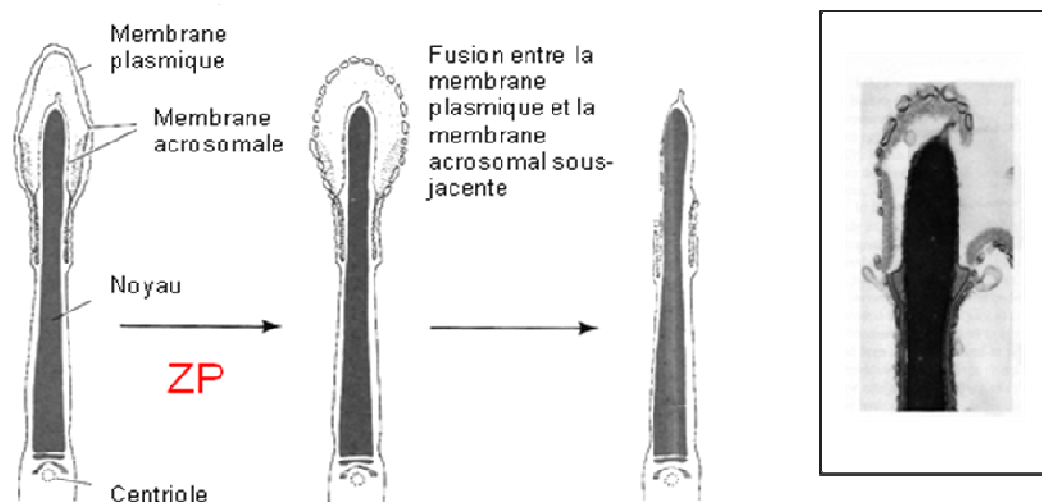


Figure 25 : La réaction acrosomique. La vésicule de sécrétion située au niveau de la tête du spermatozoïde va se désagréger et permettre le relâchement des enzymes responsables de la digestion localisée de la zone pellucide de l'ovocyte. Cette réaction nécessite du calcium provenant de l'extérieur de la cellule et des stocks calciques internes. La photo montre, en Microscopie électronique, la désagrégation de la membrane acrosomiale (D'après Biologie du Développement (Gilbert) ed De Boeck Université).

I. Liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide

La structure de la ZP a été étudiée surtout chez la souris et le porc, des espèces qui permettent la récupération de beaucoup de matériel à faible coût. Malheureusement chez l'Homme son étude est rendue très difficile par le peu de matériel disponible qui ne peut être que de la ZP provenant d'ovocytes récupérés après un échec de fécondation *in vitro*, avec le consentement

des patients. La souris a donc été le modèle privilégié depuis le début des années 80. La zone pellucide constitue une matrice extracellulaire de l'ovocyte. Il s'agit d'une structure épaisse et complexe entourant l'ovocyte. Elle intervient lors de l'interaction gamétique en établissant une barrière d'espèce, évitant ainsi des fécondations hétérospécifiques. Son maillage (Figure 26) est composé de 3 glycoprotéines ZP1, ZP2 et ZP3. ZP2 et ZP3 s'associent pour former des filaments réunis par des ponts de ZP1 (Greve and Wassarman 1985; Wassarman and Mortillo 1991). L'épaisseur de la zone pellucide est normalement de 12 μm . ZP1, ZP2 et ZP3 sont des glycoprotéines qui sont constituées d'une charpente polypeptidique et glycosylées de façon hétérogène par des oligosaccharides de type asparagine (N) et sérine-thréonine (O). La zone pellucide joue trois rôles principaux pendant la fécondation : elle empêche le brassage inter-espèce, elle lie le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique.

On connaît depuis les années 80 le rôle de ZP3 chez la souris. Cette protéine intervient dans la fixation primaire du spermatozoïde à la zone pellucide (Bleil and Wassarman 1980). Des trois glycoprotéines constituant la ZP, seule ZP3, purifiée à partir d'ovocytes de souris non fécondés, est capable de lier les spermatozoïdes présentant leur acrosome intact (Bleil and Wassarman 1980; Wassarman 1990). Cette capacité de liaison est modifiée après la fécondation, car les ZP3 isolées à partir des zones pellucides d'œufs fécondés perdent cette propriété (Bleil and Wassarman 1980; Wassarman 1990).

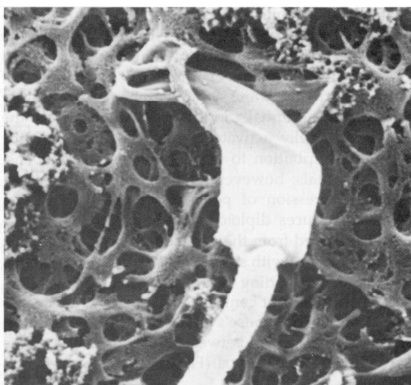


Figure 26 : La zone pellucide de l'œuf. Image de microscopie électronique montrant l'accrochage d'un spermatozoïde au niveau de l'enchevêtrement glycoprotéique qui constitue la zone pellucide.

Plusieurs observations indiquent que la charpente polypeptidique ne joue qu'un rôle mineur comme ligand du spermatozoïde. En effet, chez la souris, l'aptitude de ZP3 à agir *in vitro* comme récepteur spermatique n'est pas altérée par des températures élevées, des détergents, des agents dénaturants ou par protéolyse partielle (Florman and Wassarman 1985). Les récepteurs spermatiques de la zone pellucide sont spécifiques d'une espèce à l'autre, en effet les préparations de ZP solubilisée d'un ovocyte de souris inhibent partiellement la fécondation

in vitro des œufs de hamster (Gwatkin and Williams 1977). L'interaction spécifique d'espèce entre la ZP et son récepteur spermatique est un événement plutôt médié par des sucres et dépend de la nature des oligosaccharides de la ZP. Une inactivation chimique ou enzymatique des oligosaccharides des ZP (Litscher, Juntunen et al. 1995) inhibe la liaison des spermatozoïdes à la ZP chez la souris. Des oligosaccharides O-liée, isolés de ZP3 par hydrolyse alcaline douce ou en conditions réductrices, inhibent également *in vitro* la liaison des spermatozoïdes à la ZP (Florman and Wassarman 1985). Des expériences de type protéolyse partielle (Litscher and Wassarman 1996) ou de mutagenèse dirigée (Kinloch, Sakai et al. 1995) indiquent que les oligosaccharides, essentiels à la liaison avec le récepteur spermatique, sont localisés chez la souris sur deux des cinq résidus sérine Ser-332 et -334, dans une région polypeptidique proche de l'extrémité C terminale. La liaison entre ZP3 et son récepteur spermatique est un événement complexe mettant en jeu des récepteurs spermatiques à fortes et basses affinités (Thaler and Cardullo 1996). Il existerait au moins 30 000 sites de liaison à ZP3 par le spermatozoïde de souris (Thaler and Cardullo 1996). Deux douzaines de protéines différentes ont été identifiées, mais aucune n'a été formellement reconnue comme étant « Le » récepteur à ZP3 (Wassarman 1999). Pourquoi un tel nombre et une telle variété (Wassarman 1999) ? Plusieurs hypothèses ont été avancées :

- l'implication de différents types protéiques en fonction des espèces.
- La participation pour une espèce donnée de plusieurs types protéiques à la liaison de ZP3, agissant de façon individuelle ou sous forme de complexe multiprotéique.
- L'existence de nombreuses protéines, ayant chacune une affinité différente pour ZP3, et agissant de façon séquentielle.

Parmi les nombreux récepteurs spermatiques identifiés pouvant jouer un rôle dans la liaison avec ZP3, seule une minorité semble impliquée dans la réaction acrosomique (Wassarman 1999)(Figure 27) :

- **La β -galactosyltranferase (GalTase)** est une protéine testiculaire insérée dans la membrane plasmique recouvrant l'acrosome. Elle est capable de se lier aux résidus N-acetylglucosamine de ZP3 chez la souris (Shur 1991). L'interaction entre la β -galactosyltranferase et la ZP3 induit la réaction acrosomique chez la souris (Gong, Dubois et al. 1995). Les spermatozoïdes knock-out pour une isoforme de GalTase présentent une diminution notable de la capacité à réaliser la réaction acrosomique en présence de ZP3, de la capacité de pénétrer la zone pellucide et une diminution notable

du taux de fécondation (Lu and Shur 1997). L'existence de GalTase, ou de ses isoformes chez l'homme à l'heure actuelle n'a pas été confirmée. Des études montrent qu'il s'agirait d'une α -mannosidase qui jouerait un rôle similaire (Tulsiani, Skudlarek et al. 1989; Brandelli, Miranda et al. 1996).

- **La protéine SP56** est une protéine de souris, qui est localisée au niveau de la membrane plasmique recouvrant l'acrosome. Cette protéine est aussi retrouvée chez le rat et le singe (appelé AM67), mais pas chez l'homme. L'interaction entre SP56 et ZP3 a été démontrée par des techniques de co-immunoprécipitation (Cheng, Le et al. 1994; He, Yan et al. 2003).
- **La zonadhésine** est une protéine localisée au niveaux de la tête du spermatozoïde de souris, des isoformes de cette protéine ont été retrouvés chez les porcs, les bovins, les lapins et les primates. Elle joue un rôle dans la liaison du spermatozoïde à la ZP (Hardy and Garbers 1995; Herlyn and Zischler 2008).

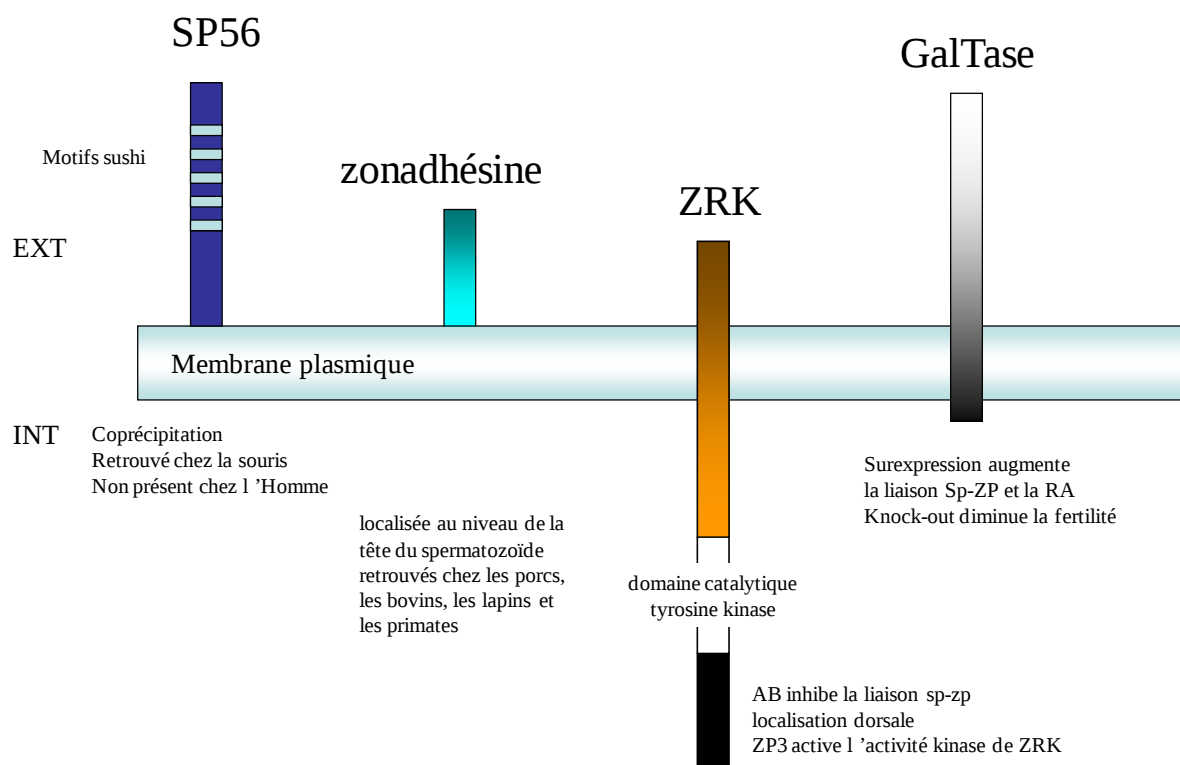


Figure 27 : Représentation schématique des récepteurs spermatiques impliqués dans la liaison avec la Zone pellucide.

- **La Zona Receptor Kinase (ZRK)** a été initialement décrite chez la souris. C'est une protéine de 95 kDa qui présente une activité tyrosine kinase. Elle va s'autophosphoryler sur des résidus tyrosine en présence de ZP3 (Leyton and Saling 1989; Leyton and Saling 1989). Son homologue humain Hu9 a été découvert à partir

d'un ADN complémentaire exprimé uniquement dans les cellules germinales mâles et codant pour une protéine similaire à celle décrite chez la souris (Burks, Carballada et al. 1995). Des anticorps dirigés contre le domaine intracellulaire de ZRK reconnaissent une protéine de 95 kDa chez l'homme. Cette protéine humaine présente une activité kinase quand elle est stimulée par la ZP3. Des peptides de synthèse correspondant au domaine extracellulaire de cette protéine humaine inhibent la liaison entre spermatozoïde et la ZP (Burks, Carballada et al. 1995). Enfin, l'induction de la RA par ZP3 recombinante humaine (ZP3r) est associée à la phosphorylation des résidus tyrosines de cette protéine de 95 kDa (Brewis, Clayton et al. 1998). La protéine ZRK humaine joue un rôle dans le processus de stimulation acrosomique, car les anticorps anti-ZRK inhibent la RA induite par ZP3r. Des études contradictoires ont émis un sérieux doute sur l'existence réelle de la protéine Hu9 au niveau des spermatozoïdes. Ils ont montrés en se basant sur la séquence génomique de la protéine Hu 9 de l'équipe de Burk que cette séquence présente une très forte homologie avec une protéine humaine la proto-oncogène *c-mer* ((Bork 1996; Tsai and Silver 1996)). Ces études contradictoires ont ainsi établi que la protéine Hu 9 n'existait pas. Aucune étude depuis n'a été réalisée afin d'éclaircir cette controverse.

II. La réaction acrosomique

L'étude de la réaction acrosomique par microscopie électronique a permis l'identification des différentes étapes de la réaction acrosomique (Figure 28). Le contenu acrosomique devient diffus ; succèdent alors :

- De multiples points de fusion entre les membranes acrosomique externes et plasmiques au niveau de la région antérieure de la tête.
- La vésiculation de la membrane acrosomale.
- Et enfin l'exposition du contenu acrosomique et de la membrane acrosomique interne (figure x) (Breitbart and Spungin 1997; Wassarman 1999; Tomes 2007).



Figure 28 : Photos de coupes sagittales de la tête de spermatozoïde de souris en microscopie électronique à transmission représentant les étapes morphologiques de la réaction acrosomique. À gauche : le spermatozoïde présente un acrosome intact. Au centre : stade précoce de la réaction acrosomique, présence de multitudes de points de fusion entre les membranes acrosomales internes et externes. À droite l'exocytose de l'acrosome est en cours : la fusion des membranes a eu lieu, générant des vésicules acrosomales (Tomes 2007).

III. Mécanisme moléculaire de la réaction acrosomique

L'exocytose de l'acrosome est un processus très régulé, composé de plusieurs étapes. Les protéines SNAREs jouent un rôle primordial dans l'exocytose de l'acrosome. Elles constituent des étiquettes qui permettent la reconnaissance mutuelle et le déclenchement de la fusion entre la vésicule acrosomale et la membrane plasmique du spermatozoïde.

1. Les protéines SNAREs

Les premières protéines SNAREs (« Soluble NSF Attachment protein REceptors ») identifiées furent celles de la famille des VAMP (« Vesicle Associated Membrane Proteins ») ou synaptobrévines découvertes dans les vésicules synaptiques (Trimble, Cowan et al. 1988; Baumert, Maycox et al. 1989), ensuite la famille des SNAP-25 (« SyNaptosome-Associated Protein of 25kD ») (Oyler, Higgins et al. 1989), et la syntaxine 1 trouvée associée à la membrane plasmique des terminaisons synaptiques des neurones de mammifères avec les canaux calciques (Bennett, Calakos et al. 1992). Depuis 1998, 25 SNAREs ont été trouvés chez la levure, 36 chez l'homme et 54 chez *Arabidopsis*, associées aux divers compartiments cellulaires (Duman and Forte 2003; Weimbs, Low et al. 2003; Hong 2005; Jahn and Scheller 2006).

La famille des SNAREs est caractérisée par la présence d'un domaine SNARE de 60-70 acides aminés formant des heptades répétées adoptant une structure en hélice. D'autre part, la plupart des SNAREs présentent soit un domaine C-terminal transmembranaire, soit des résidus palmitoylés (cas de SNAP-25) ou encore une « boîte » CAAX permettant leur farnésylation et ainsi leur ancrage membranaire (McNew, Sogaard et al. 1997).

Lorsque les SNAREs sont sous forme monomérique, elles ne sont pas structurées. C'est la rencontre avec des partenaires définis (Rabs, NSF, α -SNAP et des facteurs d'arrimage) qui permet l'association de leurs motifs en structures hélicoïdales très stables (Fasshauer, Antonin et al. 2002; Fasshauer 2003) formées de quatre hélices α fournies par les motifs SNARE de chaque partenaire du complexe. Chaque complexe implique 4 types d'hélices : Qa, Qb, Qc et R, qui définissent des familles de SNAREs très conservées (Bock, Matern et al. 2001; Hong 2005). Les SNAREs sont associées à des compartiments spécifiques. Elles participent à la mise en place de cette compartimentation et à la régulation des échanges vésiculaires en contrôlant la fusion des vésicules avec leurs compartiments cibles. L'association préférentielle de certaines synaptobrevines avec des syntaxines données, détermine la spécificité de la fusion.

Les complexes SNAREs présents au niveau des membranes acrosomiques et plasmiques du spermatozoïde sont constitués de quatre protéines : la syntaxine 1, la SNAP-25 (25 kDa synaptosome associated protéine), la synaptobrevine et la synaptotagmine VI (Figure 29).

La syntaxine I (35 kDa) est une protéine membranaire de type II, localisée essentiellement dans la membrane plasmique. Elle comporte une région N-terminale orientée vers le cytoplasme (résidus 1-120), contenant trois motifs distincts en hélice, impliquée dans la régulation de l'assemblage du complexe SNARE (Bennett, Calakos et al. 1992; Walch-Solimena, Blasi et al. 1995; Tmes, Michaut et al. 2002; De Blas, Roggero et al. 2005; Darios, Connell et al. 2007; Davletov, Connell et al. 2007; Tmes 2007). Le motif qui assure la liaison des deux partenaires (SNAP-25 et synaptobrevine) est contenu dans une région plus centrale (résidus 180-262) également structurée en hélice. Enfin, le segment transmembranaire est très proche de l'extrémité C-terminale, laissant quelques résidus dans le milieu extracellulaire. La Syntaxine I est présente au niveau de la membrane plasmique dans une conformation fermée avec sa région amino-terminale cytoplasmique repliée contre son domaine central. C'est l'intervention de protéines régulatrices et d'acides gras (Darios,

Connell et al. 2007; Davletov, Connell et al. 2007) qui lui permet l'acquisition d'une conformation ouverte, permissive à la liaison de la SNAP-25 et finalement la mise en place du complexe (Figure 30).

La SNAP-25 (25 kDa) ne possède aucune région transmembranaire. Elle est ancrée dans la membrane plasmique par l'intermédiaire de la palmitoylation des résidus cystéine localisés au milieu de la chaîne polypeptidique, et orientée vers le cytoplasme. La SNAP-25 renferme deux motifs d'interaction avec les autres SNAREs, séparés par la boucle d'ancrage palmitoylée (Oyler, Higgins et al. 1989; Walch-Solimena, Blasi et al. 1995; Sutton, Fasshauer et al. 1998; Tames, Michaut et al. 2002; Darios, Connell et al. 2007; Davletov, Connell et al. 2007; Tames 2007).

La synaptobrévine (13 kDa) est une protéine membranaire des vésicules de sécrétion (Chin and Goldman 1992). La partie N-terminale (résidus 1-33) est variable entre les différentes isoformes, à la différence de la région centrale (résidus 33-96) impliquée dans la formation du complexe SNARE. Le segment transmembranaire est localisé à l'extrémité C-terminale. (Chin and Goldman 1992; De Blas, Michaut et al. 2002; Tames, Michaut et al. 2002; De Blas, Roggero et al. 2005; Hong 2005; Tames 2007).

La synaptotagmine VI est une protéine senseur de calcium. Elle est située au niveau de la membrane de l'acrosome. Elle possède deux domaines C2 (C2A et C2B) (Tames 2007) pouvant lier les lipides et le calcium, mais elle peut également interagir avec le complexe SNARE, les canaux calciques et la calmoduline (Chapman, Hanson et al. 1995; De Blas, Michaut et al. 2002; De Blas, Roggero et al. 2005; Davies and Zamponi 2008). De part ces nombreuses interactions, la synaptotagmine permet de mettre en place une plateforme fonctionnelle regroupant les acteurs indispensables au bon déroulement de l'exocytose.

Au niveau du spermatozoïde les facteurs de régulation du complexe SNARE sont la NSF, l' α -SNAP et Rab3. Elles vont permettre d'une part l'association des protéines SNAREs en configuration *trans* active (Fasshauer, Antonin et al. 2002; Fasshauer 2003), et d'autre part le recyclage des protéines SNAREs après leur participation à la fusion membranaire.

La NSF (*N-ethylmaleimidesensitive factor*) est une protéine chaperone ATP dépendante. Elle va permettre le recyclage des SNAREs après la fusion membranaire. C'est un hexamère de sous-unités identiques de 752 résidus (Block, Glick et al. 1988; Whiteheart, Griff et al. 1993).

Chaque sous-unité de NSF comporte 3 domaines :

- Un domaine N (N-terminal) qui assure les interactions entre la NSF, les protéines SNAPs et les protéines SNAREs (Zhao, Slevin et al. 2007).
- Un domaine D1 qui lie l'ATP et catalyse son hydrolyse, processus qui fournit l'énergie pour la dissociation du complexe SNARE (Zhao, Slevin et al. 2007).
- Un domaine D2 (C-terminal) homologue à D1. Ce domaine est capable de lier l'ATP avec une affinité très supérieure à D1, mais ne l'hydrolyse que très lentement, voir pas du tout. D2 assure l'hexamérisation de la NSF indispensable à son activité (Zhao, Slevin et al. 2007).

L' α -SNAP est une protéine soluble (*NSF adaptor proteins*) de 1.8 kDa. C'est une protéine adaptatrice permettant la liaison de la NSF aux protéines SNAREs membranaires (Sollner, Whiteheart et al. 1993; Whiteheart, Griff et al. 1993; Bock, Matern et al. 2001).

Les protéines Rab3 sont des petites GTPases. Ce sont des protéines qui basculent entre deux états : lié au GTP (actif) et lié au GDP (inactif) (Zerial and McBride 2001). Elles sont associées à la membrane grâce à l'ajout d'acides gras. Il s'agit de deux acides géranyliques ajoutés par la géranylgéranyltransférase II sur deux résidus cystéine spécifiques de la partie hypervariable de leur queue C-terminale. Cette modification est essentielle à l'ancrage membranaire, tandis que la partie hypervariable est spécifique d'un type de membrane (Chavrier, Gorvel et al. 1991; Brennwald and Novick 1993; Novick and Brennwald 1993). Les Rabs (liées au GTP) permettent le recrutement de facteurs d'arrimage (Gonzalez and Scheller 1999; Pfeffer 1999; Waters and Hughson 2000; Zerial and McBride 2001; Tomes, Michaut et al. 2002; Tomes 2007). Ces derniers rapprochent les membranes vésiculaires et les membranes cibles, favorisant l'interaction entre les protéines SNAREs vésiculaires (v-SNAREs) et les protéines SNAREs de la membrane cible (t-SNAREs) (De Blas, Michaut et al. 2002; De Blas, Roggero et al. 2005; Tomes 2007).

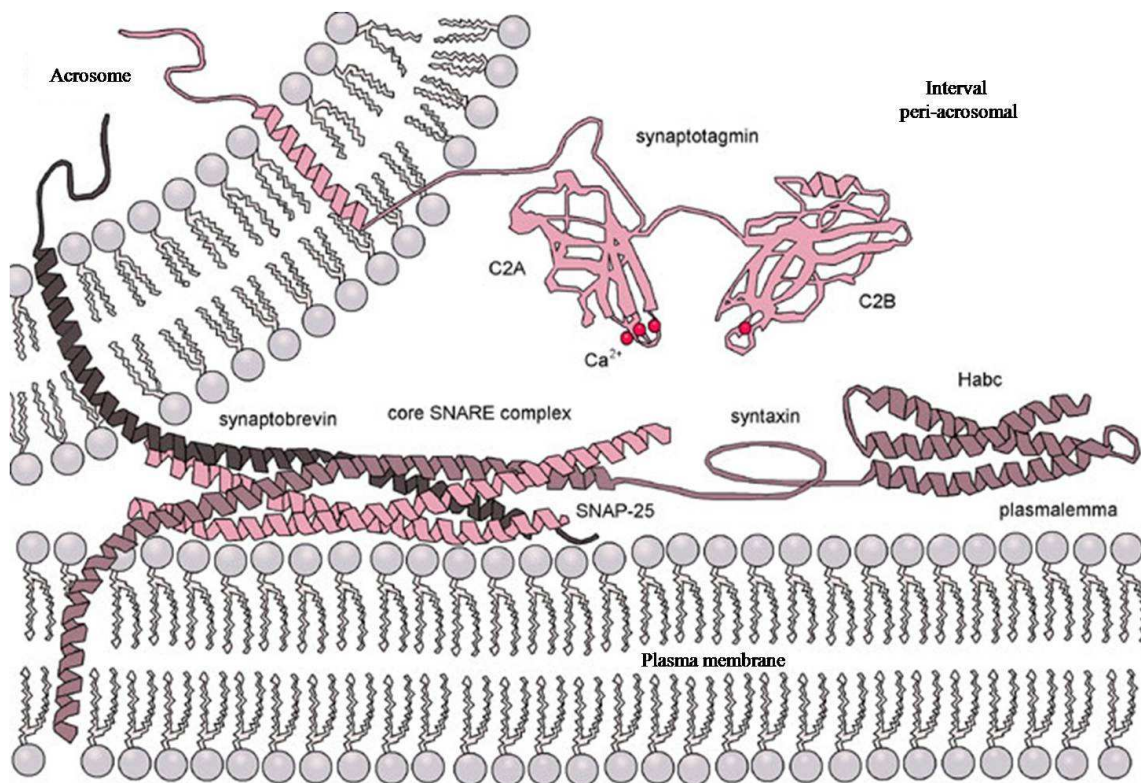


Figure 29 : Représentation schématique du complexe SNARE présent au niveau des membranes acrosomiques et plasmiques du spermatozoïde. Le complexe SNARE est formé par l'association des quatre hélices α de la synaptobrevine, la syntaxine I et la SNAP-25. La synaptotagmine VI sert de senseur de calcium et régule le « zippering » du complexe SNARE.

➤ *Modèle de fusion membranaire par les protéines SNAREs*

Un modèle de fusion membranaire a découlé de l'étude des protéines SNAREs (Trimble, Cowan et al. 1988; Baumert, Maycox et al. 1989; Chin and Goldman 1992; Sollner, Whiteheart et al. 1993; Walch-Solimena, Blasi et al. 1995; Sutton, Fasshauer et al. 1998; Pfeffer 1999; Duman and Forte 2003; Fasshauer 2003; De Blas, Roggero et al. 2005; Hong 2005; Jahn and Scheller 2006; Davletov, Connell et al. 2007; Zhao, Slevin et al. 2007).

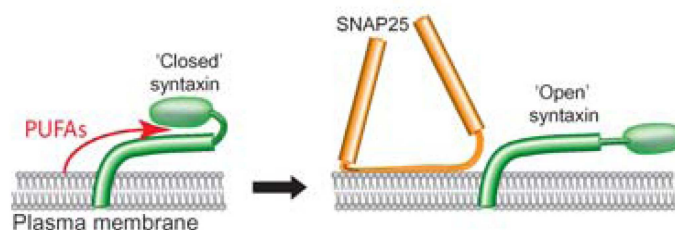


Figure 30 : Représentation schématique de l'action des acides gras sur la syntaxine I. La syntaxine I se trouve dans une conformation fermée avec sa région amino-terminale cytoplasmique repliée contre son domaine central. Les Acides gras induisent un changement de conformation de la syntaxine I, qui lui permet l'acquisition d'une conformation ouverte, permissive à la liaison de la SNAP-25 (Darios, Connell et al. 2007).

Initialement, la syntaxine I se trouve dans une conformation fermée avec sa région aminoterminale cytoplasmique repliée contre son domaine central. L'intervention de protéines régulatrices et d'acides gras favorise l'acquisition d'une conformation ouverte, permissive à la liaison de la SNAP-25 (Figure 30).

L'assemblage du complexe SNARE débute dans les régions N-terminales du faisceau et progresse spontanément en fermeture éclair « Zippering » vers les régions carboxy-terminales transmembranaires (Hanson, Roth et al. 1997).

Plusieurs complexes SNAREs sont disposés en cercle à l'interface entre la vésicule acrosomique et la membrane plasmique. Les complexes SNARE vont rapprocher la membrane acrosomique vers la membrane plasmique pour induire un réarrangement des deux bicouches opposées afin de former une seule bicouche entre l'acrosome et le milieu extracellulaire. Un pore de fusion s'ouvre alors dans cette bicouche, et son expansion rapide va conduire à la vésiculation de la membrane acrosomique et à l'exposition du contenu acrosomique et de la membrane acrosomique interne (Figure 31).

Lorsque l'exocytose de la vésicule acrosomique est complète, le complexe SNARE dont l'assemblage débute en configuration *trans* (les protéines SNAREs sont ancrées dans deux bicouches lipidiques différentes : la syntaxine I et la SNAP-25 au niveau de la membrane plasmique et la synaptobrevine et la synaptotagmine au niveau de la membrane acrosomique) se retrouve en configuration *cis* (tous les composants sont ancrés dans le même plan lipidique) (Jahn and Scheller 2006; Sudhof and Rothman 2009).

Avant de réaliser la réaction acrosomique, les complexes SNAREs présents au niveau des membranes acrosomiques et plasmiques du spermatozoïde sont en configuration *cis* inactive (Tomes, Michaut et al. 2002; De Blas, Roggero et al. 2005).

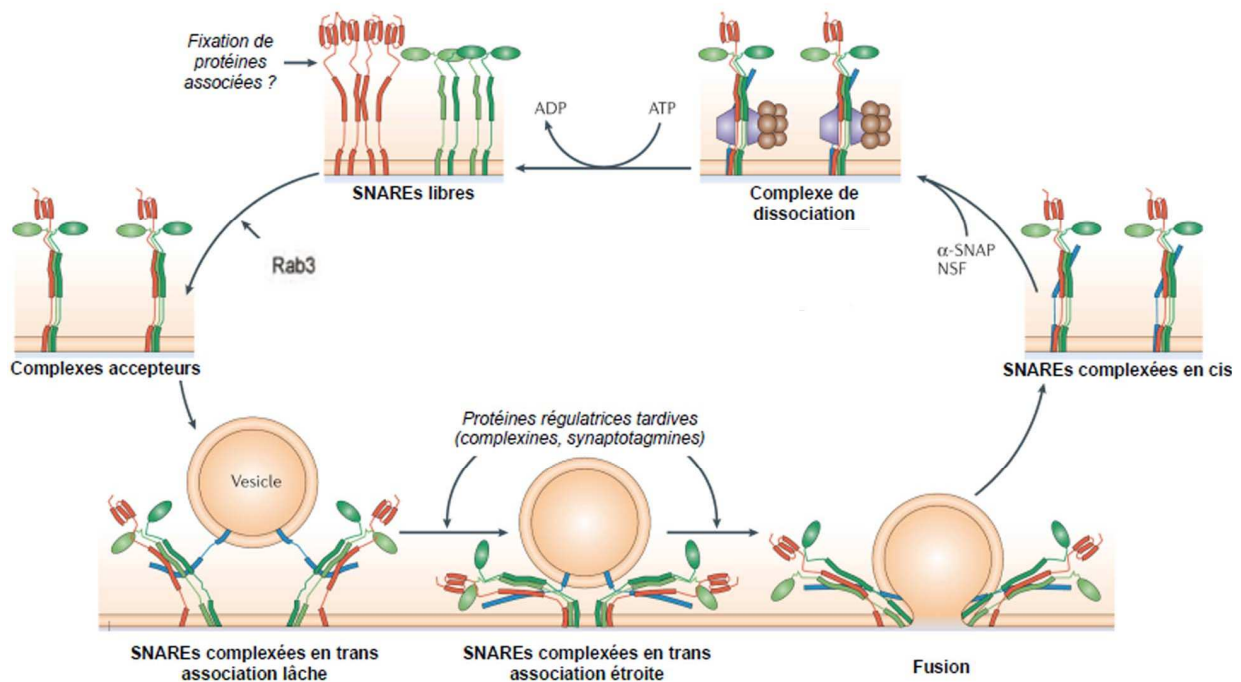


Figure 31: Représentation du cycle de fonctionnement des protéines SNAREs. Les trois hélices α de la syntaxine (en vert) et SNAP-25 (en rouge) (ancrées dans la membrane plasmique) s'assemblent avec l'hélice α de la synaptobrevine (en bleu) (ancrée dans la membrane vésiculaire). Les SNAREs sont alors complexées en configuration *trans* lâche. L'arrivée de la synaptotagmine (protéine régulatrice) au niveau du complexe SNARE induit un resserrage de la configuration *trans*. Cela génère une force vers l'intérieur qui tire les membranes ensemble, les forçant à fusionner. Lorsque la fusion a eu lieu, la force disparaît et les SNAREs se retrouvent complexées en configuration *Cis*. Les protéines NSF et α -SNAP vont dissocier le complexe, pour permettre un nouveau cycle. Modifié de (Jahn and Scheller 2006).

2. La réaction acrosomique est contrôlée par une signalisation biphasique de calcium

Comme toutes les exocytoses, la réaction acrosomique est sous le contrôle d'une augmentation biphasique de la concentration cytosolique en calcium. Dans le spermatozoïde, le calcium nécessaire à cette réaction d'exocytose provient de deux sources, du milieu extracellulaire et du stock calcique interne (acrosome). Les influx de calcium sont contrôlés par des canaux calciques. La reconnaissance de ZP3 par les récepteurs spécifiques spermatiques situés au niveau de la tête du spermatozoïde est l'élément déclencheur de cette signalisation calcique biphasique.

La réaction acrosomique est rythmée par l'ouverture successive de différents canaux calciques (Figure 32):

1) La fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide provoque l'ouverture d'un canal cationique peu sélectif qui entraîne une dépolarisation de la membrane. La caractérisation de ces canaux n'est pas encore réalisée. Cette dépolarisation déclenche l'activation de canaux calciques dépendants du voltage (Arnoult, Cardullo et al. 1996) situés au niveau de la membrane. Le canal calcique de type T joue un rôle primordial dans la signalisation calcique du spermatozoïde, car il est le premier canal à être activé, son inhibition éteint toute signalisation calcique ultérieure et bloque la réaction acrosomique. Les propriétés biophysiques et pharmacologiques de ces canaux se sont révélées différentes par rapport à celles des cellules somatiques suggérant une diversité moléculaire de ces canaux de type T (Arnoult, Villaz et al. 1998). Au laboratoire, à partir de souris déficientes en différents types de canaux calciques à bas seuil d'activation, il a été montré que ces canaux étaient de type CaV3.2 (stamboulia, et al 2005, Escoffier et al, 2007).

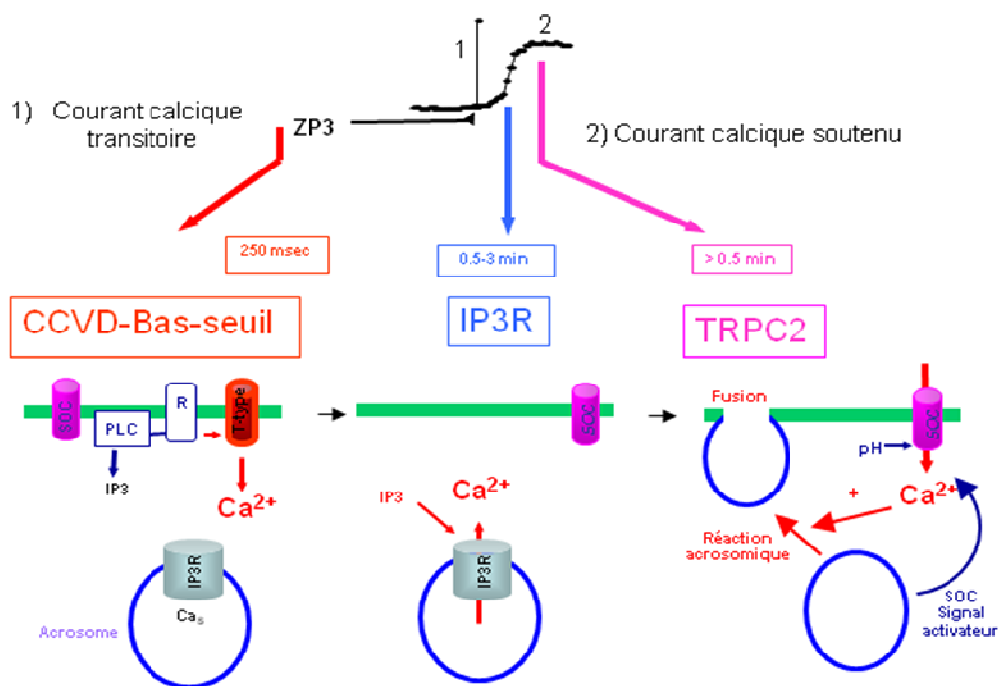


Figure 32 : Représentation schématique de la signalisation calcique biphasique au cours de la réaction acrosomique. Modifiée de (O'Toole, Arnoult et al. 2000). La fixation de ZP3 provoque un influx transitoire de Ca²⁺ qui correspond à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage de type T. L'augmentation soutenue de la concentration calcique qui suit correspond à l'ouverture du récepteur à l'IP3 puis des canaux SOC.

2) Ensuite le récepteur à l'IP3 s'active et permet une libération massive de calcium à partir de l'acrosome qui joue ici le rôle de stock calcique intracellulaire joué habituellement par le réticulum endoplasmique.

3) Cette libération de calcium déclenche l'activation de canaux SOCs sensibles au niveau de remplissage des stocks calciques intracellulaires. Ces canaux sont situés au niveau de la membrane plasmique et permettent une entrée massive de calcium à partir de l'extérieur de la cellule. Ils sont de types TRPC2 (Jungnickel, Marrero et al. 2001)

L'influx transitoire de calcium qui correspond à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage de type T:

- Va activer la protéine Rab3 (recrutement de facteurs d'arrimage), permettant d'initier l'arrimage de la vésicule acrosomique avec la membrane plasmique.

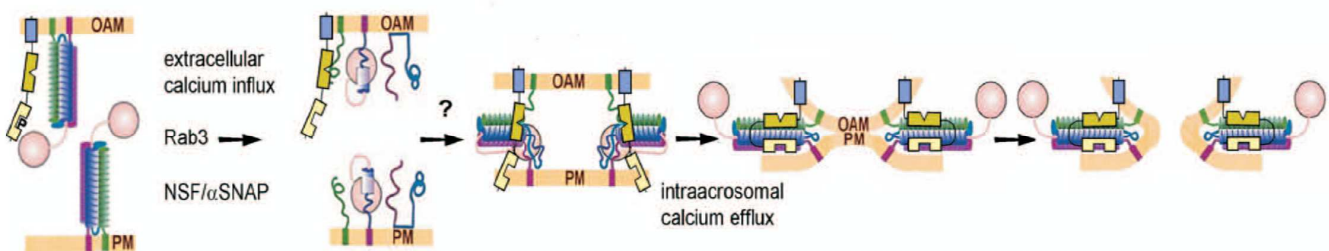


Figure 33: Représentation schématique du mécanisme moléculaire de la réaction acrosomique. Avant de réaliser la réaction acrosomique (à gauche), la synaptotagmine est phosphorylée et les protéines SNAREs sont engagées dans la configuration *cis*. Toutes les protéines sont « inactives ». L'entrée de calcium extracellulaire permet l'activation des protéines Rab3, NSF et α -SNAP. Il en résulte la déphosphorylation de la synaptotagmine et la dissociation du complexe SNARE (deuxième à partir de la gauche). Le complexe SNARE va ensuite se rassembler en une configuration *trans* active (troisième en partant de la gauche). Le deuxième influx calcique, provenant de l'acrosome, va permettre l'activation de la synaptotagmine et le « zippering » du complexe SNARE (quatrième en partant de la gauche). Le zippering des SNAREs va générer une force d'invagination des membranes qui permet la formation des pores de fusion (à droite). La Synaptobrevine est représentée en vert, la syntaxine est représentée en rose (domaine Habc amino-terminale) et violette (motif SNARE et domaine transmembranaire), la SNAP-25 en bleu. La synaptotagmine en bleu (domaine transmembranaire), en vert (domaine C2A) et en jaune (domaine C2B). OAM, membrane externe acrosomale ; PM, membrane plasmique (De Blas, Roggero et al. 2005).

- Va aussi induire la dissociation des complexes SNAREs de la configuration *cis* inactive par une déphosphorylation de la synaptotagmine et l'activation des protéines

NSF et α -SNAP. L'apport d'énergie produit par les NSF-ATPases va permettre de dissocier le complexe SNARE de sa forme *cis*.

- Les complexes SNAREs vont être alors libres de se réunir en configuration *trans*, ce qui va permettre l'irréversible arrimage de la membrane acrosomique externe à la membrane plasmique. (Tomes 2007)

L'augmentation soutenue de la concentration calcique qui suit correspond à l'ouverture du récepteur à l'IP3 puis des canaux SOCs :

- Va activer la synaptotagmine et permettre de déclencher les dernières étapes de la fusion membranaire (figure 33).

3. La réaction acrosomique est également contrôlée par des messagers lipidiques produits par les phospholipases

Les messagers lipidiques générés par les phospholipases semblent servir comme co-activateurs de la réaction acrosomique. Deux types de messagers ont plus particulièrement été étudiés : les lysophospholipides et les acides gras.

La première étude suggérant l'implication de lysophospholipides comme messagers lipidiques dans le contrôle de la réaction acrosomique a été réalisée par Fleming *et al* 1981. Cette étude montre que le prétraitement des spermatozoïdes de cobaye avec des lysophospholipides, le lysophosphatidylcholine (lysoPC) diminue le temps de capacitation et abouti à une induction rapide de la réaction acrosomique en présence de quelques mM de Ca^{2+} . D'autres études ont par la suite confirmé que les lysoPC déclenchaient la réaction acrosomique des spermatozoïdes de hamster (Ohzu and Yanagimachi 1982; Llanos, Morales et al. 1993) et de taureau (Parrish, Susko-Parrish et al. 1988; Roldan and Frago 1993).

Une autre preuve de l'implication des lysoPC dans les mécanismes de contrôle de la réaction acrosomique provient d'expériences dans lesquelles l'activité des PLA_2 a été bloquée, ce qui se traduit par l'incapacité des spermatozoïdes à réaliser la réaction acrosomique induite par L'A23187 et une inhibition de la libération des lysoPC dans le milieu extracellulaire. L'ajout de lysoPC extracellulaire a permis de restaurer la capacité des spermatozoïdes de bœuf à réaliser la réaction acrosomique (Roldan and Frago 1993; Garde and Roldan 1996; Garde and Roldan 2000) ou d'hamster (Llanos, Morales et al. 1993).

Il est intéressant de noter que tous les lysophospholipides n'ont pas un rôle activateur de la réaction acrosomique. Ainsi, les lysoPC et les lysophosphatidylinositol (lysoPI) sont capables de déclencher la réaction acrosomique, alors que les lysophosphatidylsérines (lysoPS) n'en

sont pas capables (Llanos, Morales et al. 1993; Roldan and Fragio 1993). En faite, les lysoPS semblent avoir un rôle inhibiteur de la réaction acrosomique dans certaines conditions (Llanos, Morales et al. 1993).

Les premiers travaux suggérant l'implication des acides gras comme messagers lipidiques dans le contrôle de la réaction acrosomique ont été réalisés par Meizel *et al.* 1983. Cette étude a permis de montrer que certains acides gras *Cis*-insaturés tels que l'acide oléique, l'acide arachidonique et l'acide vaccénique induisaient la réaction acrosomique des spermatozoïdes capacités de hamster (Meizel and Turner 1983). D'autres études ont par la suite confirmé l'implication de l'acide arachidonique dans le contrôle de la réaction acrosomique par des expériences d'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique (Meizel and Turner 1984; Joyce, Nuzzo et al. 1987; Lax, Grossman et al. 1990). Ces études ont permis de mettre en évidence que, bien que l'acide arachidonique soit une molécule fusiogène (Pollard, Burns et al. 1988), il induirait la réaction acrosomique des spermatozoïdes de hamster par le biais de ses dérivés métaboliques. En effet, la réaction acrosomique induite par l'acide arachidonique est partiellement ou voir totalement bloquée par les inhibiteurs du métabolisme de l'acide arachidonique tel que le Phenidone ou l'acide nordihydroguaiaretique (Meizel and Turner 1984). Ces résultats devront être réévalués, car les niveaux d'acide arachidonique ou des métabolites générés par la voie métabolique n'ont pas été mesurés. Des études plus récentes ont également montré que l'acide arachidonique est en mesure d'améliorer le pourcentage de réaction acrosomique des spermatozoïdes de bélien en réponse à l'A23187 (Roldan and Fragio 1993).

➤ ***Les phospholipases sont les générateurs des messagers lipidiques spermatiques***

Les phospholipases sont des enzymes hydrolysant les liaisons ester des phospholipides. Elles générèrent différents messagers lipidiques dont certains sont impliqués dans la physiologie spermatique comme la réaction acrosomique ou la mobilité flagellaire. Il existe quatre liaisons ester dans un phospholipide, on distingue donc plusieurs enzymes selon leur site d'action sur la molécule (Figure 34).

La phospholipase A₁ enlève l'acide gras lié à la fonction alcool primaire du glycérol, libérant un acide gras et un lysophospholipide.

La phospholipase A₂ enlève l'acide gras lié à la fonction alcool secondaire du glycérol, libérant un acide gras et un lysophospholipide.

La phospholipase C intervient sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate, libérant un diacylglycéride et un inositol triphosphate.

La phospholipase D lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un acide phosphatidique (PA) et un alcool.

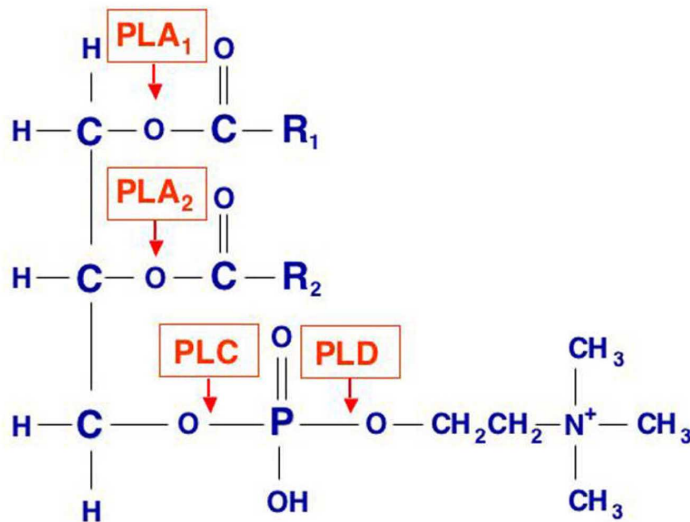


Figure 34 : Représentation schématique de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par les phospholipases A₁, A₂, C et D. R1 et R2 sont les chaînes longues d'acides gras, généralement saturées en R1 et non saturées en R2 (Roldan and Shi 2007).

Au niveau des spermatozoïdes matures, on retrouve les phospholipases de type C (PLC), les phospholipases de type D (PLD) et les phospholipases de type A₂ (PLA₂).

La phospholipase C, *in vivo*, catalysent l'hydrolyse du phosphatidylinositol diphosphate membranaire (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1-4-5-triphosphate (IP₃). Il existe plusieurs types de phospholipase C

- La phospholipase C-β, qui est activée par les récepteurs couplés aux protéines G.
- La phospholipase C-γ, qui est activée par des récepteurs à activité tyrosine kinase.
- La phospholipase C-δ, qui est activée par l'IP₃.
- La phospholipase C-ζ, qui est activée comme la phospholipase C-δ par l'IP₃.

Comme tous les messagers secondaires, le DAG et l'IP₃ (produit par la PLC) sont rapidement dégradés en métabolites inactifs au sein de la cellule. Le DAG a plusieurs molécules cibles : parmi les cibles connues, on retrouve la protéine kinase C, qui, comme la protéine kinase A (PKA), phosphoryle spécifiquement des protéines sur les résidus sérine et/ou thréonine ou certains canaux de la famille des TRPC (Lucas, Ukhanov et al. 2003). La molécule cible de l'IP₃ est un canal calcique, « le récepteur à l'IP₃ ». On sait depuis 1990 que l'IP₃ et le DAG sont impliqués dans la réaction acrosomique. En effet, lors de réactions acrosomiques induites par l'ionophore calcique A23187, les concentrations intracellulaires de DAG et d'IP₃

augmentent dans les spermatozoïdes de bélier (Harrison, Roldan et al. 1990; Roldan and Murase 1994) ou de verrat (Vazquez and Roldan 1997), à la suite d'une stimulation d'une phospholipase C (Roldan and Murase 1994). Différents types de phospholipases C pourraient être impliquées dans cette activité. L'étude menée par Tomes *et al* 1996 a démontré l'existence d'une PLC γ 1 dans les spermatozoïdes de souris (Tomes, McMaster et al. 1996), soulignant également que l'activité de cette enzyme était dépendante d'une activité tyrosine kinase. Une PLC β 1 a également été identifiée dans la région acrosomique des spermatozoïdes de mammifères (Walensky and Snyder 1995). L'étude menée par Heytens a montré la présence d'une phospholipase C : la PLC ζ au niveau de la région équatoriale de la tête dans les spermatozoïdes humains par immunohistochimie et western blot (Yoon, Jellerette et al. 2008; Heytens, Parrington et al. 2009). Cette phospholipase est impliquée dans les vagues calciques indispensables à l'activation ovocytaire (Parrington, Swann et al. 1996; Parrington, Jones et al. 1999; Parrington, Jones et al. 2002; Saunders, Larman et al. 2002; Yoon, Jellerette et al. 2008) et sa perte induit une infertilité masculine (Yoon, Jellerette et al. 2008; Heytens, Parrington et al. 2009).

La phospholipase D hydrolyse les phospholipides en libérant un acide phosphatidique (PA) et un alcool. L'implication de la phospholipase D dans la réaction acrosomique a été étudiée par Garbi *et al.* 2000 à l'aide de techniques d'immunohistochimie et de western blot. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de la PLD de type 1 au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes de bovins et l'activation de la PLD1 par la protéine kinase C (PKC). Son activation va lui permettre de se transloquer de l'acrosome vers la membrane acrosomique externe (Garbi, Rubinstein et al. 2000). Sur la base de ces résultats, il a été supposé que la PLD activée par la PKC serait transportée au niveau de la membrane acrosomique externe, où l'enzyme active pourrait générer l'acide phosphatidique (PA) qui aidera à l'induction de la réaction acrosomique. Aucun autre élément de preuve de la participation de la PLD dans des événements sous-jacents la réaction acrosomique n'a été présenté jusqu'à présent (Roldan and Shi 2007).

Les phospholipases A₂ (PLA₂) sont des enzymes qui hydrolysent la liaison ester des phospholipides membranaires en position *sn*-2, produisant ainsi des lysophospholipides et des acides gras libres. Ce clivage des phospholipides est à l'origine de la synthèse des médiateurs lipidiques. Ces enzymes sont classées en trois sous-groupes selon leur localisation, leur poids

moléculaire et leur sensibilité au calcium (Ca^{2+}) nécessaire à leur activité catalytique (Dennis 1997; Schaloske and Dennis 2006) :

- Les PLA_2 Ca^{2+} dépendantes cytosoliques ($c\text{PLA}_2$). Ce sont des enzymes de haut poids moléculaire (85 kDa) nommées ainsi de par leur localisation principalement cytosolique. Ce sous-groupe de PLA_2 comprend trois membres : les $c\text{PLA}_2$ α , β et γ également appelées respectivement $c\text{PLA}_2$ -IVA, -IVB et -IVC (Brown, Chambers et al. 2003).
- Les PLA_2 Ca^{2+} indépendantes ($i\text{PLA}_2$). Elles comprennent uniquement deux membres : la $i\text{PLA}_2\beta$ (VIA) et la $i\text{PLA}_2\gamma$ (VIB) (Bingham, Fijneman et al. 1999). Ce sont des enzymes ayant un poids moléculaire de 85-88 KDa.
- Les PLA_2 Ca^{2+} dépendantes sécrétées ($s\text{PLA}_2$). Elles ont été initialement découvertes dans les venins d'abeilles et de serpents (Davidson and Dennis 1990). Ces $s\text{PLA}_2$ sont considérées comme myotoxiques et neurotoxiques puisque leur administration entraîne une nécrose rapide des fibres musculaires squelettiques ainsi que des dommages nerveux importants (Kini and Evans 1989). Chez les mammifères, les $s\text{PLA}_2$ représentent le sous-groupe de PLA_2 le plus volumineux, comprenant dix enzymes ou isoformes différentes : $s\text{PLA}_2$ -IB, -IIA, -IIC, -IID, -IIE, -IIF, -III, -V, -X et -XII. Le profil d'expression de ces différentes $s\text{PLA}_2$ varie énormément d'une cellule à l'autre. Cependant, elles partagent certaines caractéristiques communes soit un faible poids moléculaire (14 à 19 kDa), un contenu important en ponts disulfures et le besoin de Ca^{2+} (concentration de l'ordre du millimolaire) pour soutenir leur activité catalytique. Ces enzymes sont exprimées et emmagasinées à l'intérieur des cellules. Suite à une activation appropriée de ces dernières, les $s\text{PLA}_2$ sont habituellement sécrétées dans le milieu extracellulaire, mais peuvent également rester dans des vésicules cytoplasmiques ou être associées aux membranes de différents organelles (Dennis 1997; Bingham, Fijneman et al. 1999).

Il y a, malheureusement, peu d'informations sur le rôle des PLA_2 au niveau des spermatozoïdes de mammifères, mais certaines études récentes ont commencé à faire la lumière sur cette question.

Les premières études montrant l'implication des phospholipases A₂ dans le mécanisme de la réaction acrosomique ont été faites à partir d'inhibiteurs des PLA₂. Ces études montrent que le traitement des spermatozoïdes de bœuf (Roldan and Frago 1993 ; Garde and Roldan 1996), d'hamster (Lui and Meizel 1979; Ono, R. Yanagimachi et al. 1982 ; Llanos, Morales et al. 1993), de cochon d'Inde (Singleton and Killian 1983) et d'humain (Fry, Ghosh et al. 1992) par des inhibiteurs de PLA₂ tels que le Rho 31-4493, la quinacrine dihydrochloride, le p-bromophenacyl-bromide, le PBx et la mepacrine diminuent le pourcentage de réaction acrosomique qu'elle soit spontanée ou induite par le ionophore calcique A23187.

La diminution du taux de réaction acrosomique par l'inhibiteur de PLA₂ peut être restaurée par l'addition de lysoPC et d'acide arachidonique (Llanos, Morales et al. 1993; Garde and Roldan 1996). Ces résultats fournissent des preuves solides pour penser que les PLA₂ peuvent avoir un rôle essentiel dans le mécanisme de la réaction acrosomique. Une autre preuve de l'implication des phospholipases A₂ dans le mécanisme de la réaction acrosomique a été établie par l'équipe de Rizzo en 1996. Cette équipe a montré que le traitement des spermatozoïdes de hamster par un anticorps dirigé contre la phospholipase A₂ sécrétée IB a inhibé la réaction acrosomique spontanée (Rizzo and Parraga 1996).

Des efforts ont été ensuite principalement faits sur la caractérisation biochimique des PLA₂ dans les spermatozoïdes de différentes espèces. Il a été ainsi décrit la présence de phospholipases A₂ sécrétées IID, IIC, V, X et IIF au niveau des spermatozoïdes de souris par la technique de Western Blot (Masuda, Murakami et al. 2004), mais leurs fonctions particulières dans la réaction acrosomique reste à l'heure actuelle à être déterminée. Aucune PLA₂ n'a été aujourd'hui découverte au niveau des spermatozoïdes.

Il a aussi été décrit la présence de l'ïPLA₂ de type VIA au niveau des spermatozoïdes de souris par la technique de Western Blot (Bao, Miller et al. 2004). Cette ïPLA₂ semble jouer un rôle important dans la physiologie spermatique. En effet des travaux effectués à partir d'animaux, dont le gène de la ïPLA₂ VIA a été invalidé montre que l'absence de l'ïPLA₂ VIA induit une diminution de la mobilité spermatique et une réduction notable du taux de fécondation (Bao, Miller et al. 2004).

Les diverses études montrant l'implication des messagers lipidiques et des phospholipases dans le mécanisme de contrôle de la réaction acrosomique ont permis d'établir un modèle de

voie de régulation lipidique de la réaction acrosomique chez la souris (Figure 35) (Baldi, Luconi et al. 2000).

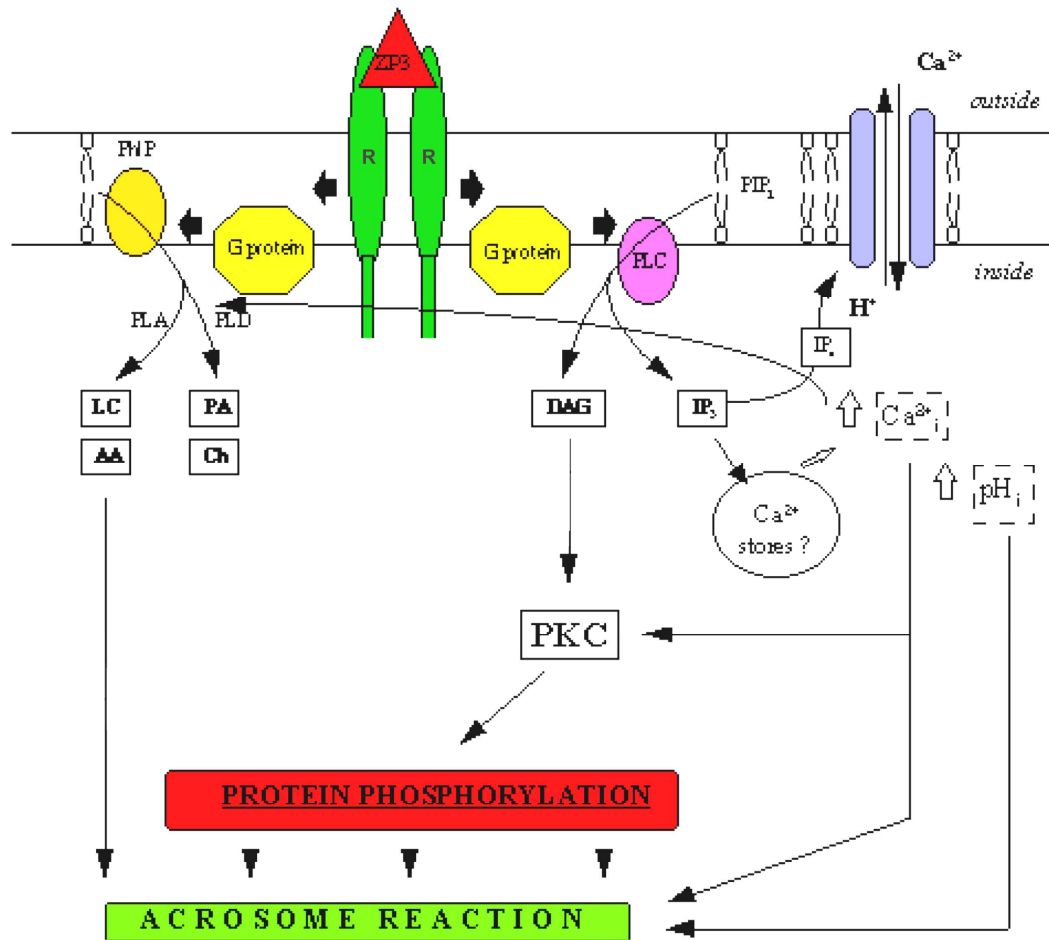


Figure 35 : Représentation schématique du contrôle lipidique du mécanisme de la réaction acrosomique des spermatozoïdes de souris. (Modifié de (Baldi, Luconi et al. 2000)).

L'interaction de ZP3, avec son récepteur spermatique va induire son autophosphorylation qui résulte en l'activation des protéines G. Les protéines G vont ainsi pouvoir activer les phospholipases C. Les phospholipases C actives vont catalyser l'hydrolyse du phosphatidylinositol diphosphate membranaire (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1-4-5-triphosphate (IP₃). L'augmentation intracellulaire du DAG va induire l'activation de la protéine kinase C qui résultent en la phosphorylation de diverses protéines et induit la réaction acrosomique. L'augmentation intracellulaire d'IP₃ va activer le récepteur à l'IP₃ et permettre une libération massive de calcium de l'acrosome (stock calcique). Les phospholipases A₂ et D présentes au niveau du spermatozoïde, vont être activées par l'augmentation intracellulaire de calcium et par les protéines G. Elles vont permettre la production de lysophospholipides et

d'acide gras à partir des phospholipides membranaires. Les lysophospholipides et les acides gras produits vont induire la réaction acrosomique.

Nous l'avons vu, la réaction acrosomique est finement régulée dans l'espace et le temps par différents modes de régulation tels que le calcium, les protéines SNAREs, les phospholipases, les messagers lipidiques. À l'heure actuelle, tous les mécanismes de contrôle de la réaction acrosomique ne sont pas encore élucidés. Les spermatozoïdes qui ont réalisé leur réaction acrosomique restent attachés à la ZP2 pour faciliter leur pénétration de la zone pellucide. La pénétration de la ZP et la fusion avec l'ovocyte sont facilitées par la mobilité spermatique et l'interaction avec différents partenaires protéiques.

Chapitre 4 : Liaison et fusion des spermatozoïdes avec l'ovocyte

I. Pénétration de la zone pellucide

La fusion de la vésicule acrosomale permet le relâchement d'un grand nombre d'enzymes hydrolytiques et protéolytiques responsables de la digestion localisée de la zone pellucide de l'ovocyte : telles que la β -N-acétylglucosaminidase, la hyaluronidase, la phosphatase acide et l'acrosine. Le rôle des enzymes acrosomiques libérées n'est pas totalement connu. On sait que la β -N-acétylglucosaminidase va intervenir dans la perte de la liaison entre le spermatozoïde et l'hétérodimère ZP2-ZP3 et que l'acrosine va rompre localement les pontages entre ZP1, ZP2 et ZP3. La désagrégation de la membrane acrosomiale va permettre aussi la mise à nu de protéines sous membranaires du spermatozoïde jusqu'alors masquées. Ces protéines sous membranaires, telle que la protéine SP-10 en entrant en contact avec des sites complémentaires la zone pellucide permettront la liaison secondaire du spermatozoïde à ZP2 et la pénétration de la zone pellucide. La pénétration de la zone pellucide est facilitée par les actions conjointes de la mobilité spermatique (Ren, Navarro et al. 2001) et d'hydrolyse enzymatique (Wassarman and Litscher 2008).

II. Liaison et fusion des spermatozoïdes avec la membrane ovocytaire

Après avoir traversé la zone pellucide et atteint l'espace péri-vitelline, le spermatozoïde se lie alors à la membrane plasmique ovocytaire au niveau des régions sous-équatoriales et équatoriales de la tête et fusionne avec l'ovocyte en position tangentielle.

La fusion de la membrane acrosomique interne du spermatozoïde avec la membrane plasmique ovocytaire est peu connue, on sait qu'elle fait intervenir différents partenaires protéiques (Figure 36):

- **La fertiline β et la cyritestine** sont des protéines transmembranaires spermatiques. Ce sont des hétérodimères composées de deux sous-unités α et β . chacune de ces sous-unités appartient à la famille des protéines ADAM (contains A Disintegrin And Metalloproteinase domain, c'est-à-dire des protéines qui contiennent un domaine désintégrine et métalloprotéases). La fertiline β et la cyritestine sont capables de se lier à des récepteurs de type intégrine situés au niveau de la membrane ovocytaire. Des tests d'inhibitions par des anticorps ont permis de proposer la fertiline β et la

cyrtestine comme les protéines indispensables à la liaison et la fusion du spermatozoïde à l'ovocyte (McLaughlin, Frayne et al. 2001). Des expériences d'inactivation de gène ont montré que les souris fertiline $\beta^{-/-}$ et cyrtestine $^{-/-}$ (Cho, Bunch et al. 1998; Cho, Ge et al. 2000; Nishimura, Cho et al. 2001) présentaient une diminution de fertilité. La fertiline β et la cyrtestine font parties des éléments clés de la fusion des gamètes.

- Des tests d'inhibitions ont permis de proposer **l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$** comme le récepteur du spermatozoïde sur l'ovocyte (Almeida, Huovila et al. 1995). Mais, la situation est loin d'être aussi simple, car diverses intégrines sont exprimées à la surface de l'ovocyte et leur inhibition avec des anticorps ou des ligands spécifiques inhibent la fécondation. Des souris femelles invalidées pour les intégrines de la famille $\beta 1$, incluant les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αv , ainsi que $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$, sont fertiles (Miller, Georges-Labouesse et al. 2000; He, Brakebusch et al. 2003; Stein, Primakoff et al. 2004). Toutes ces intégrines jouent un rôle dans la fusion des gamètes, mais ne sont pas essentielles pour la fécondation. À l'heure actuelle leur rôle reste à définir.
- Des expériences de gène knock-out suggèrent que la fusion des gamètes de mammifère dépend d'une interaction entre une protéine spermatique et une protéine CD9 de l'ovocyte. **La protéine CD9** appartient à la famille des tétraspamines, elle est constituée de quatre domaines transmembranaires, deux boucles extra-cellulaires et de deux petits domaines cytoplasmiques. La protéine CD9, située au niveau de la membrane plasmique ovocytaire, est associée aux intégrines $\alpha 6 \beta 1$ et aux protéines glycosylphosphatidylinositol (GPI-anchored protéine) (Stein, Go et al. 2006). Les souris femelles dépourvues de CD9 sont stériles (Miyado, Yamada et al. 2000), leurs ovocytes ne permettent pas la fusion membranaire avec la membrane acrosomique interne des spermatozoïdes. La protéine CD9 pourrait être un élément clef de la fusion des gamètes (Miyado, Mekada et al. 2000; Miyado, Yamada et al. 2000).
- Une nouvelle protéine spermatique a été identifiée comme partenaire protéique de la fusion gamétique, il s'agit d'une protéine membranaire, **appelée Izumo**, appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elle est spécifique du spermatozoïde et comporte une petite région extracellulaire. Cependant, à l'inverse des autres membres de la famille, celle-ci ne contient qu'un seul domaine Ig-like, dont on connaît la

capacité de relayer l'adhérence intercellulaire, et permettant un contact plus étroit avec la membrane ovocytaire. Les souris mâles dépourvues d'Izumo sont stériles, les spermatozoïdes se lient à la membrane de l'ovocyte sans pouvoir fusionner. L'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes Izumo^{-/-} permet le développement d'un embryon. Les mécanismes impliqués dans la fusion ne sont pas encore décryptés, mais on peut imaginer qu'Izumo interagisse avec la protéine CD9, directement ou en collaboration avec d'autres protéines (Inoue, Ikawa et al. 2005).

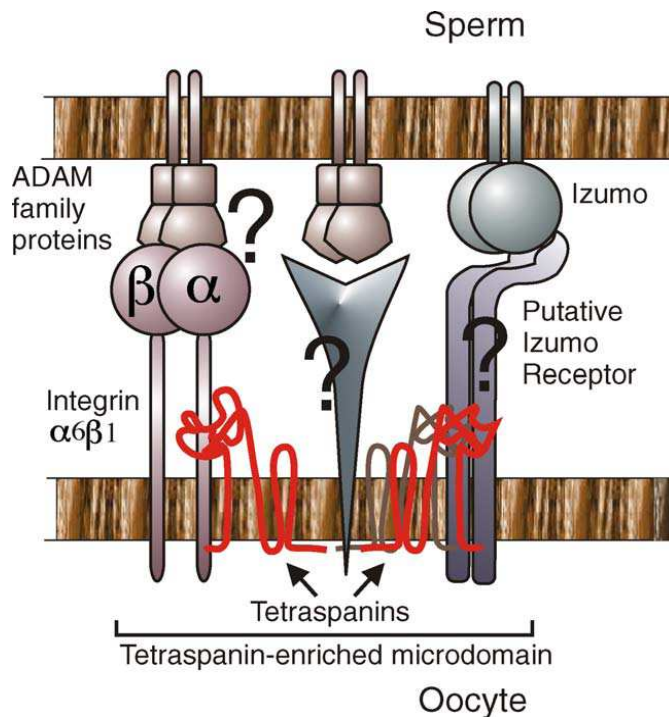


Figure 36 : Représentation schématique des protéines impliquées dans la fusion gamétique des mammifère (Rubinstein, Ziyat et al. 2006).

- Un autre partenaire protéique impliqué dans le mécanisme de fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte a été identifié : les phospholipases A₂. Les premières expériences montrant leurs implications ont été réalisées par l'équipe de Fry *et al* en 1992. Cette équipe a montré que le prétraitement des spermatozoïdes humains avec un inhibiteur de phospholipases A₂, le PGB_x, bloquait leurs capacités de pénétrer les ovocytes de hamster dé-pellucidés (Fry, Ghosh et al. 1992). D'autres études ont par la suite confirmé l'implication des phospholipases A₂ dans la fusion gamétique. En effet l'étude de Riffo *et al.* 1997 a montré que le prétraitement de spermatozoïdes humains avec un anticorps dirigé contre la phospholipase A₂ sécrétée par les spermatozoïdes humains diminue fortement le taux de fécondation *in vitro*. La diminution du taux de fécondation par l'anticorps de PLA₂ sécrétée par les spermatozoïdes humains peut être restaurée par l'addition de lysoPC (Riffo and Parraga 1997). Un résultat similaire a été observé chez le hamster (Riffo and Parraga 1996). Une autre preuve de l'implication des phospholipases dans la fusion gamétique a été faite par l'étude de Riffo et al 1999, en observant l'effet de l'un des produits de la

réaction enzymatique des phospholipases A₂, les lysophosphatidylcholine (LPC), sur la liaison des spermatozoïdes à des ovocytes prétraités par le lysoPC (chez la souris). Le prétraitement *in vitro* des ovocytes par les LysoPC a dramatiquement augmenté la capacité des spermatozoïdes à se lier à l'ovocyte (Riffo and Nieto 1999). À l'heure actuelle, on ne sait exactement quelles sont les phospholipase A₂ impliquées dans l'interaction gamétique. L'étude de Bao *et al.* 2004 nous donne un élément de réponse. Cette étude a permis d'établir l'implication d'une phospholipase A₂ : la α -PLA₂ VIA dans l'interaction gamétique. En effet, cette étude montre une diminution notable du taux de fécondation *in vitro* entre des ovocytes α -PLA₂ VIA^{-/-} et des spermatozoïdes α -PLA₂ VIA^{+/+} (Bao, Miller et al. 2004). Un nombre important de PLA₂ sont présentent au niveau du spermatozoïde (Masuda, Murakami et al. 2004), il reste à établir le rôle des autres PLA₂ dans l'interaction gamétique, peut être un mécanisme de redondance ou compensatoire est à envisager.

La fusion de la membrane du spermatozoïde avec l'ovocyte induit l'exocytose des granules corticaux. Les composants des granules corticaux vont modifier ZP2 et ZP3. Cette modification de la zone pellucide va induire un blocage lent de la polyspermie. L'ovocyte est alors fécondée.

Problématique

La baisse de la fertilité masculine mondiale ces dernières décennies est devenue préoccupante. Ainsi, un homme sur quinze est subfertile (Auger, Kunstmann et al. 1995). Les principales causes de l'infertilité masculine peuvent être réparties en trois catégories : les *anomalies de la production des spermatozoïdes de causes génétiques* (Escalier 2006; Dieterich, Soto Rifo et al. 2007) affectant la qualité et/ou la quantité de ces derniers (Sherins 1995); les *obstructions anatomiques* et les *facteurs environnementaux* (Sharpe and Skakkebaek 1993). Bien que produits en nombre suffisant, les spermatozoïdes peuvent être immatures, présenter des formes anormales ou être incapables de se déplacer correctement, caractéristiques qui les priveront de leur capacité de féconder un ovocyte.

Les anomalies des spermatozoïdes, dues à des problèmes de production, de maturation des spermatozoïdes et de transport, sont les causes les plus communes de l'infertilité masculine. On en distingue quatre types :

- **L'Oligospermie** : elle correspond à une quantité insuffisante de spermatozoïdes dans le sperme. Normalement il y a au moins 20 millions de spermatozoïdes par ml de sperme. Il a été estimé qu'un nombre inférieur à 10 millions/ml peut être responsable d'une infertilité (Grimes and Lopez 2007; Poongothai, Gopenath et al. 2009).
- **L'Azoospermie** : le liquide spermatique ne contient aucun spermatozoïde.
- **L'Asthénospermie** : elle correspond à un défaut de mobilité des spermatozoïdes qui éprouvent des difficultés à se déplacer. Il y a normalement au moins 40 % de spermatozoïdes mobiles dans le sperme. En dessous de ce seuil, on parle d'asthénospermie.
- **La nécrospermie** : elle est caractérisée par un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts (> 50 %). Elle est souvent due à des infections.
- **La tératospermie** : elle correspond à une quantité trop importante de spermatozoïdes mal formés et témoigne de la présence d'un taux anormalement élevé de spermatozoïdes anormaux de l'ordre de moins de 50 %.

Bien que chacune de ces anomalies puisse exister séparément, elles sont généralement combinées. On parle alors d'**OATS** (oligoasthénotératospermie).

Ces anomalies du spermogramme peuvent avoir des causes diverses (Jameson 1981; Ceccarelli, Canale et al. 2008 ; Matsumoto, Hirose et al. 2008 ; Matzuk and Lamb 2008 ; Poongothai, Gopenath et al. 2009 ; Shefi, Kaplan et al. 2009; Shefi, Levron et al. 2009) :

- **des maladies infectieuses** : certaines maladies infectieuses ou états inflammatoires, comme le virus des oreillons, peuvent conduire à une infection des organes génitaux ou entraîner une inflammation et une atrophie des testicules (Jameson 1981). Environ 25% des hommes ayant contracté les oreillons après leur puberté deviennent infertiles (Erpenbach 1991).
- **des troubles endocriniens** : les troubles endocriniens ou hormonaux ne représentent qu'une faible part (environ 2%-5%) des cas d'infertilité masculine. Une production insuffisante des hormones contrôlant la sécrétion de testostérone et la production de spermatozoïdes - l'hormone folliculostimulante et l'hormone lutéinisante - sont les problèmes les plus courants.
- **des problèmes immunitaires** : certains hommes produisent des anticorps dirigés contre leurs propres spermatozoïdes conduisant à une motilité insuffisante de ces derniers ou à des agglutinations (les spermatozoïdes sont liés entre eux par la tête ou la queue et incapables de féconder).
- **des maladies génétiques** :
 - o Le syndrome de Klinefelter, anomalie chromosomique, qui associe une atrophie des testicules, une azoospermie (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat) et une gynécomastie (McLachlan, Mallidis et al. 1998 ; Paduch, Bolyakov et al. 2009)}.
 - o Des *micro-délétions du chromosome Y*: anomalie des gènes entrant dans la fabrication des spermatozoïdes. Ces anomalies peuvent résulter d'une transmission filiale, ou d'un accident lors de la détermination des chromosomes de l'embryon. Elles pourraient concerner 15% des causes d'azoospermie (Edwards and Bishop 1997; McLachlan, Mallidis et al. 1998) (Exemple : la mutation de l'Aurora kinase C AURKC (Dieterich, Soto Rifo et al. 2007 ; Harbuz, Zouari et al. 2009) ou la mutation C677T de la méthylentetrahydrofolate réductase MTHFR(Singh, Singh et al. 2005)...)

- o *Des Mutations de l'ADN mitochondriale* (Diez-Sanchez, Ruiz-Pesini et al. 2003; Diez-Sanchez, Ruiz-Pesini et al. 2003) : anomalies des gènes mitochondriaux qui induisent une diminution de la production d'ATP, indispensable à la mobilité spermatique.

Des facteurs liés à l'environnement (Sokol, Kraft et al. 2006) et au mode de vie peuvent également affecter la qualité des spermatozoïdes. Une exposition à des composés chimiques tels que les insecticides (Matzuk and Lamb 2008), une consommation excessive d'alcool, une consommation de tabac (Collodel, Capitani et al. 2009), une exposition à des radiations (Benoff, Jacob et al. 2000) et certains traitements anticancéreux peuvent inhiber la production de spermatozoïdes, soit temporairement, soit définitivement. Dans 30% à 40% des cas d'infertilité masculine, l'origine du problème reste inexpliquée.

Au cours des dernières décennies, de grands progrès ont été accomplis dans le traitement de l'infertilité masculine et le choix de traitements actuellement disponibles comprend le traitement médicamenteux, la chirurgie et les techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP), notamment l'insémination artificielle, la fécondation *in vitro* et les techniques de microinjection. Cependant, les progrès dans le traitement de l'infertilité masculine restent à l'heure actuelle encore insuffisant, car sur 60% des embryons qui peuvent être transféré, seulement 12.3 % des embryons se développent in utero (Donnée ABM, France 2005 en FIV humaine).

Si les causes de la baisse de la fertilité mondiale semblent être essentiellement liées à l'environnement (Benoff, Jacob et al. 2000; Sokol, Kraft et al. 2006) et au mode de vie (Sharpe and Franks 2002), il est essentiel de comprendre tous les mécanismes qui régulent le pouvoir fécondant du spermatozoïde afin d'optimiser les techniques de procréations médicalement assistées.

Le développement de nouveaux axes de recherche, expérimentaux et théoriques, pour identifier les mécanismes sous-jacents de l'infertilité masculine est indispensable.

L'équipe de Inoue a développé une nouvelle stratégie pour identifier de nouveaux partenaires qui régulent le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Ils ont découvert un nouveau partenaire protéique « Izumo » impliqué dans la fusion des spermatozoïdes avec l'ovocyte (Inoue, Ikawa et al. 2005) à partir d'un anticorps, identifié en 1987 par l'équipe d'Okabe, dont on ne connaissait pas l'antigène, mais dont on savait qu'il est capable d'empêcher la fécondation *in*

vitro (Okabe, Adachi et al. 1987). Leur stratégie a été tout d'abord d'isoler l'antigène par *immunoblotting* et d'identifier par spectrométrie de masse de l'anticorps capable d'empêcher la fécondation *in vitro*. Ensuite d'identifier par clonage *in silico*, à partir de cet antigène, la protéine spermatique cible de l'anticorps. Cette dernière a été dénommée Izumo. Et enfin de montrer l'implication d'Izumo dans la fusion des spermatozoïdes avec l'ovocyte avec l'élaboration de souris Izumo ^{-/-}. Les spermatozoïdes Izumo ^{-/-} même s'ils se lient à la membrane de l'œuf sont incapables de fusionner avec l'ovocyte.

Ces dernières années, d'autres stratégies expérimentales ont été mises en avant pour comprendre la régulation de mécanismes physiologiques. L'explosion de l'analyse protéomique, le développement de techniques de séparation et d'analyse toujours plus performantes et plus sensibles et l'émergence d'une nouvelle discipline : la vénomique (étude du génome et du protéome des venins) ont permis le développement de nouveaux axes de recherche fondamentale.

Ainsi, la vénomique a permis de découvrir de nouveaux outils pharmacologiques permettant :

- de mieux comprendre la mise en place de voie de signalisation et les interactions moléculaires :
 - Un exemple est la découverte des toxines nicotiques (Malany, Osaka et al. 2000) qui ont permis de mieux comprendre la mise en place de l'influx nerveux. Ces toxines extraites de venin de serpent agissent sur la membrane post-synaptique et bloquent l'influx nerveux en se fixant sur le récepteur de l'acétylcholine.
- de mieux comprendre le rôle physiologique de certains canaux ioniques :
 - À titre d'exemple, l' ω -conotoxine GVIA (Colledge, Hunsperger et al. 1992) extraite du venin de *Conus geographus*, a permis de mettre en évidence l'implication des canaux de type N (Cav2.2) dans les voies nociceptives afférentes (Reynolds, Wagner et al. 1986). L' ω -conotoxine GVIA est probablement la conotoxine la plus utilisée en neuroscience puisque plusieurs centaines de publications rapportent son utilisation comme outil pharmacologique pour l'inhibition de la transmission synaptique.

- le traitement de certaines pathologies :
 - Un exemple frappant est la création et le développement d'un médicament le Captopril® à partir d'une toxine de venin la Teprotide. Elle a initialement été extraite du venin du serpent *Botrops jararaca* (Ondetti, Williams et al. 1971) et s'est révélée efficace pour le traitement de l'hypertension artérielle et les insuffisances cardiaques.
- le développement de nouveaux outils de diagnostic :
 - Comme par exemple le Protac™. Le Protac™ est un agent pharmaceutique extrait du venin d'*Agkistrodon contortrix*. Il permet d'activer artificiellement une glycoprotéine, la protéine C, qui a un double effet anticoagulant (Marsh 2001). Le test par le Protac™ permet de vérifier l'intégrité de cette protéine dont les défaillances sont à l'origine d'un grand nombre de thromboses (coagulation *in vivo* d'une artère ou d'une cavité vasculaire ou cardiaque).
 - Ou comme la Botrocétine™, extraite du venin de serpent *Botrops jararaca*. La Botrocétine™ est un puissant agrégant plaquettaire permettant le diagnostic de plusieurs maladies hémorragiques d'origine génétique telle que la maladie de Von Willebrandt (Marsh 2001). Cette maladie est caractérisée par le déficit en facteur de von Willebrandt, indispensable à l'adhésion des plaquettes sanguines.

C'est dans ce contexte, de développement de nouvelles stratégies expérimentales pour la compréhension des mécanismes de régulation du pouvoir fécondant du spermatozoïde que se situe ce travail de thèse.

L'objectif de mon travail de thèse est de : *comprendre les voies de signalisations qui régulent la physiologie spermatique à l'aide de nouveaux outils pharmacologiques à partir de venins d'animaux.*

Méthodologie

Les venins sont composés de plusieurs centaines de molécules chimiques différentes. On y retrouve essentiellement des peptides et des protéines, mais aussi des enzymes telles que les phospholipases, les phosphatases et les protéases. Parmi les dizaines, voire les centaines de constituants d'un venin, le défi est d'aller directement rechercher des toxines d'intérêts ciblées. La difficulté réside dans le fait de cibler les molécules d'intérêt dans le mélange complexe.

La stratégie que j'ai employée ici est la recherche de nouveaux outils pharmacologiques par des tests d'activités biologiques. Cette stratégie comporte de nombreuses étapes. Le venin étant très complexe, une première étape de fractionnement par chromatographie est nécessaire. Chacune des fractions obtenues est alors testée sur un modèle biologique, dans notre cas c'est la mobilité spermatique chez la souris, afin de déterminer si elle contient ou non une activité intéressante. Dans le cas où le test est jugé positif, la fraction sélectionnée est purifiée et caractérisée.

II. Fractionnement des venins par chromatographie

La recherche de nouvelles molécules bioactives sur les mouvements flagellaires des spermatozoïdes a été réalisée à partir d'une banque de 23 venins, fournis par la Société Latoxan, spécialisée dans la production de venin. Cette banque de venin a été établie en fonction :

- Des espèces : Sélection des familles où il a déjà été décrit dans la littérature, la présence de peptides bioactifs envers les canaux ioniques, tels que les serpents, scorpions et araignées.
- De la zone géographique ex. : Inde, Europe, Pakistan, USA, etc.

Chaque venin a été fractionné par FPLC par l'intermédiaire d'une colonne d'exclusion Superdex peptide 10/300 GL. La colonne d'exclusion va permettre de fractionner le venin en fonction de la taille de ses composés et de ne garder que les molécules d'intérêt situées entre 1000 et 15000 Da.

Chacune des fractions obtenues est ensuite testée sur la mobilité spermatique.

II. Modèle biologique : la mobilité spermatique

La mesure des mouvements du spermatozoïde est aujourd'hui automatisée. Elle a été réalisée par un analyseur de mobilité spermatique CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis).

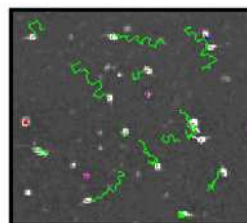
Cet appareil permet à l'aide d'une caméra fréquentée à 50 Hz de suivre les mouvements de la tête du spermatozoïde et d'en déterminer sa trajectoire. De cette trajectoire plusieurs paramètres vont en être déduits (Figure 37) :

- La VLC : Vitesse curvilinéaire ($\mu\text{m/s}$).
- L'ALH : L'amplitude de déplacement de la tête (μm).
- La VSL : Vitesse de progression linéaire ($\mu\text{m/s}$).
- La VAP : Vitesse selon la trajectoire moyenne ($\mu\text{m/s}$).
- La LIN : Linéarité de la trajectoire (μm).
- La BCF : Fréquence de battement (battement/s).

Cet appareil de mesure de la mobilité spermatique est configuré spécifiquement pour mesurer les déplacements de la tête des spermatozoïdes de différents types de mammifères tels que les béliers, les verrats, les rats, les chevaux, les singes, les pigeons, les hommes, etc....

Analyse automatique du mouvement par système CASA

(Computer-Assisted Sperm Analysis)



TERMINOLOGIE DES DIFFERENTS PARAMETRES MESURES PAR LES SYSTEMES CASA

VCL = *vitesse curvilinéaire* ($\mu\text{m/s}$).
VSL = *vitesse de progression linéaire* ($\mu\text{m/s}$).
VAP = *vitesse selon la trajectoire moyenne* ($\mu\text{m/s}$).
ALH = *amplitude de déplacement latéral de la tête* (μm).
LIN = *linéarité*. C' est la linéarité de la trajectoire égale au rapport VSL/VCL.
WOB = *oscillation*. VAP/VCL.
STR = *rectitude*. VSL/VAP.
BCF = *fréquence de croisement de trajectoire* (battements/s).
MAD = *déplacement angulaire moyen* (degrés).

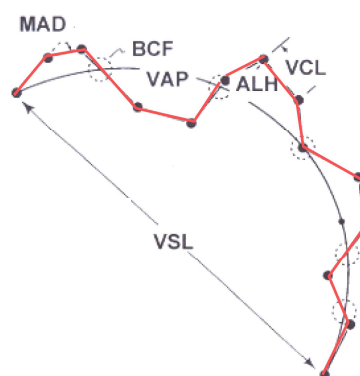


Figure 37 : Analyse automatique du mouvement spermatique par le système CASA. Cet appareil permet à l'aide d'une caméra fréquentée à 50 Hz de suivre les mouvements de la tête du spermatozoïde et d'en déterminer sa trajectoire. De cette trajectoire plusieurs paramètres vont en être déduits : la VAP, la VSL, la VCL, la STR, la LIN, la BCF et L'ALH.

Ces appareils permettent de mesurer les mouvements de nombreux spermatozoïdes simultanément, et analysent de nombreux paramètres différents automatiquement. Avec ce type d'appareil, il est possible de tester un nombre important de fractions de venins par jour (entre 5 et 10)

De nombreux rapports montrent des problèmes au niveau de la configuration du logiciel d'analyse de la mobilité spermatique pour différentes espèces (Smith and England 2001; Cox, Alfaro et al. 2006). Chaque nouvel utilisateur du système de CASA doit lire tous les documents publiés sur son espèce d'intérêt et doit avoir un aperçu de tous les problèmes qu'il peut trouver. Pour certaines espèces, aucune configuration spécifique des déplacements de la tête des spermatozoïdes n'est caractérisée. C'est la raison pour laquelle, j'ai dû tout d'abord valider mon système d'analyse par des expériences préliminaires sur des spermatozoïdes de souris, avant de tester l'activité biologique des différentes fractions de venins. Ces expériences préliminaires m'ont permis de définir le profil de mobilité spermatique des souris OF1 (Figure 38).

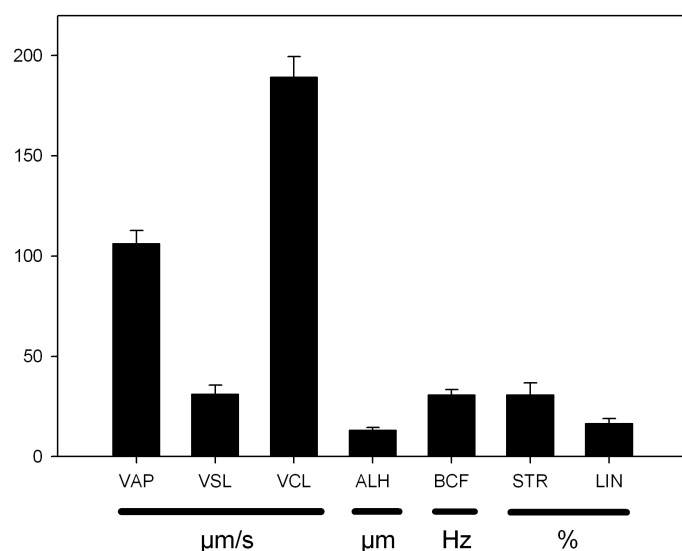


Figure 38: Paramètres de mobilité CASA des spermatozoïdes de souris OF1.

Sur les sept paramètres CASA, que l'appareil m'établissait, j'ai sélectionné seulement deux paramètres CASA pour mon test d'activité biologique afin de réduire le temps d'analyse du test. J'ai choisi deux paramètres les plus représentatifs de l'augmentation de la mobilité spermatique due à la capacitation (Figure 39): la vitesse curvilinéaire (VCL) et le déplacement latéral de la tête (ALH).

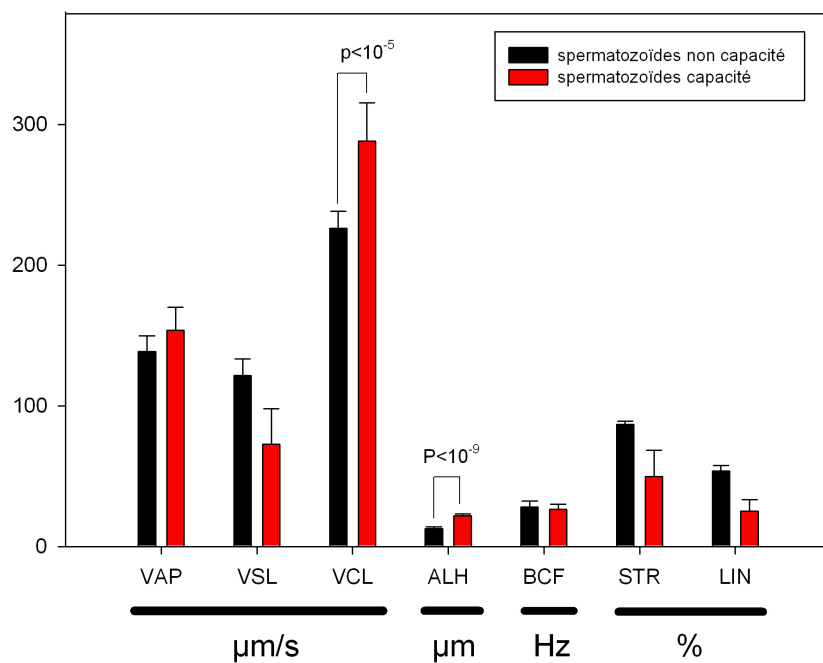


Figure 39 : Comparaison des paramètres CASA de mobilité spermatique des spermatozoïdes de souris OF1 capacité et non capacités *in vitro*.

Résultats

I. Découverte de nouveaux outils pharmacologiques à partir de venins d'animaux.

1. Introduction

Comme expliqués précédemment, les venins sont composés de plusieurs centaines de molécules chimiques différentes. On y retrouve essentiellement des peptides et des protéines, mais aussi des enzymes tels que les phospholipases, les phosphatases et les protéases.

La stratégie que nous avons employé pour trouver de nouveaux outils pharmacologiques est la recherche de molécules par des tests activités biologiques. Cette stratégie comporte de nombreuses étapes.

Le venin étant très complexe et une première étape de fractionnement par chromatographie a été nécessaire. Chacune des fractions obtenues a été testée sur notre modèle biologique, ici la mobilité spermatique chez la souris, afin de déterminer si elle contient ou non une activité intéressante. Nous avons pu caractériser et identifier la composition des fractions des venins qui présentait une activité biologique sur la mobilité spermatique par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF avec séquençage *de novo* en collaboration avec le Dr Michel Seve et l'ingénieur de recherche Morgane Couvet de la Plate-forme de Protéomique Médicale de Grenoble. Après avoir identifié les molécules d'intérêt, nous avons pu ensuite évaluer l'effet de ces molécules sur les différentes étapes de la physiologie spermatique telles que : la mobilité, la réaction acrosomique, la modification lipidique lors de la capacitation et la fécondation *in vitro*, grâce à une collaboration avec le Dr Gérard Lambeau qui nous a fourni ces molécules.

Article 1: sPLA2 from snake venom as a source of molecule modulating sperm physiology: Phospholipases of the toxic snakes Oxyuranus scutellanus strongly modulate sperm motility, sperm acrosome reaction and in vitro fertilization

Jessica Escoffier, Ikram Jemel, Morgane Couvet, Michel Sève, Pierre Ray, Gérard Lambeau, Michel De Waard and Christophe Arnoult

Article en préparation

**Venoms as a source of molecules modulating sperm physiology:
sPLA2s of the snake *Oxyuranus scutellatus* strongly modulate
sperm motility, sperm acrosome reaction and *in vitro* fertilization**

Jessica Escoffier^{1,2}, Morgane Couvet^{2,3}, Harold de Pommier⁴, Pierre Ray^{5,6}, Michel Sève^{2,3},
Gérard Lambeau^{7,8}, Michel De Waard^{1,2} and Christophe Arnoult^{1,2*}

1 Inserm, U836, Grenoble, F-38000, France ; 2 Univ Joseph Fourier Grenoble, Grenoble, F-38000, France ; 3 Inserm, U823, Grenoble, F-38000, France ; 4 Latoxan, Valence, F-26000, France ; 5 CHRU Grenoble, Hop Michallon, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000, France ; 6 CNRS, UMR5525, La Tronche, F-38710, France ; 7 CNRS, UMR6097, Valbonne, F-06560, France ; 8 Univ Nice-Sophia Antipolis, Nice, F-06000, France.

* Corresponding author

Grenoble Institute of Neurosciences

Equipe 3 “Calcium channels, functions and pathologies”

Bâtiment Edmond J. Safra, Site Santé à La Tronche

BP 170 38042 Grenoble Cedex 9 - France tel: 33 456 520 564

E-mail: christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

ABSTRACT

We screened on sperm motility the effect of 16 snake venoms cleared of molecules with a molecular weight above 15 kDa. Venoms known to be rich in neurotoxic sPLA2, like those of *Oxyuranus scutellatus* or *Daboia russelii*, were potent inhibitors of sperm motility. In contrast, venoms rich in myotoxic sPLA2 like those of *Echis carinatus*, *Bothrops alternatus* and *Macrovipera lebetina*, were fully inactive. By a proteomic approach, OS1 and OS2, two sPLA2 of the taipan *Oxyuranus scutellatus*, were identified in the inhibitory fraction of the venom. Purified OS1 and OS2 sPLA2 inhibited sperm motility, triggered acrosome reaction of sperm and induced lipid rearrangements of the plasma membrane. Catalytic activity of OS2 was required to modulate sperm physiology since catalytically inactive mutants of OS2 sPLA2 were inactive. Finally, sperm treated by OS2 were not as competent as control sperm to induce *in vitro* fertilization. It is the first report of using toxins to modulate *in vitro* sperm physiology.

INTRODUCTION

Since several decades, human reproduction is going downhill and is becoming a real problem in modern society [1]. Human reproduction decline is due to several causes : societal causes like the postponed decision of the first pregnancy at a later age of the mother, environmental causes like endocrine disruptors [2] and obviously hereditary factors [3-5]. As observed in many pathologies, infertility treatment is weakened by our incomplete knowledge of sperm physiology and fertilization, especially at the molecular level. The molecular pathways and the different proteins involved in the three main physiological steps of mature sperm that are sperm motility, capacitation and acrosome reaction are still the object of active research [6; 7]. Discovering new molecular pathways and/or proteins involved in the control of sperm physiology is a necessity. Different strategies have been used to decipher the molecular mechanisms of sperm physiology like invalidating gene or proteomic analyses. Another strategy is based on the use of a very specific inhibitor of a cellular sperm function, and the purification of the targeted protein by using the inhibitor as a bait. This strategy has been very successful in the ion channels domain: for instance ryanodine, a plant alkaloid, allowed to characterize a calcium channel of the reticulum, dihydropyridines allowed to characterized another calcium channel of the tubule T in muscles [8]. In the sperm domain, a similar approach, using a specific sperm antibody, allowed to characterize a unique protein involved in sperm-oocyte binding that is izumo [9]. Venoms, as a source of biological active molecules, have also been used to purify and characterize new proteins. For instance apamin, a bee toxin, allowed to characterize a Ca^{2+} -activated K^{+} -channel [10]. Several types of molecules are present in venoms, like proteins, peptides or polyamines and up to 100 different molecules are present in one venom. Most of the venom compounds are very specific. This high specificity is illustrated by the property of the toxin ω -AgaIVA, obtained from a spider venom, which is able to differentiate two spliced variants: ω -AgaIVA inhibiting P-type channels but in contrast not Q-type channels, two channels resulting from the alternative splicing of the alpha 1A subunit gene [11]. The specificity of venom compounds is also illustrated by the fact that several toxins or compounds structurally close of toxins are currently used as drugs in the treatments of pain, neurological diseases, cancers or autoimmune disease [12]. Based on the specificity of venoms compounds, we seeked, from a venom bank, new biologically active molecules on sperm physiology, in order to find new actors of sperm physiology.

In this paper, we screened venoms of 16 different snakes belonging to different families (Elapidae, Viperidae, Colubidae) on sperm motility. Crude venoms have been fractioned in order to remove proteases from the venom samples. We conserved and tested only fractions containing molecules with a molecular weight (MW) below 15 kDa. Most of the tested venoms were potent inhibitors of sperm motility except the venoms of *Echis carinatus*, *Bothrops alternatus* and *Macrovipera lebetina*. The two most potent inhibiting venoms were those of *Oxyuranus scutellatus* and *Daboia russelii*. We then focused on the most potent inhibiting fraction from the venom of *Oxyuranus scutellatus*. By proteomic analysis, we demonstrated that this fraction is enriched in secreted phospholipase A2 (sPLA2), of which OS1 and OS2, two neurotoxic sPLA2 [13]. We thus tested the effects of several recombinant sPLA2, OS1, OS2 and different mutant proteins showing different enzymatic activities, on sperm motility, sperm acrosome reaction (AR), and *in vitro* fertilization (IVF). In accord with result previously obtained with mammalian sPLA2, recombinant OS1 and OS2 toxins were potent inhibitors of sperm motility, and potent activators of acrosome reaction. However, OS2 sPLA2 did not mimic the improvement of mouse IVF performed by the sPLA2 of the group X, but inhibited the IVF outcome instead.

MATERIAL AND METHODS

Venom separation — Venoms have been obtained from Latoxan, SA (Valence, France).

100 mg of crude venom was dissolved in 1 ml of 100 mM ammonium acetate and centrifugated at 10 000 g during 10 min. 250 µl of the supernatant was used in the separation stage. Separation of the different compounds of the venom was performed with a superdexTM peptides 10/300 GL column: each fraction of 500 µL was frozen after collection. Fractions containing molecules with a MW above 15 kDa were discarded (fraction A1 to A8). For the screening procedure, we first pooled fractions A9-B4 to test global activity. The pooled fraction corresponds to the addition of 100 µL of fractions A9 to B4. It was lyophilized and re-suspended in 120 µL of M16 medium.

Computer-assisted motility analysis — Sperm cells from caudae epididymes were allowed to swim in 1 ml of M2 medium for 10 min. Sperm was re-suspended in M16 and incubated with different test fractions at 37°C for 10 min (247.5 µL of sperm were incubated with a aliquot of 12.5 µL of the test fraction). After incubation, the sperm suspension was immediately placed onto analysis chamber (2X-CEL Slides, 100 µm depth, Leja Products B.V., Netherlands) kept at 37 °C for microscopic quantitative study of sperm movement. Sperm motility parameters were measured at 37°C using a sperm analyzer (Hamilton Thorn Research, Beverley). The settings employed for analysis were as follows: acquisition rate: 60 Hz; number of frames: 100; minimum contrast: 25; minimum cell size: 10; low static-size gate: 2.4; high static-size gate: 2.4; low static-intensity gate: 1.02; high static-intensity gate: 1.37 ; minimum elongation gate: 12; maximum elongation gate: 100; magnification factor: 0.70. The motility parameters measured were: curvilinear velocity (VCL) and amplitude of lateral head displacement (ALH). A minimum of 100 motile spermatozoa for each sample were analyzed.

Proteomic analysis — In order to increase the sequence coverage of identified proteins, 3 experiments were performed with 2 distinct chromatography gradients and 3 mass spectrometry methods. Protein samples (experiment 1 and 2: 21µL, experiment 3: 10µL) were dried by vacuum centrifugation and resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8), denatured with 2% SDS, reduced with 45 mM DTT (50°C for 30 min) and alkylated with 100 mM IAA at room temperature for 40 min. The protein mixture was then digested by addition of a trypsin solution (Porcine modified, Promega) at 1:20 (experiments 1 and 2) and 3:20 (experiment 3) ratio (w/w), and incubated overnight at 37°C. Protein digests were dried by

vacuum centrifugation and resuspended in 20 μ L of buffer A (2% acetonitrile in water with 0.05% TFA). 3 μ L of the resulting sample were first loaded on a 300 μ m i.d. $\times$ 5 mm C18 PepMap 5 μ m, 100 Å precolumn cartridge (Dionex) for desalting and concentration and then back-eluted onto the 75 μ m i.d. $\times$ 15cm C18 PepMap column, 3 μ m, 100 Å (Dionex). The flow rate through the column was set to 300 nL/min. The buffers being used were: A = 2% acetonitrile in water with 0.05% TFA and B = 80% acetonitrile in water with 0.04% TFA. Peptides were separated using the following gradient: (i) experiments 1 and 3: 0-5 min 0-10% (v/v) B, 5-45min 10-42% (v/v) B, 45-55min 42-58% (v/v) B, 55-65min 90% (v/v) B and then re-equilibrated 65-80min 100% (v/v) A; (ii) experiment 2: 0-5 min 0-10% (v/v) B, 5-40min 10-42% (v/v) B, 40-55min 42-90% (v/v) B, 55-70min 90% (v/v) B and then re-equilibrated 70-85min 100% (v/v) A. The eluent was spotted directly onto a blank MALDI target plate (Applied Biosystems) using a Probot Micro Fraction Collector (Dionex) collecting 15 second fractions. The eluent was mixed 1:3 (v/v) post-column with 2 mg/mL HCCA in 70% acetonitrile and 0.1% TFA. MALDI analyses were performed on a 4800 MALDI-TOF/TOF instrument (Applied Biosystems). The instrument was operated in positive ion mode and externally calibrated. MS spectra from m/z 750–3500 were acquired for each spot. For each sample spot, maximum 15–20 peptides were selected (only peptides above a S/N threshold of 50) for fragmentation, starting with the strongest (experiments 1 and 3) or weakest (experiment 2) peptide. MS/MS spectra were collected at the most intense point of the chromatographic elution profile, using air as the collision gas and a collision energy of 1kV. For protein identification, all MS/MS data obtained (experiments 1, 2 and 3) were submitted to ProteinPilot 2.0.1 software program (Applied Biosystems) using the Paragon protein database search algorithm, with trypsin as the digestion agent, cysteine modification by iodoacetamide and Rapid ID as search Effort. Searches were performed against the NCBI protein database (update 05-10-2009), limited to *Oxyuranus scutellatus* sequences. Only proteins identified with at least 95% confidence, or a ProtScore of 1.3, were reported.

Production of recombinant sPLA2s —Native OS1 and OS2 sPLA2s from *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (Taipan) snake venom and native Ba-II and Ba-IV K-49 sPLA2-like proteins from *Bothrops asper* venom were purified as described [14; 15]. Recombinant wild type OS2 and its catalytically-inactive mutants were prepared as described previously [13].

Acrosome reaction assay — Sperm cells from caudae epididymes were allowed to swim in M2 medium for 10 min. If necessary, sperm were capacitated in M16 medium with 2% fatty acid free BSA (Bovine Serum Albumin) at 37°C in a 5% CO₂ incubator during various periods of time. For sPLA2 treatment, sperm were incubated with sPLA2 in M16 medium at 37°C for the last 10 min. Cells were transferred in PBS solution and then fixed with 4% PFA solution for 2 min. Sperm were washed with 100 mM ammonium acetate for 2 min and wet-mounted on slides and allowed to air dry. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%) for 2 min and finally rinsed with water. Slides were counted immediately and 150 sperm cells at least were scored per slide.

Confocal microscopy — Control untreated sperm cells (non capacitated or capacitated during 35 min in 2% BSA 5% CO₂) or equivalent treated sperm (10 min in the presence of 200 nM OS2-sPLA2) were washed twice in PBS and transferred in a staining buffer (10mM HEPES/NaCl, 0.14 M NaCl and 250 nM CaCl₂, pH=7.4) containing both carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) and 1 µg/mL of annexin V-Cy3 for 15 min in the dark at room temperature. After incubation with annexin V-Cy3, the sperm suspension was washed twice with the binding buffer. Sperm cells were then fixed in 4% PFA and annexin-V staining was measured using a confocal microscope (Leica).

Chemical compounds — M2 and M16 medium, low fatty acid BSA (fraction V) and Annexin V-Cy3 (from Apoptosis detection kit) were purchased from Sigma.

RESULTS

sPLA2s from venoms inhibit sperm motility

We tested on sperm motility 16 different venoms from snakes belonging to different Families (Elapidae, Crotalidae and Colubidae) and coming from different continents (South and North America, Asia, Africa). First, the venoms were separated by size exclusion chromatography and fractions containing large proteins of the venom were discarded, in order to remove proteases, known to be present in snake venoms (figure 1A). Fractions containing proteins above 15 kDa were spotted by calibrating the column with standart proteins (cytochrom C, aprotinin and vitamin B12). A western blot was preformed to check that proteins above 15 kDa were absent of the fractions of interest (not shown). Second, a two-step screening protocol was developed to test venoms. First, we tested in one shot all collected fractions from a venom and thus containing all the compounds of the venom below 15 kDa. Second, we focused on the most inhibiting venom and tested individually the different collected fractions. In order to test the potency of the fraction of interest of each venom on sperm physiology, we first evaluated the effect of the venom on sperm motility using a CASA system. We focused more particularly on two sperm motility parameters, the VCL corresponding to Curvilinear Velocity (microns/sec) and the ALH corresponding to Amplitude of Lateral Head Displacement (microns). Figure 1B presents the effect of the 16 tested venoms on non capacitated sperm incubated during 10 min with the pooled fractions (A9-B4) of low MW of the different venoms. Two venoms were particularly potent by decreasing sperm VCL by around 50%: the venoms of *Daboia russellii* and *Oxyuranus scutellatus*. On the other side, other venoms were inactive like venoms from *Echis carinatus*, *Bothrops alternatus* and *Macrovipera lebetina*. In between very potent and inactive venoms, the other venoms presented intermediate sperm toxicity. In order to determine the compounds involved in sperm motility decrease, we tested individually the different fractions of *Oxyuranus scutellatus*. The first fraction of interest, named A9, and corresponding to the compounds with the heaviest molecular weight (10-15 kDa), was the most potent and decreased the VCL by more that 30% (Figure 1C). The compounds present in this fraction was thus likely responsible of the sperm mobility toxicity. Then, we analysed the composition of the A9 fraction with a proteomic approach. 16 non-redundant proteins were identified with at least 95% confidence (Table 1). Redundancy between proteins identified is minimized using a grouping function, which assigns an "unused score" to the peptides that are unique to a

protein or group of redundant proteins. Thus, OS2 is a competitor protein of PLA-7 precursor because it has nearly all the same peptides as PLA-7 precursor but has no peptides distinct from it. Similarly OS1 is a competitor protein of PLA-1 precursor / OS5 precursor. We then focused on the two proteins having the highest number of identified peptides that were two sPLA2, named OS1 and OS2 and their precursors (Table 1). Based on our results on mammalian sPLA2 [16], OS1 and OS2 represented putative molecules able to modulate sperm motility. This hypothesis was tested by testing purified or recombinant OS1 and OS2 sPLA2 on sperm mobility. Ten min. incubation with OS1 and OS2 at a concentration of 200 nM modified the tracks of head sperm recorded by CASA system (figure 2A). The two sperm motility parameters VCL and ALH were decreased by both compounds (figure 2B-C), with OS2 being more potent than OS1. Very low concentrations of OS2 as 0.2 nM were able to modify sperm VCL.

Catalytic activity is necessary for venom sPLA2 effects on sperm motility.

sPLA2 are relatively small proteins with a MW in between 13 and 18 kDa and have a relatively well conserved structure whatever their species origin, with 5 to 8 disulfide bonds. sPLA2 enzymes are characterized by their ability to hydrolyse the *sn*-2 ester of glycerophospholipids of the extracellular leaflet of the plasma membrane in two components, a fatty acid (FA) and a lysophospholipid (LysoPL). sPLA2 from snake venoms are further divided in catalytic or non catalytic enzymes against phospholipids, in function of the nature of the amino acid number 49: D⁴⁹-sPLA2 are highly catalytic active whereas K⁴⁹-, S⁴⁹- or N⁴⁹ present low or no hydrolytic activity but strong myotoxic activity instead. Moreover, toxic sPLA2 have two modes of action: an enzymatic mode where they hydrolyse phospholipids [17] or/and a ligand mode where they act as agonists for specific lectin receptors [18]. The mechanism of action of neuro-toxicity of sPLA2 is still an open question. Some publications highlight the important role of sPLA2 metabolites, that are fatty acids and LysoPL in the neurotoxic effect at presynaptic level [19]. In the other hand, the binding of OS2 on its receptor plays also an important role in neurotoxicity [13; 18]. We thus wondered if enzymatic activity was required for sperm motility modulation by sPLA2 from venom origin. First, we tested a mutated OS2, with a substitution of one amino acid in its enzymatic pocket, H48Q, leading to a complete loss of the enzymatic activity [13; 20]. In figure 3, we show that the mutated OS2 was unable to affect sperm VCL (figure 3A). We also tested a chimeric OS2, whose its C-terminal domain (AA 109-128) has been substituted by the C-terminal domain of OS1. This chimera loses its specific enzymatic activity but retains most of the neurotoxicity

of the wild type OS2 enzyme [13]. The chimera was also unable to decrease sperm motility. The screening experiment of snake venoms has showed that several venoms like those from *Echis carinatus*, *Bothrops alternatus* and *Macrovipera lebetina* were inactive. The two first venoms are characterized by the presence of a high level of myotoxic sPLA2s [15; 21; 22], characterized by a mutation at amino acid 49 and leading to a strong decrease of its catalytic activity. We tested two purified sPLA2-like enzymes BaII-K49 and BaIV-K49, both myotoxins from the venom of *Bothrops asper*. These enzymes were totally inactive on sperm motility (figure 3B). Finally, a mutated OS2, presenting the substitution D49K and mimicking myotoxic sPLA2, was also fully inactive on sperm motility (figure 3B). All together, these results confirm the importance of the catalytic activity of OS1 and OS2 in decreasing sperm motility.

OS1 and OS2 are very potent activators of acrosome reaction

Mammalian phospholipase of the group X is able to induce acrosome reaction (AR) of mouse sperm whatever is their level of capacitation [16]. We thus tested the potency of OS1 and OS2 to induce also AR. Figure 4 shows the dose-response curves of AR induced by these two sPLA2. Again, OS2 is more potent than OS1. It is important to notice, that only a fraction of the sperm subpopulation is sensitive to sPLA2. Indeed, concentrations above 100 nM did not produce more AR of treated sperm, and around 40% of the sperm population is resistant to the OS2 treatment. This result confirms earlier findings suggesting that sperm plasma membrane composition is heterogeneous [16].

OS2 treatment does not impair sperm viability

Venoms are known to produce tissues lysis and cell death. We thus wonder if the effect of OS2 on sperm motility was due to the death of a subpopulation of sperm. To test this hypothesis, we first measured the speed distribution of sperm treated with OS2 in comparison to the speed distribution of a control population. Figure 5A shows the speed distribution of OS2 treated sperm in comparison to this one of control sperm. The distribution of the OS2-treated sperm is characterized by the absence of fast sperm, i.e. sperm with a VCL above 200 $\mu\text{m/s}$, and by an over-representation of the slow sperm subpopulation, i.e. sperm with a VCL in between 50-100 $\mu\text{m/s}$. On the other hand, OS2 treatment did not increase the immotile subpopulation (0-10 $\mu\text{m/s}$). The fact that most of the treated cells were still motile after treatment suggests that OS2 did not induce a fast cell death responsible of the measured effect on sperm motility. To confirm this result, we loaded OS2 treated sperm with 6-

carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA), a compound entering freely into cells and producing green fluorescence after de-esterification by endogenous non-specific esterases, only in living cells. Figure 5B shows OS2 treated sperm cells subsequently incubated with 6-CFDA: most of the cells present a strong green fluorescence, a hint that OS2 treatment did not induce a cell death. Finally we measured phosphatidylserines staining via annexin-cyanin-3 binding before and after OS2 treatment, as a hint of the modifications of the lipid composition of the plasma membrane. It is important to point out that in sperm cells, externalization of phosphatidylserines occurs naturally during capacitation and is not considered as a hint of apoptosis. As expected from mammalian sPLA2 [23], OS2 induced on non-capacitated sperm a strong externalization of phosphatidylserines at the plasma membrane (figure 5C). This result suggests that OS2 treatment produces a lipid reorganization of the plasma membrane similar to this one occurring during the capacitation event.

OS2 treatment impairs the fertilization potential of sperm

We have demonstrated that OS1 and OS2 are potent modulators of sperm physiology, inhibiting sperm motility, triggering sperm AR and producing a lipid reorganization of the plasma membrane. We demonstrated previously that treating sperm with the mammalian sPLA2 belonging to the group X increases *in vitro* fertilization outcome and we wondered if OS2 may modulate IVF. To address this possibility, we treated capacitated sperm briefly with 20 or 200 nM OS2 during 10 min before sperm were introduced within oocytes (figure 6A). 24 hours after fertilization, the rate of oocytes reaching the 2-cell embryo stages were counted and compared to IVF realized with the same untreated sperm and oocytes from the same pool (figure 6B). None of these two concentrations improved the IVF outcomes, but rather decreased it (figure 6C).

DISCUSSION

In this manuscript, we have demonstrated that the fractions containing molecules below 15 kDa of most of the snake venoms inhibit sperm motility. Moreover, we have demonstrated by size exclusion chromatography that the inhibiting activity of the venom of *Oxyuranus scutellatus* on sperm motility is mostly due to the fraction containing molecules with a MW around 15 kDa (10-15 kDa). By a proteomic approach and purified toxins, the effects of the active fraction of *Oxyuranus scutellatus* were likely due to the neurotoxic sPLA2 OS1 and OS2. Indeed, purified or recombinant OS1 and OS2 sPLA2 inhibited sperm motility. Moreover, we demonstrated that OS1 and OS2 activities on sperm motility are due to their enzymatic activity on phospholipids, since several types of enzymatically inactive mutants were unable to modulate sperm motility. However several venoms were unable to modulate sperm motility and more particularly venoms from *Echis carinatus*, *Bothrops alternatus* and *Macrovipera lebetina*. These venoms are rich in specific myotoxic sPLA2, which are characterized by a mutation in the amino acid 49, leading to a loss of their enzymatic activity. Moreover purified sPLA2-like enzymes BaII-K49 and BaIV-K49, both myotoxins from the venom of *Bothrops asper*, were totally inactive on sperm motility. All together, these results suggest that the potency of a snake venom to decrease sperm motility is directly dependent to the catalytic activity of the sPLA2s present in the venom. However, we want to point out that the inhibiting or activating effects of other compounds present in the venom may be covered by our screening procedure using pooled fractions and the strong inhibitory effect of sPLA2 on sperm motility. Compounds with activating effects seem to be present as suggested by the activating effect of fraction B1 of *Oxyuranus scutellatus*. Secreted PLA2s are separated in ten different groups, namely I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII and XIV sPLA2. A large variety of sPLA2 are found in venom of different animals like insect (Hymenoptera), scorpions and snake. Toxic sPLA2 belong to three different groups: sPLA2 from Elapidae and Hydrophidae snakes Families belong to the group IA, sPLA2 from Crotalidae and Viperidae snakes Families belong to the group IIA and sPLA2 from insects of the Hymenoptera Order belong to the group IIIA. We did not observe a difference of activity between sPLA2 of the group IA and IB since the two most active venoms were those of *Oxyuranus scutellatus*, of which sPLA2 belong to the group IA and *Daboia russellii* of which sPLA2 belong to the group IIB. The diversity of sPLA2 of snake venoms is particularly rich and a snake venom can contain up to 15 different sPLA2s, with different pattern of enzymatic activity and toxicity [24]. As suggested by the different potencies of the snake venoms, we

demonstrated that two different sPLA2 OS1 and OS2 presented marked difference in their ability to inhibit sperm motility, OS2 being 10 times more potent than OS1. Recently, a complex named “reprotoxin” and containing a sPLA2 was found to induce atrophy of testis when injected at sub-lethal dose [25]. Our results show that sperm membrane composition are deeply affected by OS2 and may lead to cell apoptosis, and thus main explain testis atrophy.

These results highlight the importance of sPLA2 as modulator of sperm physiology. Indeed, mammalian secreted phospholipase A2 (sPLA2) are widely expressed in male reproductive tissues and are likely involved in a large set of biological functions [26; 27]. Recently, we showed that some mammalian secreted phospholipase A2 (sPLA2), and more particularly sPLA2 belonging to group X, control specifically key events of mouse sperm physiology that are sperm motility [23] and acrosome reaction [16]. This study confirms that changing the sperm plasma membrane composition, and more particularly phospholipids via sPLA2 enzymatic activity has important physiological consequences in term of sperm motility, capacitation and acrosome reaction. It is important to point out that the strong decrease of sperm motility was not due to a loss of cell viability since treated sperm with OS2 were still able to hydrolyse the fluorescent probe by non-specific esterases. The decrease of sperm motility was likely related to the change of the composition of the plasma membrane, as demonstrated by the change in annexin-V staining after OS2 treatment. This result supports the idea that phospholipids are important for sperm motility as suggested by the knock-out of the gene of internal PLA2 VIA (iPLA2 β), which leads to a severe motility phenotype [28]. OS1 and OS2 were also very potent inducers of acrosome reaction, with marked effect from 0.2 nM for OS2. Interestingly, the potent OS2 sPLA2 was unable to trigger AR in the whole sperm population even at very high concentrations, and more than 30-40% of sperm are fully resistant to its action. This result is in accordance with the results obtained with group X sPLA2 and confirms that a subpopulation of sperm is not sensitive to sPLA2 action, in regard to acrosome reaction. This point highlights the heterogeneity of sperm population [29; 30] and the great importance of sperm sorting, especially in ART, where a physiological sorting is absent [31]. Finally, we have previously shown that mammalian sPLA2 of the group X is able to improve the rate of success of *in vitro* fertilization (IVF) in mouse and this result suggest that sPLA2 activity may be used as a therapeutic compound in infertility treatment. The fact that venom sPLA2 are able to modulate sperm physiology, allows speculating that different sPLA2 may have more potent effect on IVF, than mGX. Although these snake enzymes were able to strongly modulate sperm physiology, they were unable to mimic the advantageous

action of the mammalian sPLA2 of the group X on the yield of IVF. We have tested several mammalian sPLA2 (unpublished data) and none of these enzymes were also able to reproduce the beneficial effect of the sPLA2 of the group X. The absence of beneficial effect on mouse IVF of the different sPLA2 tested is likely related to specific enzymatic activity of each sPLA2, characterized by the types of phospholipid hydrolyzed, the kinetic of hydrolysis and its capacity to bind on a specific plasma membrane in function of the cell curvature [17]. Altogether, these results suggest that the effect of sPLA2 of the group X on mouse IVF outcome is more specific than its effect on sperm motility.

Acknowledgments

We are grateful to J.M. Gutiérrez (San José, University of Costa Rica) for providing us Ba-II and Ba-IV sPLA2s. This work was supported in part by the Région Rhône-Alpes (to C.A.), CNRS (to C.A. and G.L.), INSERM (M.D.W.), the Association pour la Recherche sur le cancer [grant 3977] and the Agence Nationale de la Recherche (to G.L.). J.E. is supported by a fellowship by the Région Rhône-Alpes.

N	Unused	Total	%Cov	Accession	Name	Species
1	28,40	28,40	70,55	gi 71066730	PLA-7 precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
1	0,00	26,40	84,03	gi 913014	OS2=secretory phospholipase A2 [Oxyuranus scutellatus=Taipan snakes, ssp. scutellatus, venom, Peptide, 119 aa]	Oxyuranus scutellatus
2	16,54	16,54	64,94	gi 71066720	PLA-1 precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
2	0,00	16,54	64,94	gi 66475088	OS5 precursor [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
2	0,00	16,00	73,23	gi 913013	OS1=secretory phospholipase A2 [Oxyuranus scutellatus=Taipan snakes, ssp. scutellatus, venom, Peptide, 127 aa]	Oxyuranus scutellatus
3	13,57	13,57	65,06	gi 71066802	SNTX-1 precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
3	0,00	13,57	65,06	gi 123910874	RecName: Full=Short neurotoxin 1; Short=SNTX-1; AltName: Full=Toxin 3; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
3	0,00	13,52	57,83	gi 66475096	toxin 3 [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
3	0,00	12,00	67,74	gi 254772678	RecName: Full=Short neurotoxin 2; Short=SNTX-2	Oxyuranus scutellatus scutellatus
4	10,69	10,69	91,94	gi 263546	taicatoxin serine protease inhibitor component [Oxyuranus scutellatus=Australian taipan snakes, ssp. scutellatus, venom, Peptide, 62 aa]	Oxyuranus scutellatus
5	10,00	14,00	57,93	gi 71066718	beta taipoxin variant 1 precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
5	0,00	14,00	57,93	gi 66475082	beta taipoxin precursor [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
5	0,00	14,00	71,19	gi 129435	RecName: Full=Phospholipase A2 homolog, taipoxin beta chain	Oxyuranus scutellatus scutellatus
6	10,00	14,00	44,52	gi 66475084	alpha taipoxin-2 precursor [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
7	8,01	8,01	40,22	gi 254772668	RecName: Full=Long neurotoxin 1; Short=LNTX-1; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
7	0,00	8,01	40,22	gi 118151706	LNTX-1 precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
8	6,89	14,89	70,59	gi 129413	RecName: Full=Phospholipase A2, taipoxin alpha chain; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	Oxyuranus scutellatus scutellatus
9	6,00	26,00	69,86	gi 66475090	OS6 precursor [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
9	0,00	24,00	68,49	gi 66475092	OS7 precursor [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
10	6,00	10,00	56,82	gi 239977265	RecName: Full=Venom protease inhibitor 1; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
10	0,00	10,00	56,82	gi 239938649	RecName: Full=Taicatoxin, serine protease inhibitor component; Short=TCX; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
10	0,00	10,00	56,82	gi 185533608	taicatoxin serine protease inhibitor precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
10	0,00	10,00	56,82	gi 129919019	venom protease inhibitor precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
10	0,00	10,69	62,50	gi 239977272	RecName: Full=Venom protease inhibitor 2; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
10	0,00	10,69	62,50	gi 129919043	venom protease inhibitor precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
11	4,96	4,96	75,00	gi 348613	alpha-neurotoxin-like taicatoxin component - Australian taipan (fragment)	Oxyuranus scutellatus scutellatus
11	0,00	4,96	75,00	gi 263548	taicatoxin alpha-neurotoxin-like component {N-terminal} [Oxyuranus scutellatus=Australian taipan snakes, ssp. scutellatus, venom, Peptide Partial, 28 aa]	Oxyuranus scutellatus
12	4,00	4,00	53,33	gi 71725729	venom natriuretic peptide OsNP-d precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
12	0,00	4,00	53,33	gi 123916490	RecName: Full=Natriuretic peptide OsNP-d; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
12	0,00	4,00	29,73	gi 189047090	RecName: Full=Peptide TNP-b; AltName: Full=Taipan natriuretic peptide; AltName: Full=Venom natriuretic peptide OxsSNPb; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
12	0,00	2,00	88,57	gi 32363244	RecName: Full=Peptide TNP-b; AltName: Full=Taipan natriuretic peptide; AltName: Full=Venom natriuretic peptide OxsSNPb	Oxyuranus scutellatus canni
12	0,00	2,00	88,57	gi 32363241	RecName: Full=Peptide TNP-a; AltName: Full=Taipan natriuretic peptide; AltName: Full=Venom natriuretic peptide OxsSNPa	Oxyuranus scutellatus canni
12	0,00	2,00	88,57	gi 32363240	RecName: Full=Peptide TNP-a; AltName: Full=Taipan natriuretic peptide; AltName: Full=Venom natriuretic peptide OxsSNPa	Oxyuranus scutellatus scutellatus
12	0,00	2,00	28,21	gi 32363246	RecName: Full=Peptide TNP-c; AltName: Full=Taipan natriuretic peptide; AltName: Full=Venom natriuretic peptide OxsSNPc	Oxyuranus scutellatus canni
13	4,00	4,00	37,35	gi 239977119	RecName: Full=Scutellin-3; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
13	0,00	4,00	37,35	gi 185534290	scutellin-3 precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
13	0,00	4,00	37,35	gi 157683297	scutellin-3 precursor [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus
14	2,00	4,00	29,73	gi 66475094	natriuretic peptide [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
14	0,00	4,00	29,73	gi 189047090	RecName: Full=Peptide TNP-b; AltName: Full=Taipan natriuretic peptide; AltName: Full=Venom natriuretic peptide OxsSNPb; Flags: Precursor	Oxyuranus scutellatus scutellatus
15	2,00	4,00	12,50	gi 66475086	gamma taipoxin-2 precursor [Oxyuranus scutellatus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus scutellatus
15	0,00	4,00	14,29	gi 129446	RecName: Full=Phospholipase A2, taipoxin gamma chain; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	Oxyuranus scutellatus scutellatus
16	2,00	2,00	3,27	gi 145982762	scutellatease-1 [Oxyuranus scutellatus]	Oxyuranus scutellatus

Table 1: list of identified proteins in the fraction 9 of *Oxyuranus scutellatus*

N: rank of the specified protein relative to all other proteins in the list of detected proteins.

Unused (ProtScore): measure of the protein confidence for a detected protein, calculated from the peptide confidence for peptides from spectra that have not already been completely "used" by higher scoring winning proteins. Total (ProtScore): measure of the total amount of evidence for a detected protein. The Total ProtScore is calculated using all of the peptides detected for the protein. % Cov (% Coverage): number of amino acids matching to at least one identified peptide divided by the total number of amino acids in the protein sequence, expressed as a percentage. Accession: accession number for the protein. Name: name of the protein. Species: species for this protein.

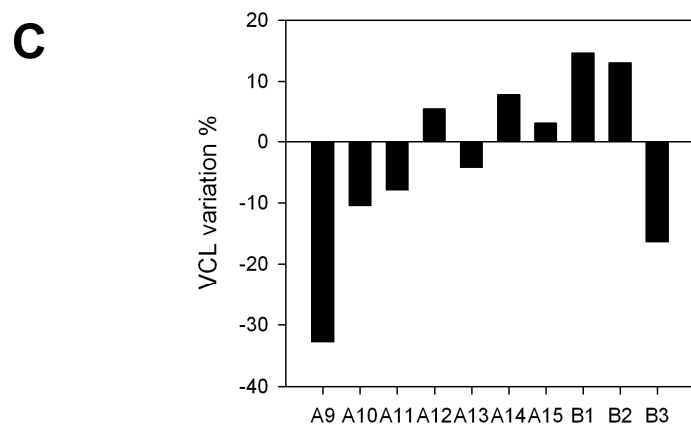
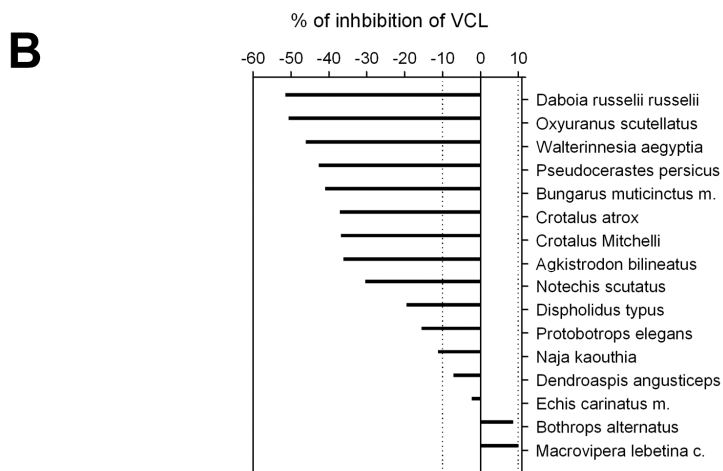
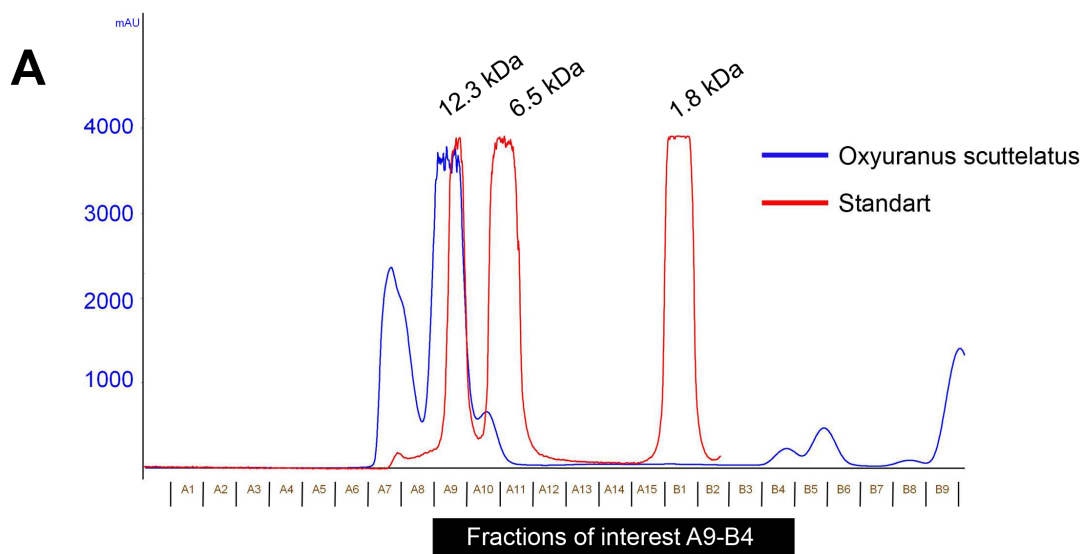
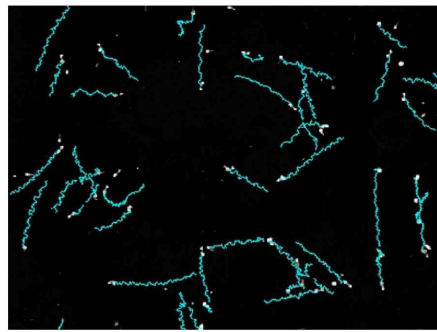
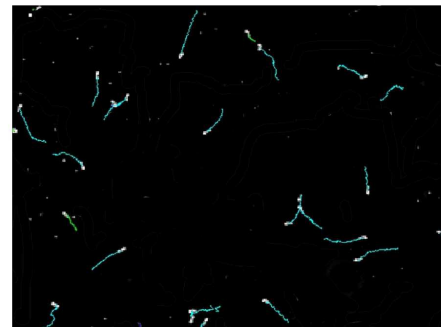
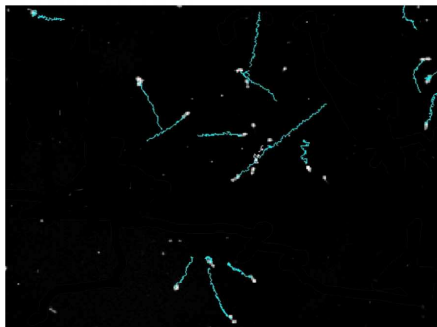


Figure 1: Snake venoms modulate sperm motility

A. Venoms have been separated by size exclusion chromatography and fractions containing molecules above 15 kDa (A1-A8) have been discarded and not tested. Example of the separation of the crude venom of *Oxyuranus scutellatus* (blue curve). A calibration run using cytochrom C (12.3 kDa), aprotinin (6.5 kDa) and vit B12 (1.8 kDa) is presented (red curve). Fractions of interest, corresponded to fraction A9-B4, were pooled in the global activity test presented in panel B of figure 1 **B.** Global activity test of 16 different venoms on sperm motility (VCL) performed with pooled fractions (A9-B4), containing molecules below 15 kDa. **C.** Effect of the different fractions of *Oxyuranus scutellatus* on sperm motility.

A

Control

**B**

+ 200 nM OS1

C

+ 200 nM OS2

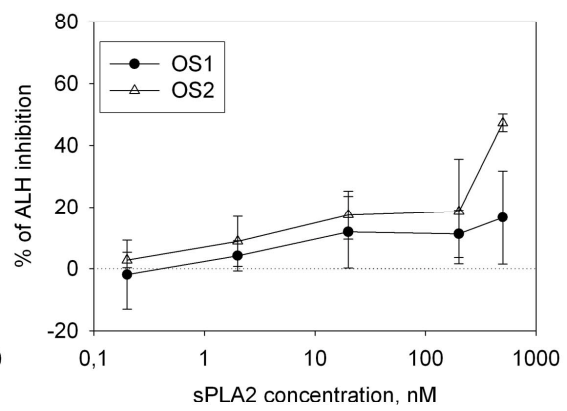
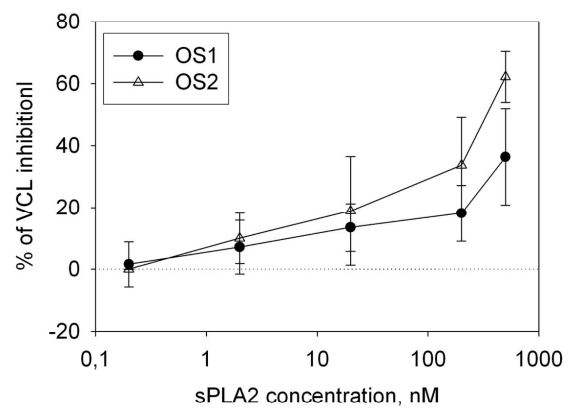


Figure 2, Escoffier et al.

Figure 2: OS1 and OS2, two sPLA2s of the venom of *Oxyuranus scutellatus* inhibit sperm motility

A. Tracks of the position of the head of non capacitated sperm measured by a CASA system in three conditions: control (non treated) sperm, sperm treated with OS1 sPLA2 and sperm treated with OS2 sPLA2. **B.** Dose-response curves corresponding to the inhibition of VCL and ALH by the two sPLA2 OS1 and OS2.

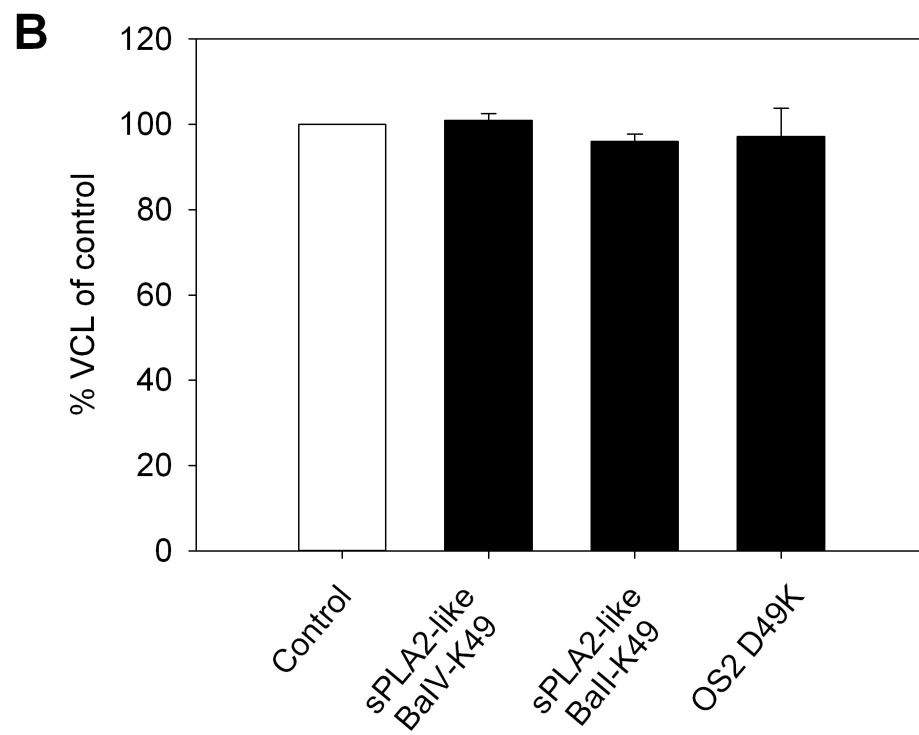
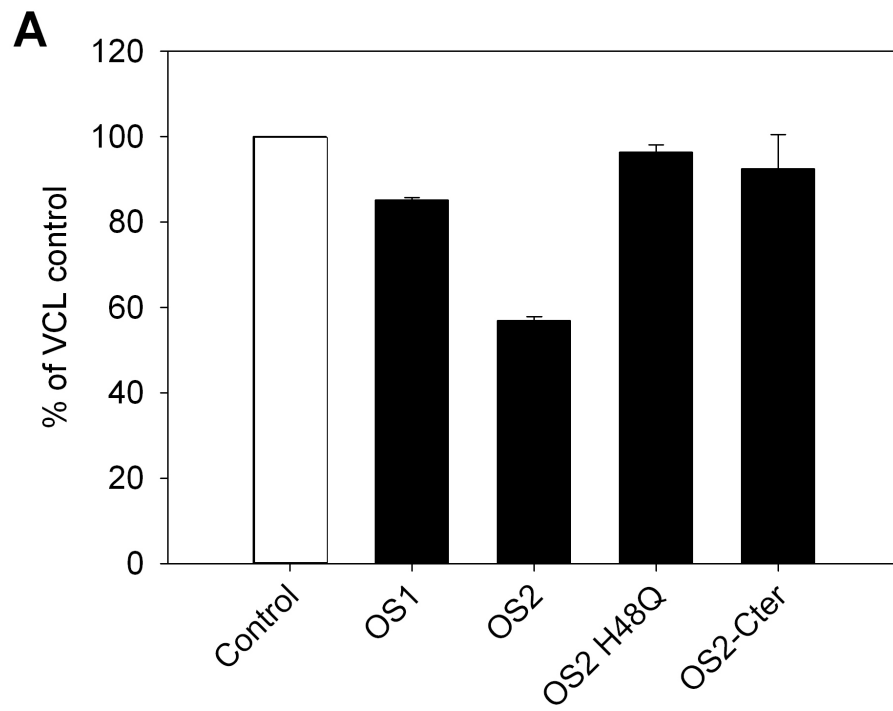


Figure 3. Escoffier et al, 2009

Figure 3: Inhibition of sperm motility by OS2 is dependent of its enzymatic activity

A. Comparison of the effect of OS1, OS2, OS2-H48Q (catalytically inactive mutant) and OS2-Cter (catalytically inactive OS2-OS1 chimera) on sperm motility at 200 nM. **B.** Comparison of the effect of different myotoxins (BaII-K49 and BaIV-K49 are both myotoxins from the venom of *Bothrops asper*) and OS2-D49K (catalytically inactive mutant) on sperm motility.

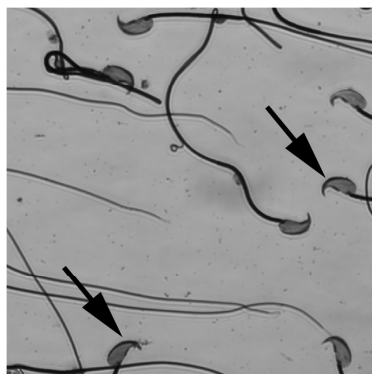
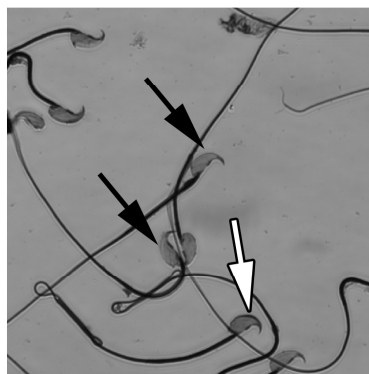
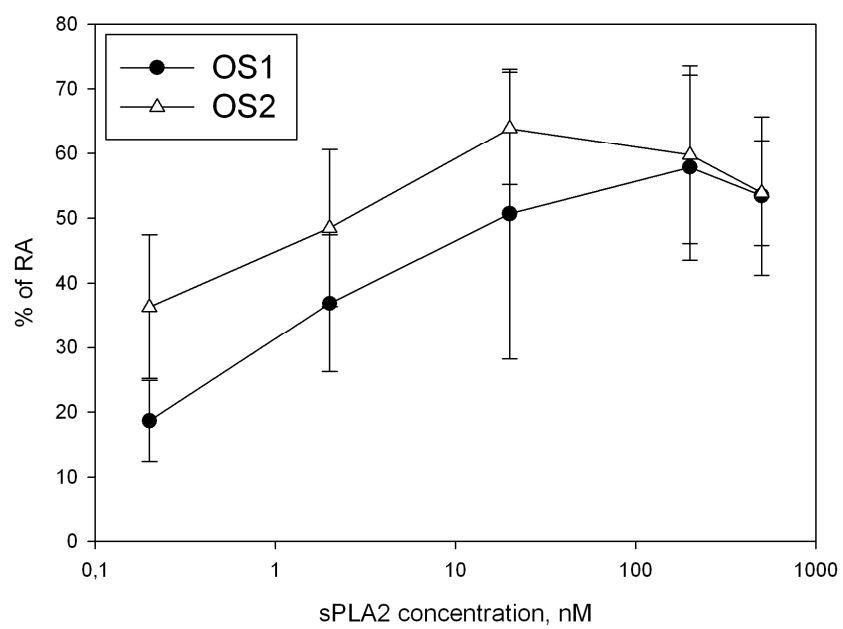
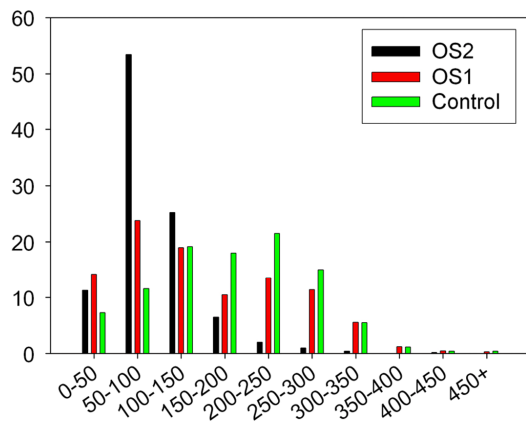
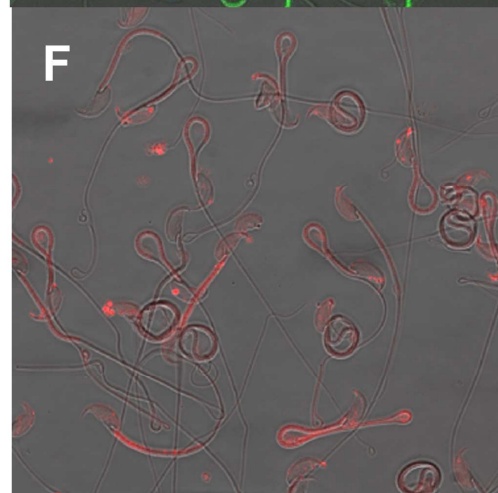
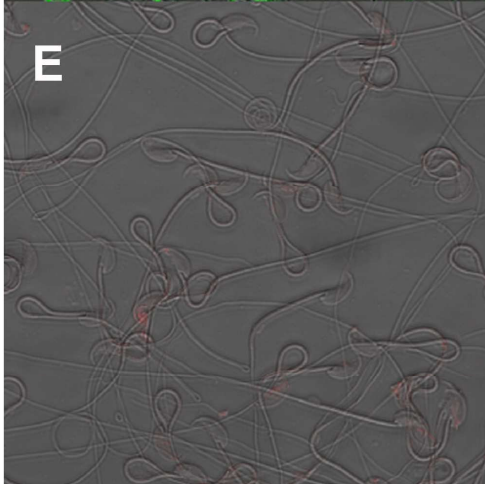
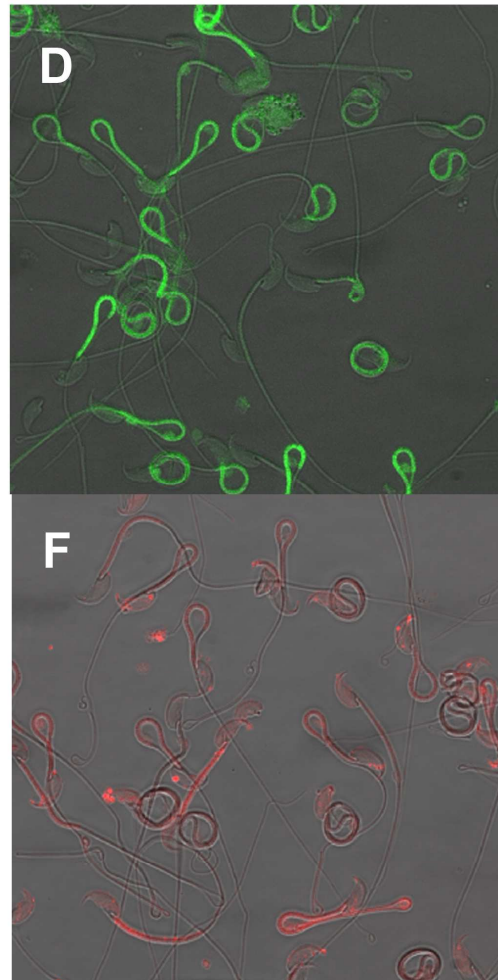
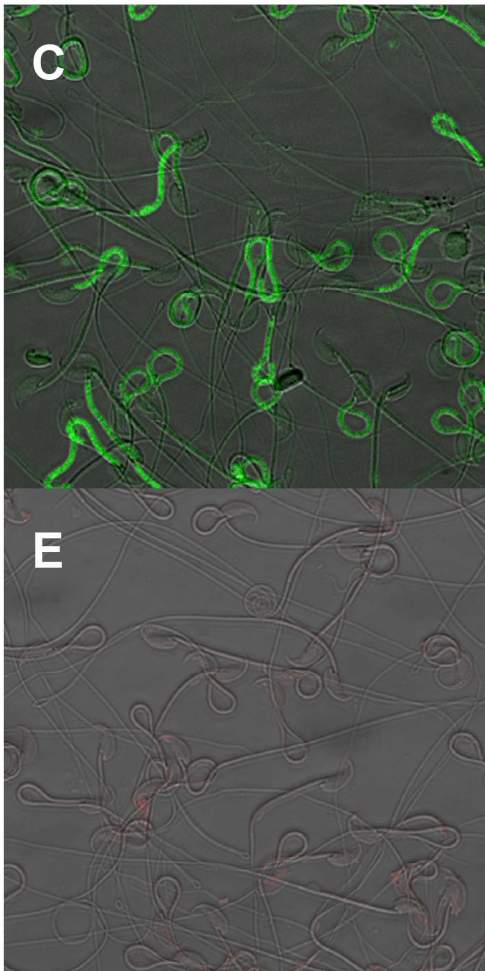
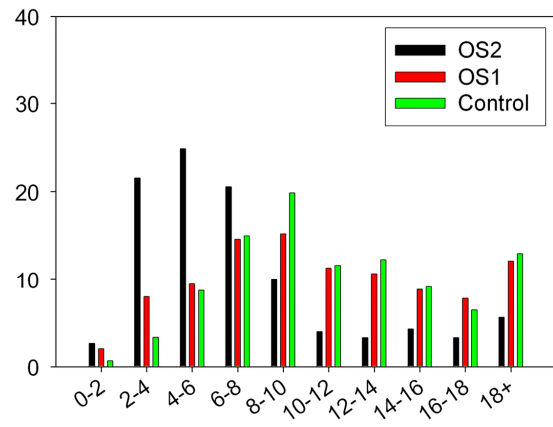
A**Control****B****+ OS2****C**

Figure 4: OS2 is a potent activator of acrosome reaction

A. Image of non capacitated control sperm: most sperm are non-acrosome reacted and exhibit dark staining in the apical head (arrows). **B.** Image of sperm incubated 10 min in the presence of 200 nM OS2: most sperm are acrosome reacted, as indicated by the absence of a stained region in the apical head (black arrows). Note that some sperm are not acrosome reacted (white arrows) **C.** Dose response curves corresponding to the acrosome reaction triggered by OS1 and OS2.

A**B**

Escoffier et al, Figure 5

Figure 5: OS2 does not induce a sperm death and trigger externalization of phosphatidylserine.

A,B. Distribution of the different subpopulations of sperm in function of the VCL or ALH of non treated sperm (control red bars) and OS2-treated sperm (black bars). **C,D.** Image of non-capacitated sperm incubated in the presence of carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) for 15 min, after a 10 min pre-incubation with control medium (C) or in the presence of 200 nM OS2 (D). **E,F.** Image of non-capacitated sperm incubated in the presence of annexin-V for 15 min, after a 10 min pre-incubation with control medium (E) or in the presence of 200 nM OS2 (F).

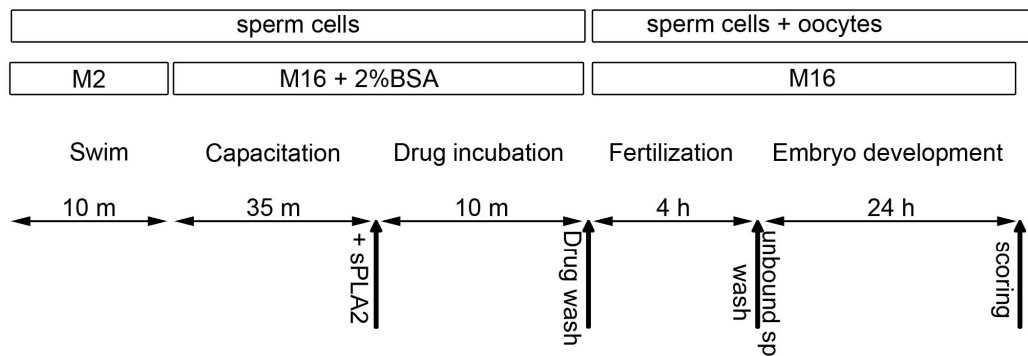
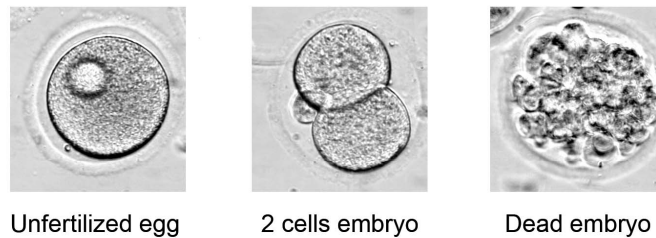
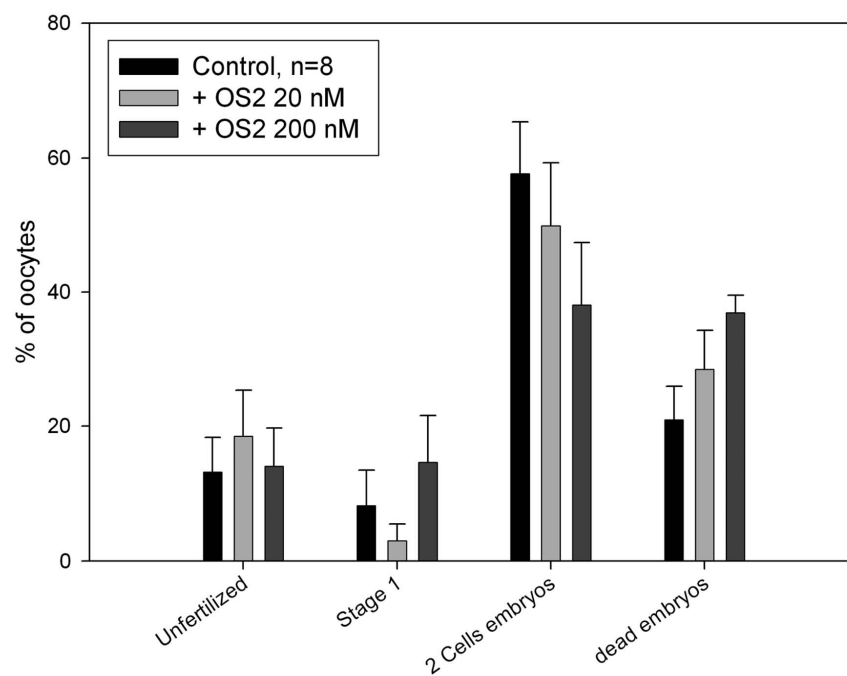
A**B****C**

Figure 6, Escoffier et al

Figure 6: OS2 inhibits *in vitro* fertilization

A. Schematic drawing of typical IVF experiment. Sperm were first capacitated for 35 min in M16-2% BSA and then incubated for the last 10 min with M16 medium containing 20 nM or 200 nM OS2. After treatment, sperm were washed by centrifugation to remove unbound OS2, putative catalytic products and all acrosomal compounds released during sPLA₂-induced AR. Finally, washed sperm were introduced into droplets containing oocytes (20-85 oocytes per experiment). After 4 hours of gamete mixing, unbound sperm were washed away and IVF outcomes were scored at 24 h. **B.** Pictures of the different stages obtained after IVF at 24 hours: unfertilized oocytes; 2-cell embryos (normal development); aborted embryos corresponding to oocytes with either multiple and uncontrolled divisions or presenting a second polar body (2 PB) but no cell division (not shown). **C.** outcomes of *in vitro* fertilization performed either with control sperm or with sperm treated briefly with 20 or 200 nM OS2.

Reference List

1. Auger J., Kunstmann J.M., Czyglik F. & Jouannet P. (1995) *N.Engl.J.Med.* 332, 281-285
2. Sharpe R.M. & Skakkebaek N.E. (1993) *Lancet.* 341, 1392-1395
3. Esposito G., Jaiswal B.S., Xie F., Krajnc-Franken M.A., Robben T.J., Strik A.M., Kuil C., Philipsen R.L., van Duin M., Conti M. & Gossen J.A. (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101, 2993-2998
4. Escalier D. (2006) *Hum.Reprod.Update.* 12, 449-461
5. Dieterich K., Soto R.R., Faure A.K., Hennebicq S., Ben Amar B., Zahi M., Perrin J., Martinez D., Sele B., Jouk P.S., Ohlmann T., Rousseaux S., Lunardi J. & Ray P.F. (2007) *Nat.Genet.* 39, 661-665
6. Salicioni A.M., Platt M.D., Wertheimer E.V., Arcelay E., Allaire A., Sosnik J. & Visconti P.E. (2007) *Soc.Reprod.Fertil.Suppl.* 65:245-59., 245-259
7. Jungnickel M.K., Sutton K.A. & Florman H.M. (2003) *Cell* 114, 401-404
8. Flockerzi V., Oeken H.J., Hofmann F., Pelzer D., Cavalie A. & Trautwein W. (1986) *Nature.* 323, 66-68
9. Inoue N., Ikawa M., Isotani A. & Okabe M. (2005) *Nature* 434, 234-238
10. Hugues M., Romey G., Duval D., Vincent J.P. & Lazdunski M. (1982) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79, 1308-1312
11. Bourinet E., Soong T.W., Sutton K., Slaymaker S., Mathews E., Monteil A., Zamponi G.W., Nargeot J. & Snutch T.P. (1999) *Nat.Neurosci.* 2, 407-415
12. Ménez A., Gillet D. & Grishin E. (2005) in: *Recent Research Developments on Toxins from Bacteria and Other Organisms* (D.Gillet and L.Johannes, ed.), Research Signpost, Trivandrum, India,
13. Rouault M., Rash L.D., Escoubas P., Boilard E., Bollinger J., Lomonte B., Maurin T., Guillaume C., Canaan S., Deregnacourt C., Schrevel J., Doglio A., Gutierrez J.M., Lazdunski M., Gelb M.H. & Lambeau G. (2006) *Biochemistry.* 45, 5800-5816
14. Lambeau G., Barhanin J., Schweitz H., Qar J. & Lazdunski M. (1989) *J.Biol.Chem.* 264, 11503-11510
15. Francis B., Gutierrez J.M., Lomonte B. & Kaiser I.I. (1991) *Arch.Biochem.Biophys.* 284, 352-359
16. Escoffier J., Jemel I., tanemoto A., Taketomi Y., Coatrieux C., Sato H., Yamamoto K., Masuda S., Pernet-Gallay K., Pierre V., Hara S., Murakami M., De Waard M., Lambeau G. & Arnoult C. (2009) *J.Clin.Invest.* in press,
17. Singer A.G., Ghomashchi F., Le Calvez C., Bollinger J., Bezzine S., Rouault M., Sadilek M., Nguyen E., Lazdunski M., Lambeau G. & Gelb M.H. (2002) *J.Biol.Chem.* 277, 48535-48549
18. Nicolas J.P., Lin Y., Lambeau G., Ghomashchi F., Lazdunski M. & Gelb M.H. (1997) *J.Biol.Chem.* 272, 7173-7181
19. Rigoni M., Caccin P., Gschmeissner S., Koster G., Postle A.D., Rossetto O., Schiavo G. & Montecucco C. (2005) *Science.* 310, 1678-1680

20. Janssen M.J., van de Wiel W.A., Beiboer S.H., van Kampen M.D., Verheij H.M., Slotboom A.J. & Egmond M.R. (1999) *Protein Eng.* 12, 497-503
21. dos Santos J.I., Soares A.M. & Fontes M.R. (2009) *J.Struct.Biol.* 167, 106-116
22. Zhou X., Tan T.C., Valiyaveetil S., Go M.L., Kini R.M., Velazquez-Campoy A. & Sivaraman J. (2008) *Biophys.J.* 95, 3366-3380
23. Escoffier J., Ray P.F., De Waard M., Lambeau G. & Arnoult C. (2009) *in preparation*
24. Valentin E. & Lambeau G. (2000) *Biochimie.* 82, 815-831
25. Kumar J.R., Basavarajappa B.S., Arancio O., Aranha I., Gangadhara N.S., Yajurvedi H.N. & Gowda T.V. (2008) *Biochimie.* 90, 1545-1559
26. Masuda S., Murakami M., Matsumoto S., Eguchi N., Urade Y., Lambeau G., Gelb M.H., Ishikawa Y., Ishii T. & Kudo I. (2004) *Biochim.Biophys.Acta.* 1686, 61-76
27. Sato H., Taketomi Y., Isogai Y., Miki Y., Yamamoto K., Hosono T., Arata S., Ishikawa Y., Ishii T., Kobayashi T., Nakanishi H., Ikeda K., Taguchi R., Hara S., Murakami M. & Kudo I. (2009) *J.Clin.Invest.* co-submission,
28. Bao S., Miller D.J., Ma Z., Wohltmann M., Eng G., Ramanadham S., Moley K. & Turk J. (2004) *J.Biol.Chem.* 279, 38194-38200
29. Ollero M., Gil-Guzman E., Lopez M.C., Sharma R.K., Agarwal A., Larson K., Evenson D., Thomas A.J., Jr. & Alvarez J.G. (2001) *Hum.Reprod.* 16, 1912-1921
30. Zalata A., Hassan A., Christophe A., Comhaire F. & Mostafa T. (2009) *Int.J.Androl.*
31. Grunewald S., Reinhardt M., Blumenauer V., Said T.M., Agarwal A., Abu H.F., Glander H.J. & Paasch U. (2008) *Fertil.Steril.*

2. Discussion

Afin de trouver de nouveaux outils pharmacologiques qui régulent la physiologie spermatique, nous avons testé l'effet de fractions biologiques, obtenues à partir de 16 venins de serpent appartenant à des familles différentes (élapidé, vipéridés, Colubidé), sur la mobilité spermatique. Nous nous sommes concentrés sur les fractions les plus actives obtenues à partir du venin de serpent *Oxyuranus Scutellatus*. L'analyse protéomique des fractions actives du venin de serpent *Oxyuranus scutellatus*, nous a permis d'identifier deux composés majoritaires : deux sPLA₂, nommées OS1 et OS2.

Après avoir identifié les sPLA₂ comme les molécules actives sur la mobilité spermatique, par analyse protéomique, nous avons ensuite évalué l'effet des sPLA₂ de venin sur les différentes étapes de la physiologie spermatique (mobilité, réaction acrosomique et FIV), par l'intermédiaire du Dr Gérard Lambeau qui nous a fourni les sPLA₂ de venin (OS1 et OS2).

Utilisation des sPLA₂ purifiées et des formes recombinante de OS2 nous a permis de mettre en évidence que :

- OS1 et OS2 sont de puissants inhibiteurs de la mobilité spermatique (diminution de 40 % de la mobilité), de puissants activateurs de la réaction acrosomique (augmentation de 60 % de RA) et de puissants inhibiteurs de la fécondation *in vitro* (diminution d'environ 34 % du taux de FIV).
- La modulation de la mobilité spermatique par OS2 est effectuée *via* son activité enzymatique, car les isoformes inactifs d'OS2, OS2-H48Q et OS2 C-term, ont été incapables de moduler la mobilité des spermatozoïdes.
- La diminution de la mobilité spermatique par OS2 n'est pas liée à une perte de la viabilité des spermatozoïdes, mais à une modification de la composition lipidique de la membrane plasmique.

La recherche de nouveaux outils pharmacologiques dans les venins par des tests activités biologiques nous a permis de mettre en évidence une voie de régulation de la physiologie spermatique *via* les phospholipases A2 sécrétées.

Dix gènes de PLA₂ sécrétés différents ont été décrits à ce jour chez la souris, correspondant aux groupes d'IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X et XIIA-sPLA₂. L'identification de ces nombreuses sPLA₂ a été effectuée par homologie de séquences avec les sPLA₂ de venin (Valentin and Lambeau 2000). À l'heure actuelle, de nombreuses études ont montré que les sPLA₂ de mammifères étaient largement exprimées dans de nombreux tissus et organes (Lambeau and Gelb 2008), mais leur rôle physiologique reste encore largement inconnu.

Les sPLA₂ de mammifères ne pourraient-elles pas comme la sPLA₂ OS2 de venins réguler les étapes de la physiologie spermatique ?

II. Évaluation du rôle des sPLA₂ de mammifère dans la physiologie spermatique

3. Introduction

Les phospholipases A₂ (PLA₂) sont des enzymes qui hydrolysent la liaison ester des phospholipides membranaires en position *sn*-2, produisant ainsi des lysophospholipides et des acides gras libres. Ce clivage des phospholipides est à l'origine de la synthèse des médiateurs lipidiques.

Les organes reproducteurs mâles présente un large panel de sPLA₂: les cellules spermatogéniques, l'épididyme, le vas déférent et les vésicules séminales expriment les sPLA₂ des groupes IIC, IID, IIE, IIF, en V et X-sPLA₂; la prostate exprime les sPLA₂ des groupes IIC, IID, IIE et IIF-sPLA₂ et le spermatozoïde mature exprime les sPLA₂ des groupes IID, IIC, V, X et IIF (Masuda, Murakami et al. 2004).

Comme je vous l'ai expliqué dans l'introduction, il y a, malheureusement, peu d'informations sur le rôle des sPLA₂ au niveau de la physiologie spermatique des mammifères. Les études jusqu'alors réalisées montrent que les sPLA₂ pouvaient avoir un rôle dans le mécanisme de la réaction acrosomique (Roldan and Fragio 1993 ; Garde and Roldan 1996) ; (Lui and Meizel 1979; Ono, R. Yanagimachi et al. 1982 ; Llanos, Morales et al. 1993) ; (Singleton and Killian 1983) ; (Fry, Ghosh et al. 1992) (Llanos, Morales et al. 1993; Garde and Roldan 1996); (Riffo and Parraga 1996), la mobilité flagellaire et l'interaction gamétique (Bao, Miller et al. 2004), mais leurs fonctions dans ces mécanismes restent à l'heure actuelle inconnus.

Nous nous sommes demandés pourquoi un tel panel de sPLA₂ était présent au niveau du spermatozoïde. Quelle est l'implication réelle de ces phospholipases sPLA₂ dans la physiologie spermatique ? Les sPLA₂ de mammifères ne pourraient-elles pas comme les phospholipases de venins réguler les étapes de la physiologie spermatique ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons regardé l'effet des différents sPLA₂ de mammifères sur deux étapes clés de la physiologie spermatique : la mobilité flagellaire (cf Article 2) et la réaction acrosomique (cf Article 3).

Article 2: Mammalian Group X secreted phospholipase A2 regulates specifically sperm motility

Jessica Escoffier, Ikram Jemel, Michel De Waard, Gérard Lambeau and Christophe Arnoult.

Article en préparation

Mammalian Group X secreted phospholipase A2 regulates specifically sperm motility

Jessica Escoffier¹, Ikram Jemel², Michel De Waard¹, Gérard Lambeau² and Christophe Arnoult^{1*}

1Inserm U.836 Grenoble Institut of Neurosciences
Equipe 3 “Calcium channels, functions and pathologies”
Bâtiment Edmond J. Safran, Site Santé à La Tronche
BP 170 38042 Grenoble Cedex 9 - France

2 Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS - UMR 6097
Université de Nice-Sophia Antipolis
660 route des Lucioles, Sophia Antipolis
06560 Valbonne – France

* Corresponding author tel: 33 456 520 564 - E-mail: christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

Abstract

Different mammalian sPLA2 are expressed in reproductive male organ and/or in sperm cell but the physiological relevance is still a debated question. In mouse, group X phospholipase A2 (mGX) modulated an important sperm function that is sperm motility, contrary to others sPLA2s tested. By computer assisted sperm analysis (CASA) technique, we show that this enzyme decreased both the track speed (VCL) and the lateral displacement of the head (ALH) of non capacitated motile sperm by 30% and 17% respectively. The enzymatic activity of mGX is required for sperm motility inhibition since H48Q-mGX and pro-mGX, two non-catalytic active isoforms of mGX, were unable to modulate sperm motility. Moreover LY329722, a specific inhibitor of mGX blocked the inhibition of mGX on sperm motility. Sperm motility of capacitated sperm is also decreased but depends of a different molecular mechanism. This change of molecular mechanism is likely due to enzymatic action of mGX on different glycerophospholipids present in the plasma membrane. Indeed, we shows that mGX action on glycerophosphatidylserine in the external leaflet of the plasma membrane changes during capacitation. In conclusion, this paper demonstrates that sperm motility is regulated by glycerophospholipids composition of the plasma membrane, which is changed by mGX.

INTRODUCTION

The molecular pathways involved in sperm flagellum beat are complex and still badly understood. If several aspects of sperm flagellum beat, like the molecular structure of the axonema (Escalier, 2006), the molecular machinery involved in microtubules sliding via the macromolecular dynein complex (Esposito et al, 2004) or the control of flagellum beat by Ca^{2+} (Ren et al, 2001; Castellano et al, 2003; Ho and Suarez, 2003; Schuh et al, 2004), have been more particularly studied, the importance of the lipid composition of the plasma membrane and the roles of lipid metabolism in sperm motility have been poorly explored. Nevertheless several reports suggest that lipids are important for sperm motility. For instance, sperm from male deficient in group VIA intracellular phospholipase A2 (iPLA2 β) or group III secreted phospholipase A2 (mGIII-sPLA2) present a strong decrease of their motility (Bao et al, 2004; Sato et al, 2009). Moreover, platelet-activating factor (PAF; ether phospholipid 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine), is secreted during capacitation and increases sperm motility via a PAF receptor (Roudebush, 2001; Wu et al, 2001), underlining the

importance of lipids metabolism in sperm motility. These results suggest that lipid rearrangement or lipid metabolites are important for flagellum beat, in order either to change membrane fluidity or to control key proteins involved in flagellum beat. Besides astenozoospermia (sperm with low motility) is associated in human with a defective sperm plasma membrane composition with an excess of cholesterol and desmosterol (Montell, 1997; Buffone et al, 2009), a low concentration of specific fatty acid like decosahexaenoic acid found in different phospholipids (Gulaya et al, 2001) and a overall increase of fatty acid content (Ollero et al, 2001; Aksoy et al, 2006).

Irrespective of the above, capacitation of sperm leads to major reorganization of the plasma membrane with lipid remodelling and formation of membrane subdomains (Gadella and Harrison, 2000; Jones et al, 2007; Gadella et al, 2008). Cholesterol efflux is the most well-known modification of the plasma membrane and plays a major role in sperm maturation both *in vivo* and *in vitro* (Visconti et al, 1999; Travis and Kopf, 2002). Other major changes during capacitation include efflux of desmosterol, changes in sterol sulfates, phospholipids, sphingomyelin and ceramides, and finally remodeling of lipid rafts (Travis and Kopf, 2002; Buffone, Verstraeten, Calamera, and Doncel, 2009; Zalata et al, 2009). All these events likely contribute to increase membrane fluidity by changing lipid packing and contribute to increase heterogeneity of the sperm population. If obviously different families of lipolytic enzymes are involved in these lipid rearrangements (Wang et al, 2004), phospholipases A2 (PLA2) are good candidates, because of their large diversity of action in phospholipid remodeling and lipid mediator release in a large set of biological functions (Lambeau and Gelb, 2008).

PLA2 is a large family of enzymes, and in function of their locations, they have been split in two groups: intracellular and secreted PLA2s (Schaloske and Dennis, 2006). In the intracellular PLA2 group, three different families of enzymes are present: the cytosolic PLA2s (cPLA2s or also named group IV PLA2s) which are calcium dependent enzymes, iPLA2s (also named group VIA PLA2s) and PAF-acetylhydrolase (also named group VIIIB PLA2s), both group being calcium independent. For secreted PLA2s (sPLA2), ten different genes have been described in mouse so far, corresponding to the groups of IB-, IIA-, IIC-, IID-, IIE-, IIF-, III-, V-, X- and XIIA-sPLA2 (labelled mGy for **m**ouse **g**roup **y**-sPLA2). In male reproductive organs, both intracellular and secreted phospholipase A2 have been described (Bao, Miller, Ma, Wohltmann, Eng, Ramanadham, Moley, and Turk, 2004; Masuda et al, 2004; Koizumi et al, 2003; Yan et al, 2003). Concerning the sPLA2, a wide range of different groups is expressed. Spermatogenic cells, epididymis, vas deferens and seminal vesicle express sPLA2

of the groups IIC, IID, IIE, II-, V and X; epididymis express sPLA2 of the groups IIC, IID, IIE, IIF, III, V and X; prostate express groups IIC, IID, II- and IIFs and mature sperm X-sPLA2 {Masuda, Murakami, et al. 2004 502 /id}(Sato, Taketomi, Isogai, Miki, Yamamoto, Hosono, Arata, Ishikawa, Ishii, Kobayashi, Nakanishi, Ikeda, Taguchi, Hara, Murakami, and Kudo, 2009;Escoffier et al, 2009). The reasons for such a diversity of sPLA2s expression in the different components of the genital male organs, and for most of them, their specific cellular functions are unknown so far. Deciphering the specific roles of each PLA2 involved in male reproduction is a challenging goal. Recent studies point out specific roles for mGIII and mGX: mGIII is involved in sperm lipid homeostasis in the epididymis and lack of this sPLA2 leads to defective sperm (Sato, Taketomi, Isogai, Miki, Yamamoto, Hosono, Arata, Ishikawa, Ishii, Kobayashi, Nakanishi, Ikeda, Taguchi, Hara, Murakami, and Kudo, 2009) and mGX is present in the acrosome of mature sperm and paracrine secretion of mGX during sperm capacitation promotes an anticipated acrosome reaction that excludes a sperm subpopulation from fertilization (Escoffier, Jemel, tanemoto, Taketomi, Coatrieux, Sato, Yamamoto, Masuda, Pernet-Gallay, Pierre, Hara, Murakami, De Waard, Lambeau, and Arnoult, 2009).

Concerning the enzymatic activity, the sPLA2 family is characterized by its ability to hydrolyse the *sn*-2 ester of glycerophospholipids of the extracellular leaflet of the plasma membrane in two components, a fatty acid (FA) and a lysophospholipid (LysoPL). These both compounds have the ability to leave the plasma membrane. Because FAs rapidly equilibrate between both leaflets of the membrane bilayers, they diffuse into the cytoplasm and control different cellular signalling pathways as second messengers. By contrast, LysoPLs accumulate in the outer leaflet. However, the lysophospholipid contains a polar group (glycerophospho head) and a more lipophil group (fatty acid in position 1 on the glycerol). In function of the size of its fatty acid, the lysophospholipid may be able to leave the membrane and may act as a bioactive metabolite in different extracellular pathways in an autocrine or paracrine mode.

Here, we evaluated the effect of some different mammalian secreted phospholipase A2 known to be present in male reproductive organs, like mGIIA, mGIID-, mGIIE-, mGV- and mGX-sPLA2 {Masuda, Murakami, et al. 2004 502 /id} or in female tract like mGIIE (Valentin et al, 1999) on sperm motility. By using different strategies (modified inactive sPLA2, specific inhibitors), we showed for the first time that mouse sperm motility is specifically modulated by the enzymatic activity of mGX-sPLA2.

MATERIAL AND METHODS

Computer-assisted motility analysis — Sperm cells from caudae epididymes were allowed to swim in 1 ml of M2 medium for 10 min. sperm was re-suspended in M16 and incubated with different sPLA2 at 37°C for 10 min. After incubation, the sperm suspension was immediately placed onto analysis chamber (2X-CEL Slides, 100 µm depth, Leja Products B.V., Netherlands) kept at 37 °C for microscopic quantitative study of sperm movement. Sperm motility parameters were measured at 37°C using a sperm analyzer (Hamilton Thorn Research, Beverley). The settings employed for analysis were as follows: acquisition rate: 60 Hz; number of frames: 100; minimum contrast: 25; minimum cell size: 10; low static-size gate: 2.4; high static-size gate: 2.4; low static-intensity gate: 1.02; high static-intensity gate: 1.37 ; minimum elongation gate: 12; maximum elongation gate: 100; magnification factor: 0.70. The motility parameters measured were: curvilinear velocity (VCL) and amplitude of lateral head displacement (ALH). A minimum of 100 motile spermatozoa for each sample was analyzed.

Production of recombinant sPLA2s — Recombinant mouse sPLA2s group IIA, IID, IIE, V and X and the H48Q mutant mGX sPLA2 were produced as described previously (Rouault et al, 2007; Singer et al, 2002). Pro-mGX sPLA2 was produced as for WT mature mGX sPLA2 using the pAB3 vector in which the full-length cDNA coding for Pro-mGX was inserted in frame with the ΔGST protein and the factor Xa cleavage site, which were removed from Pro-mGX sPLA2 by using the factor Xa protease (Rouault, Le Calvez, Boilard, Surrel, Singer, Ghomashchi, Bezzine, Scarzello, Bollinger, Gelb, and Lambeau, 2007).

Chemical compounds — M2 and M16 medium were purchased from Sigma.

PMSG is from Ceva santé animal and HCG is from Intervet. BSA, Cohn Fraction V and processed to reduce fatty acid content was from Sigma.

RESULTS

mGX inhibits specifically sperm motility among 5 mammalian sPLA2

During its short life, sperm are confronted with several sPLA2, either with sPLA2 of epididymal or prostatic origins in seminal plasma (Masuda, Murakami, Matsumoto, Eguchi, Urade, Lambeau, Gelb, Ishikawa, Ishii, and Kudo, 2004) or with PLA2 secreted by sperm itself during acrosome reaction (Lessig et al, 2008), (Escoffier, Jemel, tanemoto, Taketomi, Coatrieux, Sato, Yamamoto, Masuda, Pernet-Gallay, Pierre, Hara, Murakami, De Waard, Lambeau, and Arnoult, 2009). We thus evaluated the effect of 5 different mammalian sPLA2 known to be present in female or male genital tractus (mGIIA, mGIID, mGIIE, mGV and mGX) on motility of sperm, using computer assisted sperm analysis (CASA). Sperm tracks are characterized with CASA system by four basic parameters allowing evaluating sperm motility: the track speed (VCL), the progressive velocity (VSL), the path velocity (VAP) and the lateral displacement of the head (ALH). We focused in this study only on two parameters, the VCL and the ALH parameters. In a first set of experiments, we tested the 5 different sPLA2 on non-capacitated sperm. Figures 1A,B shows clearly that only mGX-sPLA2 was a potent modulator of VCL and ALH when incubated with uncapacitated sperm during 10 min in M16 culture medium à 37°C. In the presence of 200 nM mGX, the mean VCL is decreased by 23%, from 165.55 ± 5.44 (n=19) to 124.73 ± 6.65 $\mu\text{m/s}$ (n=16), $p < 10^{-4}$ and the mean ALH is decreased by 14%, from 11.45 ± 0.35 (n=19) to 9.81 ± 0.54 μm (n=16), $p = 0.01$. In order to better characterize the inhibitory effect of mGX on sperm motility, we determined the minimal concentration of mGX leading to the inhibitory effect. Figure 1C, presenting dose-response curves for VCL and ALH, shows that sperm motility, and more particularly VCL, was affected by doses as low as 20 nM of mGX-sPLA2.

Heterogeneous response of sperm to mGX treatment.

Sperm motility presents a high degree of heterogeneity, even in a single cell population obtained from one male. The heterogeneity was displayed by a wide range of VCL and ALH values, indicating different subpopulations of sperm. The values for VCL started from 7.5 $\mu\text{m/s}$ to values higher than 450 $\mu\text{m/s}$ in a control cell population (figure 2A, blue bars/curve). We noticed a same degree of heterogeneity for ALH, since ALH values were comprise between 0 and 20 μm (figure 2B, blue bars/curve). In this study, static sperm cells and slow cells were not counted and only sperm cells with a VAP > 7.5 $\mu\text{m/s}$ have been analyzed. An important question was to determine if mGX inhibits slow (VCL < 150 $\mu\text{m/s}$), medium (150

$\mu\text{m} < \text{VCL} < 350 \mu\text{m}$) or fast sperm subpopulations ($\text{VCL} > 350 \mu\text{m}$) with a similar potency. To address this question we first compared VCL or ALH distributions of a control and a mGX-treated sperm population and then the VCL or ALH distributions of the mGX-treated sperm population versus a theoretical distribution obtained after applying a reduction factor to the speed of each subpopulation equivalent to the mean factor of reduction for VCL or ALH obtained from the whole population of the sample. As showed in figure 2A-2B, , adding mGX-sPLA2 modified the distribution of both studied motility parameters of sperm population, by basically increasing the percentage of sperm with slow speed and low ALH (black bars/curves). We thus traced a theoretical distribution of the speed of mGX treated sperm by applying to all subpopulations an identical reduction factor corresponding to the reduction measured on the whole population sample (red line in figure 2C; in this case, mean reduction is 30%). Comparing measured and theoretical mGX treated sperm distributions shows clearly that the theoretical distribution does not fit the mGX-treated sperm distribution (figure 2C black curve versus red curve). This result strongly suggests that some subpopulations were differently affected by sPLA2 treatment, and more particularly the VCL of medium and fast sperm are less inhibited by mGX than expected. Similar calculation applied to ALH allowed us to trace a theoretical distribution corresponding to a 17% reduction of the ALH (17% is the mean factor of ALH reduction in this case) (figure 2D). Similar comparisons between the distribution of ALH of mGX-treated sperm versus the theoretical distribution strongly suggest that some subpopulations were also differently affected by sPLA2 (figure 2D). The heterogeneity of sperm population is illustrated in the tracks of figure 2E and 2F, representing the position of the head of sperm over a period of 30 s measured in control sperm and mGX treated sperm respectively.

mGX effect is dependent of sPLA2 enzymatic activity

sPLA2 have two modes of action: an enzymatic mode where they hydrolyse phospholipids or/and a ligand mode where they act as agonists for specific lectin receptors. We wondered if enzymatic activity was required for sperm motility modulation by sPLA2. First, we tested a mutated mGX-sPLA2, with a substitution of one amino acid in its enzymatic pocket, H48Q, leading to a complete loss of the enzymatic activity (Janssen et al, 1999). In figure 3, we show that the mutated mGX-sPLA2 was unable to affect sperm VCL (figure 3A) or sperm ALH (Figure 3C). mGX-sPLA2 is first synthetized as pro-mGX, a precursor molecule, which is cleaved in mGX-sPLA2 and a peptide of 11 amino acids (Cupillard et al, 1997). Pro-mGX has a very low phospholipase enzymatic activity. We tested the effect of 200 nM pro-mGX on

sperm motility and none modification have been observed on VCL and ALH (figure 3 A,C respectively). These results suggest that enzymatic activity plays a crucial role in sperm motility modulation by sPLA2. To confirm this result we tested a specific inhibitor of mGX-sPLA2 sPLA2, LY329722. This compound inhibits mGX-sPLA2 enzymatic activity with an IC_{50} of 75 nM (compound A in (Smart et al, 2006)). In presence of LY329722 at 1 μ m, mGX-sPLA2 sPLA2 is less potent to modulate VCL and ALH (figure 3B and 3D, respectively).

mGX effect is modulated during capacitation

We know that capacitation leads to an important change in the lipid composition of the plasma membrane and more particularly in phospholipids and this change could have as a consequence a modification of the nature of substrates for mGX. Because mGX catalytic activity is important for its action on sperm motility, the modification of the nature of mGX substrates could then modify the action of mGX on sperm motility. We thus wondered if mGX retained its ability to modulate sperm motility after capacitation. We first wanted to confirm that the sperm plasma membrane composition, and more particularly phospholipids, changes during capacitation and subsequently to investigate if catalytic mGX activity is modified by theses modifications. Among phospholipids, phosphatidylserines are easily identified because annexine V stains them specifically. We thus focused on this peculiar phospholipid to evidence phospholipids changes during capacitation. Before capacitation, no annexine V staining was present in sperm (figure 4A). In the other hand, a strong annexine V staining appeared after 35 min of capacitation (figure 4B). We noticed a strong staining on flagella. In the other hand, sperm head were not or weakly stained. This result demonstrates that capacitation induced by cholesterol efflux and/or bicarbonate influx leads to a modification of phospholipid asymmetry, promoting externalisation of new phospholipids at the plasma membrane of the flagella and thus promoting new substrates for sPLA2. This pattern of staining is strongly modified by mGX treatment: non capacitated sperm treated with mGX were annexine V positive (figure 4C) and capacitated sperm were annexine V negative (figure 4D). The fact that mGX produced an appearance of annexine V staining in non capacitated sperm indicates a transfert of phosphatidylserines from internal leaflet of the plasma membrane to its external leaflet. This result was interpreted as the catalytic activity of mGX on non characterized lipids of the plasma membrane of non capacitated sperm. In a similar way, the fact that mGX produced a vanishing of annexine V staining in capacitated sperm indicates that phosphatidylserines were good substrates for mGX. All together, these

results demonstrate that the set of metabolites produced by mGX on non capacitated or capacitated sperm are different. We next compared the inhibitory effect of mGX on the mobility of non capacitated versus capacitated sperm. Sperm were capacitated 90 min in 2% BSA at 37°C in a 5% CO₂ chamber and sperm motility was measured after 10 minutes incubation with mGX. Because sperm were capacitated in the presence of low fat BSA, and to avoid an artefact effect of BSA, capacitated sperm were washed with M16 before mGX incubation in order to remove BSA. Thus, non capacitated and capacitated sperm were treated with mGX in the same medium. Whereas mGX inhibited the VCL of non capacitated sperm by ~18%; $p < 10^{-3}$, $n=6$, in capacitated sperm, mGX was less potent and inhibited VCL by ~9%, $p=0.036$, $n=6$ (figure 4E).

LY329722, a specific inhibitor of mGX, increases VCL of capacitated sperm

We have previously demonstrated that mGX is released during spontaneous acrosome reaction and increase sperm fertility (Escoffier, Jemel, tanemoto, Taketomi, Coatrieux, Sato, Yamamoto, Masuda, Pernet-Gallay, Pierre, Hara, Murakami, De Waard, Lambeau, and Arnoult, 2009) by promoting spontaneous acrosome reaction. The facts that mGX is released during capacitation and the fact that recombinant mGX is able to modify sperm mobility raised the question of the control of sperm mobility by endogenous mGX. To test this hypothesis, we compared VCL and ALH of sperm treated with LY329722, the specific inhibitor of mGX during capacitation, versus non-treated sperm (control). We measured the mean VCL and ALH at various time of capacitation (0, 45 and 90 min). There were no statistically significant differences in VCL between control and LY329722 treated sperm before and after 45 min of capacitation (figure 5). In contrast, difference of VCL measured from control and LY329722 treated sperm were statistically significant ($P < 0.05$) after 90 min of capacitation: the mean VCL increased from 182.7 ± 5.1 to 191.1 ± 5.0 $\mu\text{m/s}$; $p=0.036$, $n=11$ (figure 5). This increase of 5% of the mean VCL is in good accordance with the level of inhibition induced by recombinant mGX in capacitated sperm (9%). Moreover, the fact that LY329722 did not produce any effect before the 90 minutes is consistent with the kinetic of release of the endogenous mGX during spontaneous acrosome reaction, as demonstrated previously (Escoffier, Jemel, tanemoto, Taketomi, Coatrieux, Sato, Yamamoto, Masuda, Pernet-Gallay, Pierre, Hara, Murakami, De Waard, Lambeau, and Arnoult, 2009).

DISCUSSION

The results presented in this paper are important for several reasons. First, they underline the importance of phospholipid in sperm motility, second they demonstrate that mGX present a unique feature among five different sPLA2, by decreasing sperm motility of non capacitated sperm, and finally they demonstrate that endogenous mGX released during *in vitro* capacitation controls sperm motility. Altogether, these results demonstrate that sperm motility is dependent of i/ lipid homeostatis and ii/ enzymatic activity of secreted GX PLA2

Sperm motility is controlled by sPLA2.

From our knowledge, this paper is the first showing that sperm motility is directly controlled by sPLA2 metabolism. The platelet activating factor (PAF), which is an ether phospholipid increases sperm chemotactism but no data are available concerning the effect of PAF on sperm motility parameters {Wu, Stojanov, et al. 2001 534 /id}. Finally, the disruption of the internal PLA2 VIA (iPLA2 β) gene leads to a severe motility phenotype but the direct contribution of sPLA2 to sperm flagellum beat was not demonstrated. We have previously showed that mGX is a strong inducer of acrosome reaction {Escoffier, Jemel, et al. 2009 628 /id} and an obvious question arising from the above results is: “is motility decrease due to a modification of the acrosomal status of sperm?” In figure 6, we traced on the same graph the dose-response curves for AR level and sperm motility decrease. From this figure, it is clear that AR did not induce a sperm motility decrease since there was not correlation between both phenomena. This absence of correlation is obvious, especially at low and high concentrations of mGX. For instance, at 2 nM, the motility was not affected whereas this concentration produced an increase of 30% of the number of acrosome reacted sperm.

The molecular mechanisms controlling the flagellum beat is not fully understood but two second messengers play critical roles: cAMP and Ca²⁺. The main source of Ca²⁺ is the culture medium and specific ionic channels, like CatSper {Ren, Navarro, et al. 2001 389 /id}, are involved in Ca²⁺ flux in the flagellum. Membrane potential, and more particularly the driving force, plays also a crucial role in Ca²⁺ flux. Membrane protein functions are influenced by specific protein–lipid interactions that are dependent on the chemical structure of lipids. For instance, voltage sensor of Kv2.1 potassium channel are modulated by charged phospholipids and sphingomyelinase change strongly biophysical properties of this channel {Xu, Ramu, et

al. 2008 535 /id} and thus ion fluxes. Because sPLA2 modify plasma membrane lipid properties and more particularly phospholipids distribution, ionic conductances controlling Ca^{2+} flux directly or indirectly through membrane potential should be modulated by this change in lipid composition and finally may be responsible for sperm motility alterations.

Heterogeneity of mGX action

We have previously showed that a small fraction of the sperm population is reluctant to the AR induced by sPLA2 even at the highest concentration tested, that is 500 nM. This result suggests that sperm cell population presents an heterogeneity with likely different levels of fertile competences. The notion of heterogeneity of sperm population, with more competent fractions is supported by our results concerning the motility in the sperm population. From sperm velocity data, it is obvious that different subpopulations were present in a sperm sample. This idea is reinforced by that fact that sPLA2 did not modify sperm velocity in an equal way, since high-speed sperm (the most competent sperm subpopulation) are less affected than low speed sperm by sPLA2 treatment (figure 3). From these results, we can speculate that sPLA2 may contribute to sort competent sperm cells by two ways: first by promoting AR of non functional sperm cells and second, by decreasing sperm motility of low speed sperm, which has for consequence to decrease the chance of low speed sperm to reach the crucial oocyte localization.

FIGURE and LEGENDS

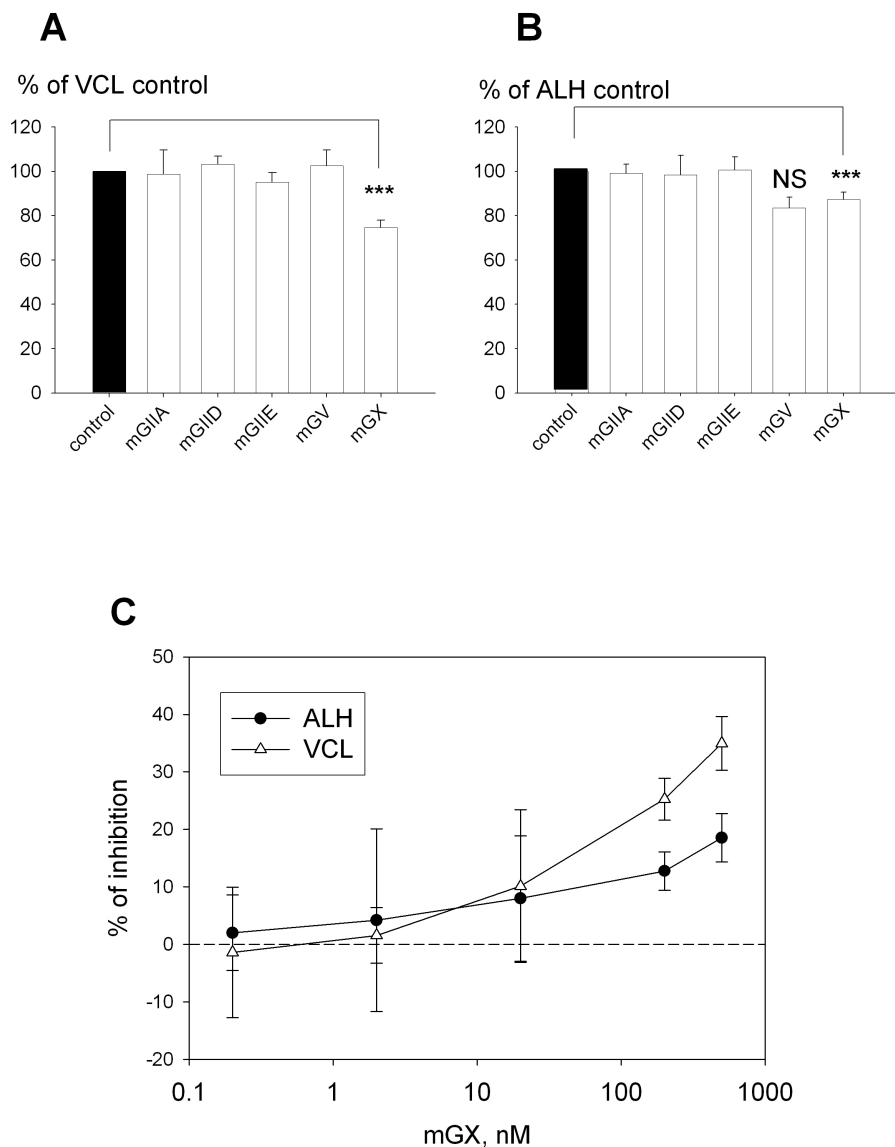
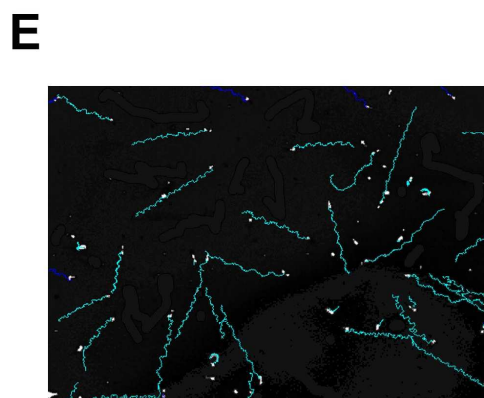
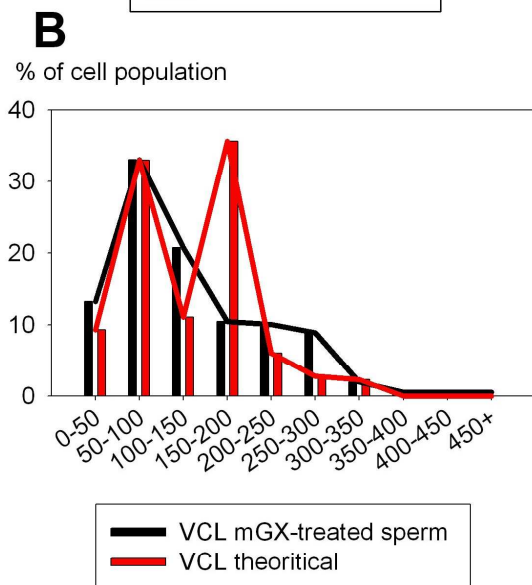
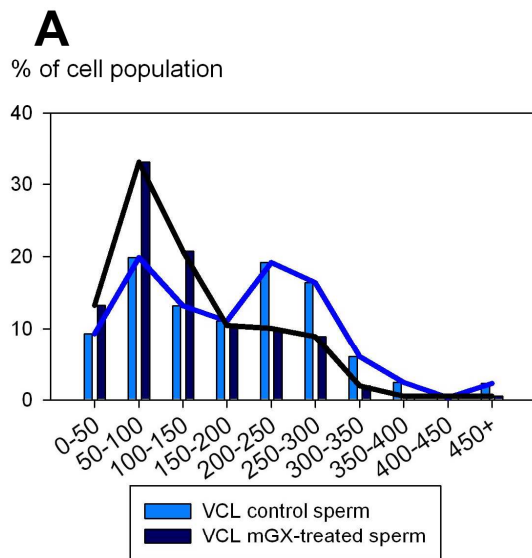
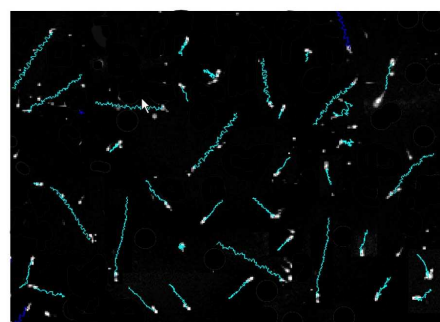
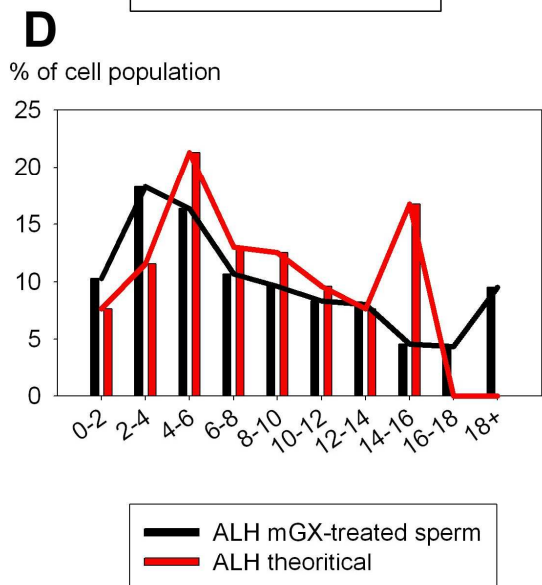
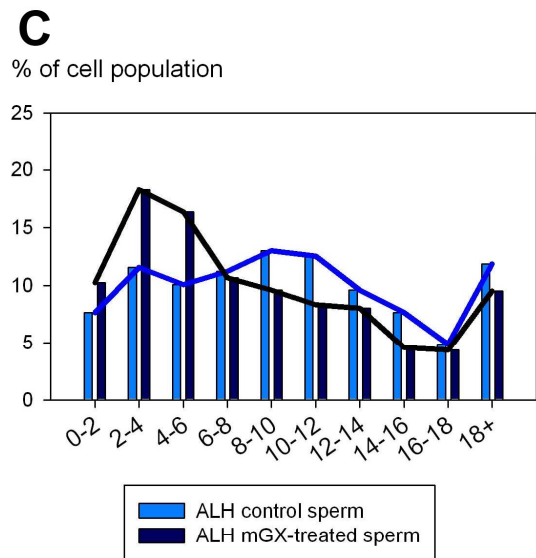


Figure 1. mGX sPLA2 is the most potent inhibitor of sperm motility among 5 different mammalian sPLA2s.

A, B: Effects of mGIIA, mGIID, mGIIIE, mGV and mGX sPLA2 at 200 nM on sperm motility were analysed with a CASA (computer assisted sperm analysis) system. Two different sperm motion parameters “track speed” VCL (A) and “lateral displacement of the head” ALH (B) are showed. For each sPLA2, we compared the values obtained in the presence of the enzyme with the values obtained in a control experiment with sperm cells from the same animal, n= 16 for mGX, n=5 for mGV and n=3 for mGIIA, mGIID and mGIIIE sPLA2. **C:** Dose response curve of mGX sPLA2 on two different sperm motion parameters ALH (●) and VCL (◇). mGX concentrations tested were 0.2, 2,20,200 and 500 nM.



CONTROL



+ 200 nM mGX

Figure 2. The effect of mGX is heterogeneous and high-speed sperm are less affected than low speed sperm by sPLA2 treatment.

A: Control sperm cells population presents an heterogeneous VCL distribution, ranging from 0-50 $\mu\text{m/s}$ to value above 450 $\mu\text{m/s}$ and showing two peaks (blue bars/line). In the presence of 200 nM mGX, we observed a shift of sperm VCL distribution (black bars/line). **B:** This distribution is different of a theoretical distribution obtained after a 30% decrease of each sub-population (red line), which is the mean decrease of the sperm VCL population sample in the presence of 200 nM mGX sPLA2. **C:** Control sperm cells population presents an heterogeneous ALH distribution, ranging from 0-2 μm to value above 18 μm (blue bars/line). In the presence of 200 nM mGX, we observed a shift of sperm ALH distribution (black bars/line). **D:** This distribution is different of a theoretical distribution obtained after a 17% decrease of each sub-population (red line), which is the mean decrease of the sperm ALH population sample in the presence of 200 nM mGX sPLA2. **E, F:** Effects of mGX sPLA2 on individual sperm tracking (blue lines). Comparison of control sperm (E) and sperm incubated with 200 nM mGX during 10 min (F) obtained from the same animal. Note that the length of the tracks, which is proportional to the speed of the sperm cell, is more heterogeneous after application of sPLA2. Static and slow cells have been erased.

Control and mGX conditions of graphs A and C corresponded to 3 different mice, where a mean of 205 sperm per control mouse and 310 sperm per mGX-treated mouse were scored.

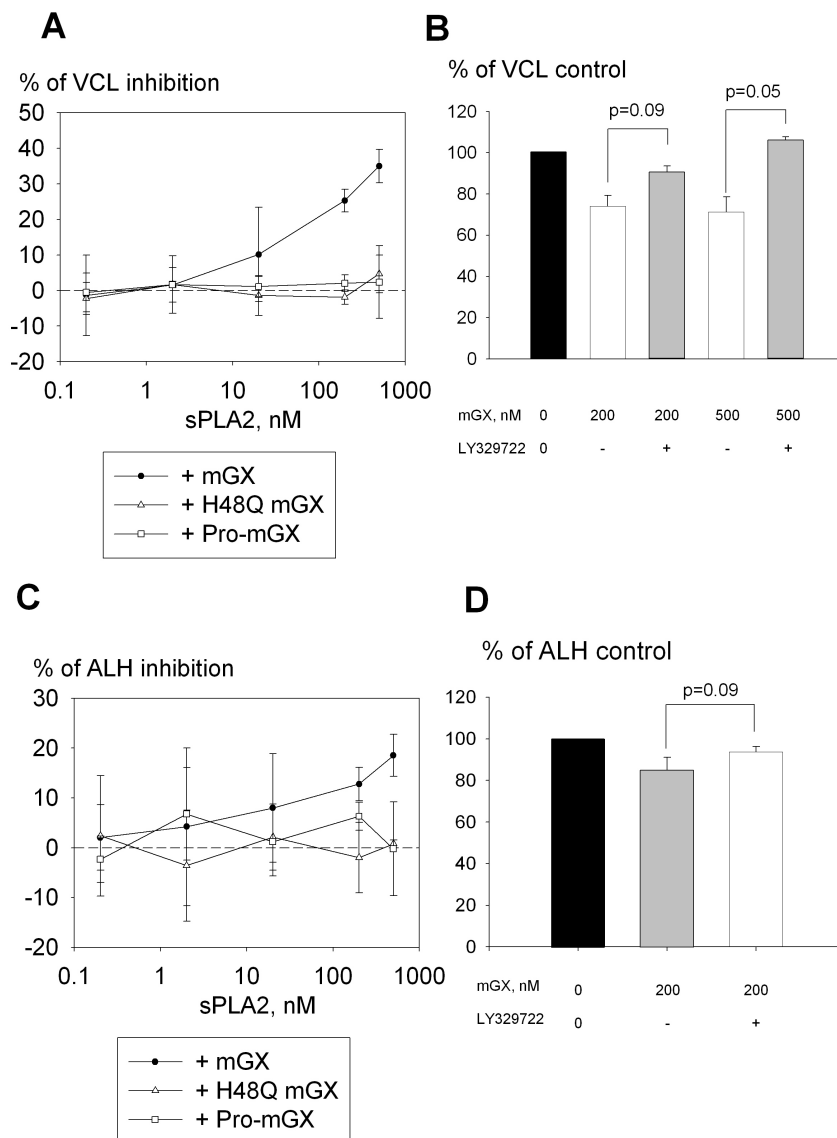


Figure 3. Enzymatic activity of mGX is required to affect sperm motility.

A, C: mutation of the catalytic site of mGX (H48Q) abolishes its ability to affect sperm motility (n=3). Pro-mGX, the inactive pro-enzyme of mGX is also unable to affect sperm motility (n=3).

B, D: the specific sPLA2 inhibitor LY329722 blocks the effect of mGX on sperm VCL and ALH (n=5, for mGX at 200 nM and n=3 for mGX at 500 nM, p as indicated).

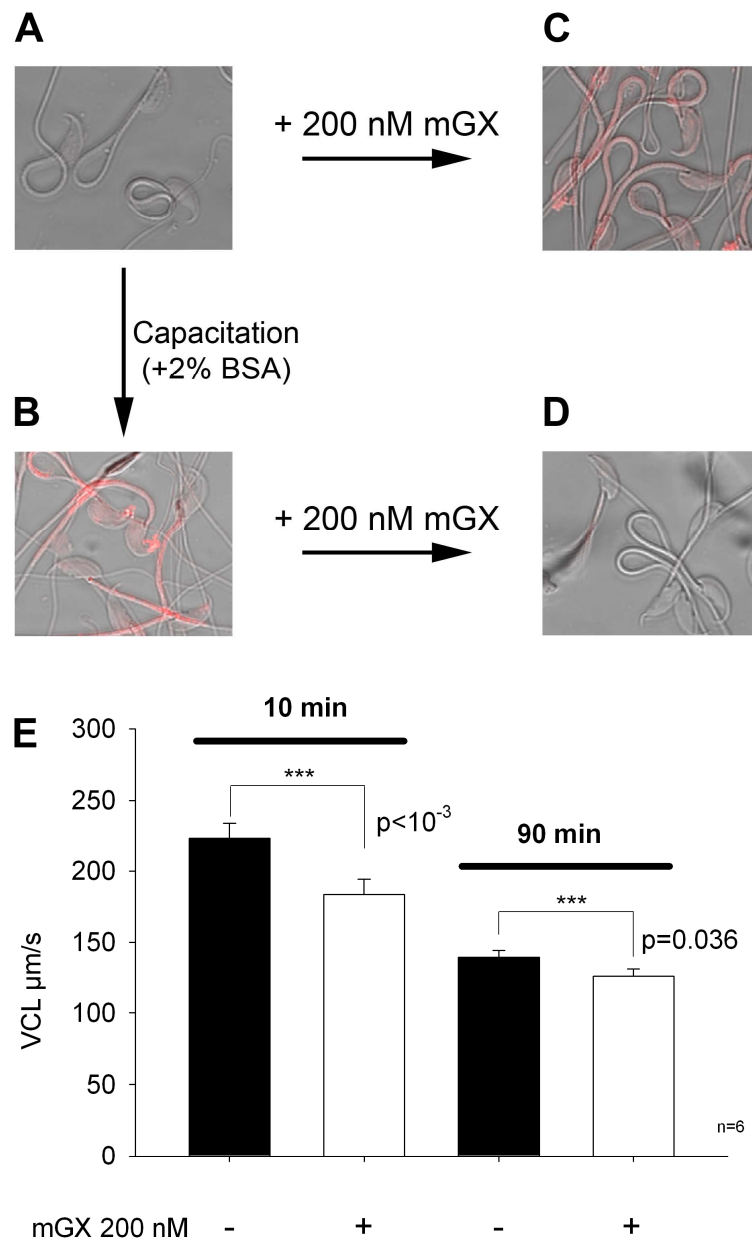


Figure 4. Change in lipid composition during capacitation decreases mGX potency.

Confocal images of sperm stained with annexine-V-cyanine-3. A. non capacitated sperm, B. capacitated sperm, C. Non capacitated sperm treated with 200 nM mGX during 10 min., D capacitated sperm treated with 200 nM mGX during 10 min. E. Mean VCL of control (black bars) or mGX (200 nM) treated sperm populations (white bars), before capacitation (two left bars) or after capacitation (two right bars), $n=6$. Sperm were capacitated by incubating them in 2% BSA in M16 medium during 90 min.

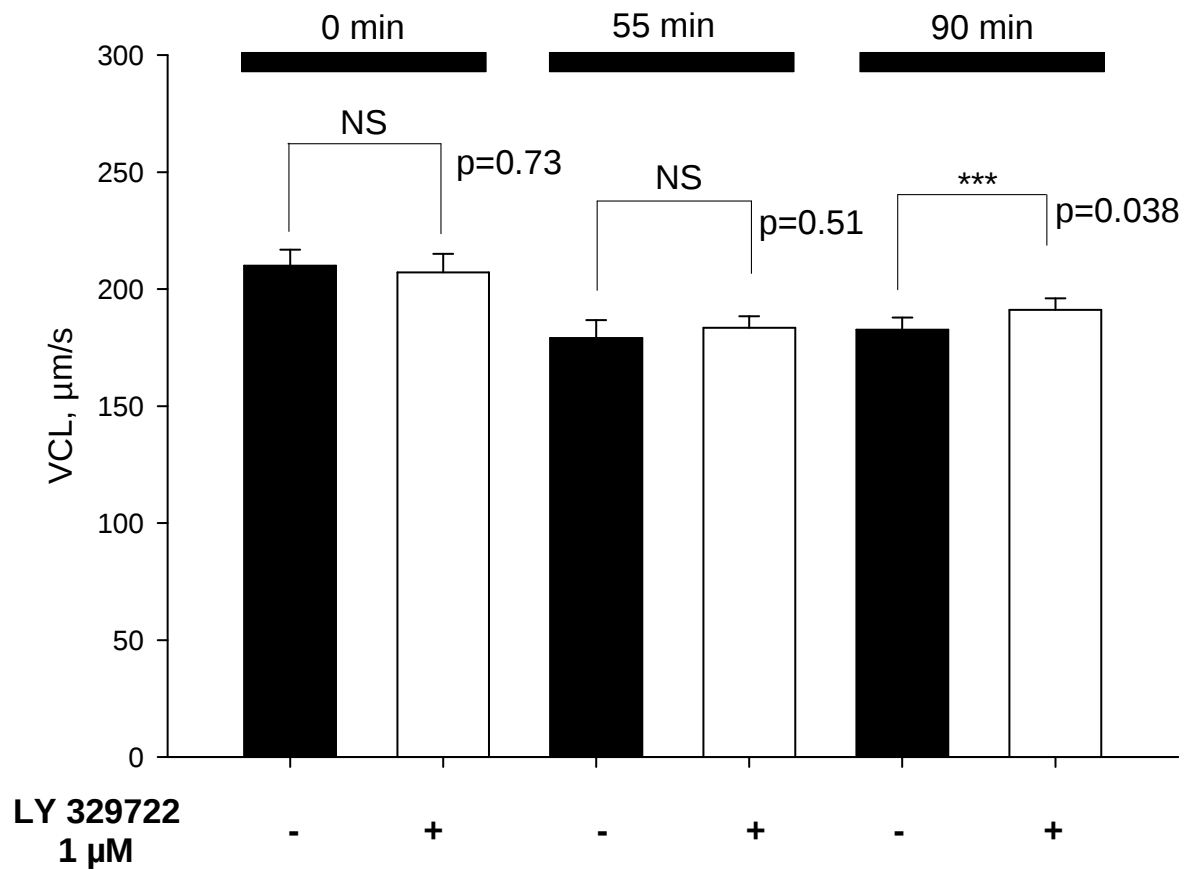


Figure 5. LY329722, a specific inhibitor of mGX increases the mean VCL of sperm capacitated during 90 min.

Sperm were capacitated by incubating them in 2% BSA in M16 medium in a % CO₂ incubator at 37°C in the absence or presence of LY329722 a 1 µM. At various time of capacitation, (0, 45 and 90 min), the VCL of control (black bars) or LY329722 treated sperm (white bars) were compared, n=11.

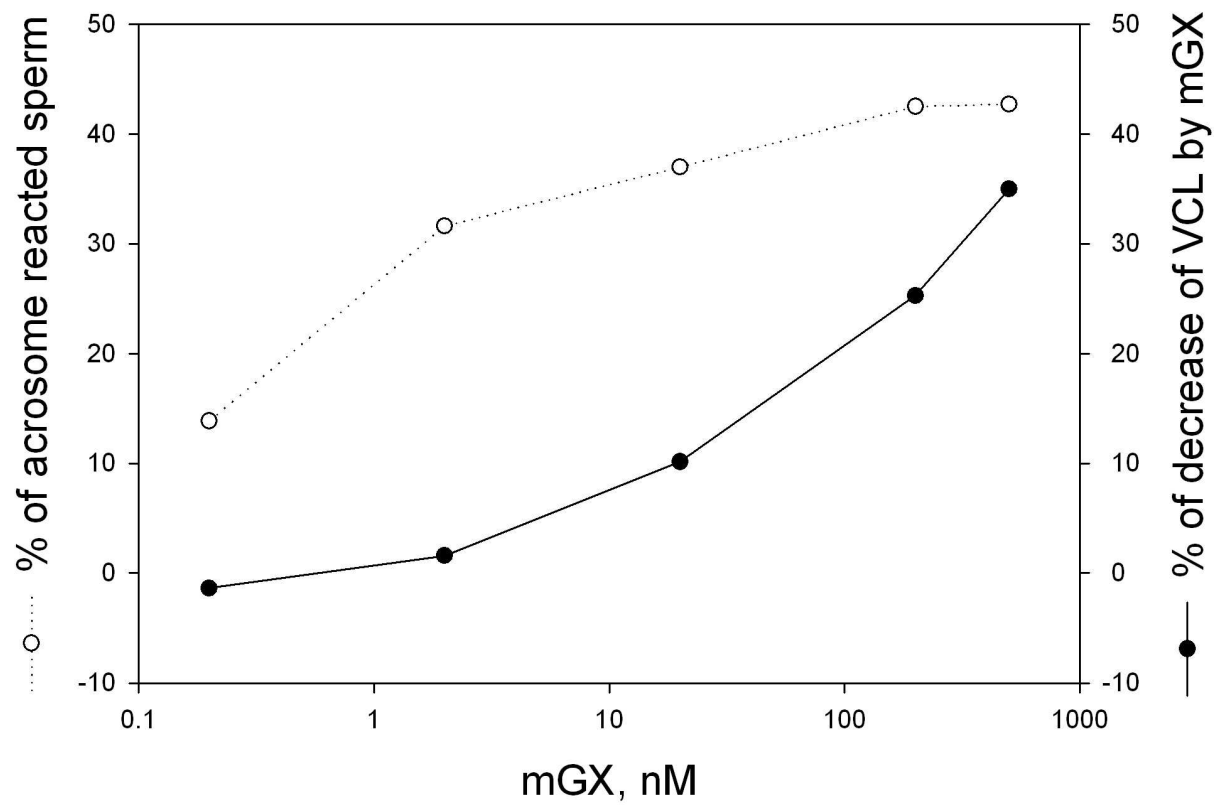


Figure 6. Absence of correlation between acrosome reaction and decrease of sperm motility

Acknowledgments

This work was supported in part by Région Rhône-Alpes (to C.A.), NNRS (to G.L.) and INSERM (M.D.W.). J.E. is supported by a fellowship of Région Rhône-Alpes.

Reference List

Aksoy, Y., Aksoy, H., Altinkaynak, K., Aydin, H.R., and Ozkan, A. (2006) Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*, 75:75-79.

Bao,S., Miller,D.J., Ma,Z., Wohltmann,M., Eng,G., Ramanadham,S., Moley,K., and Turk,J. (2004) Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J.Biol.Chem.*, 279:38194-38200.

Buffone,M.G., Verstraeten,S.V., Calamera,J.C., and Doncel,G.F. (2009) High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa are Associated with Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies. *J.Androl.*.

Castellano,L.E., Trevino,C.L., Rodriguez,D., Serrano,C.J., Pacheco,J., Tsutsumi,V., Felix,R., and Darszon,A. (2003) Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.*, 541:69-74.

Cupillard,L., Koumanov,K., Mattei,M.G., Lazdunski,M., and Lambeau,G. (1997) Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. *J.Biol.Chem.*, 272:15745-15752.

Escalier,D. (2006) Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum.Reprod.Update.*, 12:449-461.

Escoffier,J., Jemel,I., tanemoto,A., Taketomi,Y., Coatrieux,C., Sato,H., Yamamoto,K., Masuda,S., Pernet-Gallay,K., Pierre,V., Hara,S., Murakami,M., De Waard,M., Lambeau,G., and Arnoult,C. (2009) Group X phospholipase A2 is secreted during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome. *J.Clin.Invest.*, in press.

Esposito,G., Jaiswal,B.S., Xie,F., Krajnc-Franken,M.A., Robben,T.J., Strik,A.M., Kuil,C., Philipsen,R.L., van Duin,M., Conti,M., and Gossen,J.A. (2004) Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101:2993-2998.

Gadella,B.M. and Harrison,R.A. (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.*, 127:2407-2420.

Gadella,B.M., Tsai,P.S., Boerke,A., and Brewis,I.A. (2008) Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int.J.Dev.Biol.*, 52:473-480.

Gulaya,N.M., Margitich,V.M., Govseeva,N.M., Klimashevsky,V.M., Gorpynchenko,I.I., and Boyko,M.I. (2001) Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Arch.Androl.*, 46:169-175.

Ho,H.C. and Suarez,S.S. (2003) Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol.Reprod.*, 68:1590-1596.

Janssen,M.J., van de Wiel,W.A., Beiboer,S.H., van Kampen,M.D., Verheij,H.M., Slotboom,A.J., and Egmond,M.R. (1999) Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng.*, 12:497-503.

Jones,R., James,P.S., Howes,L., Bruckbauer,A., and Klenerman,D. (2007) Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J.Androl.*, 9:438-444.

Koizumi,H., Yamaguchi,N., Hattori,M., Ishikawa,T.O., Aoki,J., Taketo,M.M., Inoue,K., and Arai,H. (2003) Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J.Biol.Chem.*, 278:12489-12494.

Lambeau,G. and Gelb,M.H. (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu.Rev.Biochem.*, 77:495-520.

Lessig,J., Reibetanz,U., Arnhold,J., and Glander,H.J. (2008) Destabilization of acrosome and elastase influence mediate the release of secretory phospholipase A2 from human spermatozoa. *Asian J.Androl.*, 10:829-836.

Masuda,S., Murakami,M., Matsumoto,S., Eguchi,N., Urade,Y., Lambeau,G., Gelb,M.H., Ishikawa,Y., Ishii,T., and Kudo,I. (2004) Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1686:61-76.

Montell, C. New light on TRP and TRPL. *Mol.Pharmacol.* 52(5), 755-763. 1997.
Ref Type: Journal (Full)

Ollero,M., Gil-Guzman,E., Lopez,M.C., Sharma,R.K., Agarwal,A., Larson,K., Evenson,D., Thomas,A.J., Jr., and Alvarez,J.G. (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum.Reprod.*, 16:1912-1921.

Ren,D., Navarro,B., Perez,G., Jackson,A.C., Hsu,S., Shi,Q., Tilly,J.L., and Clapham,D.E. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413:603-609.

Rouault,M., Le Calvez,C., Boilard,E., Surrel,F., Singer,A., Ghomashchi,F., Bezzine,S., Scarzello,S., Bollinger,J., Gelb,M.H., and Lambeau,G. (2007) Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry.*, 46:1647-1662.

Roudebush,W.E. (2001) Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function. *Asian J.Androl.*, 3:81-85.

Sato,H., Taketomi,Y., Isogai,Y., Miki,Y., Yamamoto,K., Hosono,T., Arata,S., Ishikawa,Y., Ishii,T., Kobayashi,T., Nakanishi,H., Ikeda,K., Taguchi,R., Hara,S., Murakami,M., and Kudo,I. (2009) Deficiency of group III phospholipase A2 impairs epididymal sperm maturation and fertility. *J.Clin.Invest.*, co-submission.

Schaloske,R.H. and Dennis,E.A. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1761:1246-1259.

Schuh,K., Cartwright,E.J., Jankevics,E., Bundschu,K., Liebermann,J., Williams,J.C., Armesilla,A.L., Emerson,M., Oceandy,D., Knobloch,K.P., and Neyses,L. (2004) Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J.Biol.Chem.*, 279:28220-28226.

Singer,A.G., Ghomashchi,F., Le Calvez,C., Bollinger,J., Bezzine,S., Rouault,M., Sadilek,M., Nguyen,E., Lazdunski,M., Lambeau,G., and Gelb,M.H. (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J.Biol.Chem.*, 277:48535-48549.

Smart,B.P., Oslund,R.C., Walsh,L.A., and Gelb,M.H. (2006) The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A2: elucidation of sites for enhanced binding. *J.Med.Chem.*, 49:2858-2860.

Travis,A.J. and Kopf,G.S. (2002) The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J.Clin.Invest.*, 110:731-736.

Valentin,E., Ghomashchi,F., Gelb,M.H., Lazdunski,M., and Lambeau,G. (1999) On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J.Biol.Chem.*, 274:31195-31202.

Visconti,P.E., Ning,X., Fornes,M.W., Alvarez,J.G., Stein,P., Connors,S.A., and Kopf,G.S. (1999) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev.Biol.*, 214:429-443.

Wang,L., Beserra,C., and Garbers,D.L. (2004) A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev.Biol.*, 267:203-215.

Wu,C., Stojanov,T., Chami,O., Ishii,S., Shimizu,T., Li,A., and O'Neill,C. (2001) Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J.Biol.Chem.*, 276:26962-26968.

Yan,W., Assadi,A.H., Wynshaw-Boris,A., Eichele,G., Matzuk,M.M., and Clark,G.D. (2003) Previously uncharacterized roles of platelet-activating factor acetylhydrolase 1b complex in mouse spermatogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100:7189-7194.

Zalata,A., Hassan,A., Christophe,A., Comhaire,F., and Mostafa,T. (2009) Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *Int.J.Androl.*

Article 3: Group X phospholipase A2 is secreted during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome.

Jessica Escoffier, Ikram Jemel, Akemi Tanemoto, Yoshitaka Taketomi, Christelle Coatrieux, Hiroyasu Sato, Kei Yamamoto, Seiko Masuda, Karin Pernet-Gallay, Virginie Pierre, Shuntaro Hara, Makoto Murakami, Michel De Waard, Gérard Lambeau and Christophe Arnoult.

Journal of Clinical Investigation (en revision)

Group X phospholipase A₂ is secreted during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome

Jessica Escoffier¹, Ikram Jemel², Akemi Tanemoto³, Yoshitaka Taketomi^{3,4}, Christelle Coatrieux², Hiroyasu Sato^{3,4}, Kei Yamamoto⁴, Seiko Masuda^{3,4}, Karin Pernet-Gallay¹, Virginie Pierre¹, Shuntaro Hara³, Makoto Murakami^{3,4,5}, Michel De Waard¹, Gérard Lambeau^{2†} and Christophe Arnoult^{1†}*

¹Grenoble Institute of Neuroscience
Inserm U.836 Team 3 “Calcium channels, functions and pathologies”;
Université Joseph Fourier
Chemin Ferrini
38700 La Tronche, France

² Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS - UMR 6097
Université de Nice-Sophia Antipolis
660 route des Lucioles, Sophia Antipolis
06560 Valbonne, France

³Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences,
Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

⁴Biomembrane Signaling Project
The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science
2-1-6 Kamikitazawa
Setagaya-ku
Tokyo 156-8506, Japan

⁵PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8
Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

†These two authors have equally contributed to this work

***Corresponding author**

Christophe ARNOULT
Grenoble Institute of Neuroscience, Inserm U.836 Team 3 “Calcium channels, functions and pathologies”; Université Joseph Fourier
Chemin Ferrini, 38700 La Tronche, France
Phone 33- 4 56 52 05 63 Fax 33- 4 56 52 05 72 E-mail: christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

Nonstandard abbreviations used:

sPLA₂: secreted phospholipase A₂;

A comprehensive abbreviation system for the various mammalian sPLA₂s is used: each sPLA₂ is abbreviated with a lowercase letter indicating the sPLA₂ species (m for mouse), followed by uppercase letters identifying the sPLA₂ group (GIIA, GIID, GIIE, GIIF, GV, GX, for group IIA, IID, IIE, IIF, V, X, respectively);

PAF: ether phospholipid 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine;

LPL: lysophospholipid; LPC: lysophosphocholine;

AR: Acrosome reaction.

Ejaculated mammalian sperm must undergo a maturation process, the capacitation, as they traverse the female reproductive tract and before they can fertilize the egg. Several studies have suggested a role for one or more phospholipases A₂ in capacitation, acrosome reaction (AR) and fertilization, but the molecular nature of these enzymes and their specific roles have remained elusive. We demonstrate here that mouse group X secreted phospholipase A₂ (mGX sPLA₂) is the major enzyme present in the acrosome of spermatozoa and that mGX is released in an active form during sperm capacitation via spontaneous AR. The size of litters from male mGX-deficient mice was slightly smaller than that of wild-type males. Spermatozoa from mGX-deficient mice exhibited lower spontaneous AR associated to a decreased outcome of *in vitro* fertilization (IVF), due to a drop of fertilization potential of sperm and an increase of the rate of aborted embryos. Specific sPLA₂ inhibitors and antibodies to mGX blocked spontaneous AR of wild-type sperm and reduced IVF outcome. These effects were restored by addition of lysophosphatidylcholine, a catalytic product of mGX. Finally, recombinant mGX triggered AR in a catalytic- and dose-dependent manner and improved IVF outcome. All together, our results reveal the presence of group X sPLA₂ in sperm acrosome and highlight a paracrine role of this enzyme during capacitation in which the enzyme primes sperm for efficient fertilization and boosts premature AR of a likely phospholipid-damaged sperm subpopulation to discard them from the fertilization race.

Introduction

Spermatogenesis in the testis leads to the production of morphologically mature sperm cells which are still functionally immature, immotile and incompetent for fertilization. Before fertilization, these sperm cells should undergo two major series of important morphological, biochemical and functional modifications, one in the epididymis and the other in the female reproductive tract after ejaculation. During their transit through the epididymis, sperm cells acquire progressive motility and prime the signaling pathways that will eventually orchestrate capacitation. The full fertilization potential of spermatozoa will be reached *in vivo* only after capacitation, a final maturation process occurring in the female reproductive tract. Capacitation was discovered by Austin and Chang in the early 1950s and is defined as a complex set of molecular events that allow ejaculated sperm to fertilize an egg (1). Fertilization starts with sperm binding on zona pellucida and is followed by the physiological acrosome reaction (AR), which is essential for sperm-oocyte fusion. Only fully capacitated spermatozoa can bind to the zona-intact egg and are competent for AR (2). However, during capacitation, a large fraction of sperm (30-40%) undergoes an anticipated AR called spontaneous AR (3). This process is currently interpreted as a sperm malfunction and suggests that a subpopulation of ejaculated sperm does not tolerate the above final maturation process. The endogenous factors responsible for spontaneous AR and the possible physiological reasons for this process have not been identified. Indeed, the molecular mechanisms of sperm capacitation is still poorly understood, even after 50 years of intensive research (4-7). If capacitation clearly depends on ion fluxes and protein phosphorylations, this process is also characterized by a strong dependence on the lipid membrane composition and lipid metabolism. Indeed, major lipid remodeling events of sperm including reorganization of the plasma membrane and formation of membrane subdomains have been observed during

capacitation at both chemical and biophysical levels (7-9). During capacitation, the most well-known modification of the plasma membrane is cholesterol efflux which plays a major role in sperm maturation both *in vivo* and *in vitro* (4;10). Other major changes during capacitation include remodeling of lipid rafts, efflux of desmosterol, changes in sterol sulfates, phospholipids, sphingomyelin and ceramides, all of them likely contributing to the increase in membrane fluidity by changing lipid packing and thereby providing heterogeneity of the sperm population (4;11-13). If obviously several families of lipolytic enzymes are involved in these lipid modifications (14), phospholipases A₂ (PLA₂) are likely to be important, because of their large diversity of action from phospholipid remodeling and lipid mediator release to inflammation and host defense (15;16).

PLA₂ catalyze the hydrolysis of phospholipids at the *sn*-2 position to generate free fatty acids and lysophospholipids, which are precursors of different lipid mediators such as eicosanoids and platelet-activating factor (PAF) (17-21). PLA₂ metabolites either leave the cellular membrane and are involved in different cellular signaling pathways or accumulate in the leaflet of the membrane and change its biophysical properties. PLA₂s constitute one of the largest families of lipid hydrolyzing enzymes and have been classified into several groups (15). Based on their respective structure and cellular localization, PLA₂s can be divided into two major sets of proteins: a set of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent intracellular PLA₂s and another set of Ca²⁺-dependent secreted PLA₂s (sPLA₂). The PLA₂ family also comprises a set of intracellular and secreted forms of PAF-acetyl hydrolase. Deciphering the biological functions of each PLA₂ member is challenging. Studies over the last decade have shown that intracellular PLA₂s including group IVA cytosolic PLA₂ (cPLA₂α) and group VIA Ca²⁺-independent PLA₂ (iPLA₂β) are mainly involved in the production of various lipid mediators in different tissues and cell types activated by numerous stimuli (17-22). Production of these lipid mediators is important in numerous and diverse physiological and pathophysiological

conditions. Several sPLA₂s, in particular group IIA, V and X also contribute to the production of lipid mediators in certain conditions and have been involved in diverse physiopathological conditions including inflammation and associated inflammatory diseases, tissue injury and host defense (16;23-25).

Several intracellular and secreted PLA₂s have been described in the testis and other male reproductive organs, but their respective functions in reproduction still remain largely obscure. Group VIIIB PAF-acetyl hydrolase and iPLA₂β have been found in sperm cells and the corresponding deficient mice present defects in early spermatogenesis and sperm motility, respectively (26-28). cPLA₂-ε has recently been cloned and found to be expressed in the testis, but its function is still unknown (29). Previous studies have also shown that several sPLA₂s including group IIA, IIC, IID, IIE, IIF, V and X are present in various genital male organs such as testis, epididymis, vas deferens, seminal vesicles and prostate, but their exact functions are still speculative (30;31). More particularly, mouse group IIE, V and X sPLA₂s (mGIIE, mGV and mGX, respectively) have been localized in the late spermatids, but their presence in mature sperm and their specific functions in capacitation or fertilization remain to be determined.

Irrespective of the above, different studies have shown that one or several uncharacterized PLA₂s play an important role in capacitation, AR and the early steps of fertilization including sperm binding and sperm-oocyte fusion (32). First, several biochemical studies have demonstrated the presence of one or several low molecular weight Ca²⁺-dependent sPLA₂-like proteins in spermatozoa from different species, yet their true molecular nature still remains elusive (33-36). Concerning capacitation, a spontaneous release of PAF during capacitation has been linked to activation of spontaneous AR, but the enzyme responsible for PAF release has not been identified (37). Concerning AR, non physiological and physiological stimuli of AR using Ca²⁺ ionophore, progesterone and zona pellucida produce the release of arachidonic

acid and/or lysophosphatidylcholine (LPC), and is prevented by PLA₂ inhibitors on sperm from various species (38-41). However, the identity of the PLA₂(s) involved in this exocytotic event has not yet been revealed and the use of poorly specific PLA₂ inhibitors such as Ro 31-4493, aristolochic acid or ONO RS-82 in these studies cannot provide any clue (38;40;41). PLA₂ activation during AR is also supported by the fact that LPC and fatty acids accelerate or promote exocytosis (42;43). Finally, LPC improves sperm binding on zona pellucida (44) and sperm-oocyte fusion (45), supporting the notion that one or several PLA₂s including an sPLA₂ protein may be important for capacitation and fertilization.

In this paper, we have used mouse group X deficient mice (mGX^{-/-}), sPLA₂ inhibitors and recombinant mGX protein to identify a novel role of this sPLA₂. We demonstrated that mGX sPLA₂ is the major enzyme present in the acrosome of mature spermatozoa and is released as an active enzyme during AR. mGX controls sperm physiology at two levels, first during capacitation, by triggering spontaneous AR of a specific subpopulation of sperm, and second during the subsequent fertilization by improving the sperm fertilization potential.

In our companion paper (46), Sato et al have shown that another enzyme, the mouse group III sPLA₂ is highly expressed in the proximal epithelium of epididymis and that mice deficient for this sPLA₂ exhibit male infertility because of profound defects in sperm maturation. Together, our results show that two catalytically active sPLA₂s are expressed in different locations within the reproductive male organs and exert non redundant functions at two major steps of maturation of spermatozoa, one during their transit through the epididymis and the other during capacitation, with important impacts on male fertility in both cases.

Results

mGX sPLA₂ is specifically expressed in late spermatogenic cells and mature spermatozoa.

Quantitative RT-PCR analysis showed that the mRNA coding for mGX is present at much higher levels in the testis than epididymis (Figure 1A). *In situ* hybridization on tissue sections of the testis from 8-week-old C57BL/6J mice showed that mGX mRNA is present in late spermatogenic cells (spermatocytes and spermatids, but not spermatogonia) in the seminiferous tubules (Figure 1B). In accordance with these results, immunohistochemistry experiments on parallel tissue sections with a specific polyclonal mGX antibody showed the presence of mGX in spermatocytes and spermatids, but not in spermatogonia (Figure 1C). In magnified views (Figure 1C inset), scattered signals with crescent and elongated shapes were evident in spermatocytes and spermatids, suggesting that mGX is localized in the acrosomal area. To further support this finding, spermatozoa from cauda epididymis were stained with anti-mGX or control antibodies. A strong immunofluorescent signal for mGX was confined to the sperm head, in agreement with an acrosomal localization (Figure 1D).

mGX sPLA₂ is released during AR.

To further demonstrate that mGX is an acrosomal protein, we monitored the release of the protein from mouse mature sperm undergoing *in vitro* capacitation in conditions known to induce spontaneous AR of 30 to 40% of the sperm population over the time of incubation. mGX and other sPLA₂s possibly present in the acrosome were sought using specific and sensitive (down to 5 pg per assay for mGX) time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA) recently developed for the different mouse sPLA₂s (47). During the time-course of capacitation, the amount of mGX was increased in the supernatant and concomitantly decreased in the pellet (Figure 2A). Moreover, inducing AR by the Ca²⁺ ionophore A23187

almost doubled the amount of released mGX at 90 min of capacitation. The fact that mGX redistributed from the sperm pellet to the cell supernatant during capacitation or after A23187-induced AR clearly demonstrates that the enzyme is present in the acrosome of mature sperm. When mGX^{-/-} sperm were used in similar capacitation experiments, no mGX TR-FIA signal was found, validating the specificity of the results (Figure 2B). We measured in parallel the release of mGX sPLA₂ by a sensitive sPLA₂ enzymatic assay using radiolabeled *E. coli* membranes as a substrate. In accordance with the TR-FIA results, the sPLA₂ enzymatic activity was increased in the supernatant and decreased in the pellet, indicating that the mGX sPLA₂ released during capacitation is active (Figure 2C). The measured enzymatic activity was due to mGX since no variation of enzymatic activity was observed in mGX^{-/-} sperm (not shown). We also examined the presence of mGX and other sPLA₂s including mGIIA, mGIIE and mGV in the sperm of various mouse strains (C57BL/6J, BALB/c and OF1) and found that mGX sPLA₂ was the only detectable protein in all these strains (not shown). These experiments collectively indicate that mGX is the major sPLA₂ present in the acrosome of mature mouse sperm, that the enzyme is released during AR in an active form, and that it contributes to most of the sPLA₂ enzymatic activity released in the sperm bathing medium during capacitation.

Disruption of the mGX gene results in a lower fertility outcome.

Although no obvious reproductive phenotype has been reported for mGX^{-/-} male mice (48;49), we re-investigated this question by studying the fertility outcome in natural mating and *in vitro* fertilization experiments (IVF) (50). Both male and female mGX^{-/-} mice were fertile when mated with wild-type (WT) C57BL/6J mice (not shown); however, the average litter size of mGX^{-/-} male mice crossed with mGX^{-/-} females (5.40 ± 0.76 pups, $n=5$ $p<0.05$) was slightly lower than that of WT littermates (8.16 ± 0.39 pups, $n=37$) (Figure 3A), possibly

indicating a lower fertility of mGX^{-/-} animals. To discriminate between male or female reproductive deficiency, we performed IVF with mGX^{-/-} sperm and WT oocytes. We scored the different types of egg/oocytes obtained 24 hours after mixing sperm with oocytes: unfertilized oocytes, 2-cell embryos (normal stage) and aborted embryos, and we used the 2-cell embryos values to measure fertility (51), since 2-cell embryos are appropriate for transfer into the female tract (Figures 3B and C). We controlled that oocytes incubated without sperm in M16 medium for 24 hours did not present any type of cell division (not shown). In IVF experiments, the fertilizing potential of mGX^{-/-} sperm was clearly impaired when compared to WT littermate sperm (Figure 3D). Indeed, the rate of 2-cell embryos was reduced from $67.6 \pm 2.2\%$ (n=13) for mGX^{+/+} sperm to $37.6 \pm 3.9\%$ (n=11, $p < 0.01$) for mGX^{-/-} sperm while the rate of aborted embryos increased from $7.7 \pm 1.6\%$ to $11.9 \pm 1.9\%$ (n=11, $p < 0.05$) for mGX^{+/+} and mGX^{-/-} sperm, respectively. The percentage of unfertilized oocytes was also increased by more than 2-fold for mGX^{-/-} sperm. Interestingly, the impaired fertility of mGX^{-/-} sperm was rescued by incubating mGX^{-/-} sperm with recombinant mGX protein throughout the capacitation period (Figure 3E).

Endogenous mGX sPLA₂ regulates spontaneous AR.

The fact that mGX sPLA₂ is released during AR plus the fact that lysophospholipids and fatty acids, two products of sPLA₂ activity can activate AR (42;52) makes possible that the mGX released during the early time points of capacitation boosts spontaneous AR in a paracrine manner. To explore this possibility, we compared the kinetics of spontaneous AR between sperm from mGX^{+/+} and mGX^{-/-} mice. The early onset of spontaneous AR was unchanged between mGX^{+/+} and mGX^{-/-} sperm. However, the level of spontaneous AR of mGX^{-/-} sperm occurring during the late phase of capacitation (55-90 min) was markedly lower than that of mGX^{+/+} sperm (Figure 4A) and reached a plateau during the late phase of capacitation (55-90

min). To confirm the ability of mGX to trigger AR, we evaluated the capacity of exogenous recombinant mGX to trigger AR during capacitation (Figure 4B, C and D). The mGX recombinant enzyme was highly effective since concentrations as low as 0.2 nM could induce AR of about 25% of the sperm population when incubated with sperm for 10 min. mGX caused a dose-dependent activation of AR with a maximal increase of ~50% observed at concentrations higher than 200 nM. These results were expressed as total AR minus spontaneous AR, in order to show the specific sPLA₂-induced AR (Figure 4B). Incubation of uncapacitated sperm for 10 min with 200 nM mGX increased the rate of total AR from $23.7 \pm 1.4\%$ to $68.1 \pm 2.1\%$ ($n=23$, $p<10^{-5}$) (Figure 4C). Finally, a brief incubation of non-capacitated or capacitated sperm with the enzyme for 10 min before scoring AR indicates that mGX kept the ability to induce AR throughout capacitation (Figure 4D). Together, our results demonstrate that spontaneous AR occurring during the late phase of capacitation is controlled by the secretion and paracrine activity of mGX. Our results also indicate that mGX modifies the ratio between two sperm subpopulations: the acrosome-reacted and the non-acrosome-reacted sperm. Importantly, we observed that very high concentrations of recombinant mGX sPLA₂ did not induce AR of the entire sperm population, and that about 30% of the sperm population remain fully resistant to mGX in our conditions of capacitation.

mGX sPLA₂ triggers AR via its catalytic activity and independently of cytosolic Ca²⁺ rise.

To determine whether the catalytic activity of mGX is required for the induction of AR, we first tested the catalytically-inactive H48Q mutant of mGX. As for several other sPLA₂s with a mutation at the active site histidine (53;54), the mGX H48Q mutant has less than 0.1% of WT catalytic activity (not shown). This mutant was unable to trigger AR of uncapacitated sperm (Figure 5A- □). We then tested the effect of recombinant pro-mGX, the zymogen form of mGX, which has very low enzymatic activity (55). Pro-mGX was also unable to trigger AR

at 200 nM (Figure 5A - Δ). Finally, we tested LY329722, a very specific sPLA₂ inhibitor (compound A in (56)), and found that this inhibitor blocked the sPLA₂-induced AR of capacitated sperm at 1 μ M (Figure 5B). Together, these results demonstrate that the catalytic activity of mGX is essential for inducing AR. We also wondered whether Ca²⁺ influx was required for mGX-induced AR. To address this question, sperm were loaded during 30 min in a non capacitating medium with BAPTA-AM, a cell-permeant and fast chelator of Ca²⁺. Sperm were then washed and incubated for another 30 min to allow for a complete de-esterification of BAPTA-AM. At the end of this procedure, sperm were immobile, indicating efficient chelation of cytoplasmic Ca²⁺ by BAPTA. Sperm were then incubated with mGX for 10 min and AR was scored. The effect of mGX was not prevented by BAPTA, indicating that calcium signaling is not involved in sPLA₂-induced AR (Figure 5C).

Acrosome- and non-acrosome-reacted sperm treated with mGX present normal ultrastructural morphology.

We studied by electron microscopy the effect of mGX on sperm head ultrastructure. We first found that non-acrosome-reacted sperm treated for 10 min with 200 nM mGX presented ultrastructural characteristics (Figure 6A) which are undistinguishable to those of untreated sperm (Figure 6B), without any apparent defect in the acrosomal area. We next analyzed the morphology of acrosome-reacted sperm. There are 3 morphological criteria by which an AR can be evaluated as normal : i) the outer acrosomal membrane should present vesiculation, ii) the plasma membrane should fuse with the outer acrosomal membrane and iii) it should present a characteristic double hairpin shape at the base of the acrosome (57). We compared A23187-induced and mGX-induced AR. All the sperm which were acrosome-reacted by A23187 presented a complete AR exhibiting the 3 above morphological criteria (not shown). The sperm which were acrosome-reacted by mGX were judged as normal on the basis of the

same morphological criteria (Figure 6C). We also observed very early stages of AR-like cavitation of the acrosomal matrix (Figure 6D). Together, our analyses indicate that treatment of sperm with mGX produces non-acrosome-reacted sperm and acrosome-reacted sperm with a normal morphology.

The fertility outcome is dependent on the rate of spontaneous AR controlled by mGX sPLA₂.

A fraction of the sperm population was found to be fully resistant to recombinant mGX, even at concentrations as high as 500 nM (Figure 4B). This suggests that recombinant mGX specifically targets a subpopulation of sperm and trigger their AR prematurely, ie before fertilization. Since endogenous mGX is released during capacitation (Figure 2), a similar mechanism may be operating physiologically and the role of endogenous mGX would be to target a specific subpopulation of sperm which may have defective sperm function. To address this possibility, we performed *in vitro* fertilization experiments with WT sperm pretreated with the sPLA₂ inhibitor LY329722 throughout capacitation. Again, we used the 2-cell embryos outcome as an endpoint to measure fertility (51), since the development of 2-cell embryos is independent of female factor and they are appropriate for transfer into the female tract. Treating sperm with LY329722 decreased the rate of 2-cell embryos by 23% (n=8, p<0.023), which was compensated by the increased rate of aborted embryos (Figure 7A). Importantly, the inhibitor did not alter the fertilizing potential of sperm since the rate of unfertilized oocytes remained constant. We also followed spontaneous AR in the presence of LY329722 during capacitation (Figure 7B). As expected and in accordance with the results shown in Figure 4A, the onset of spontaneous AR was not modified by LY329722. However, the spontaneous AR occurring during the late phase of capacitation (55-90 min) was markedly reduced by the inhibitor. Similar results were obtained with indoxam, another sPLA₂ inhibitor (55) (not shown). Since inhibitors such as LY329722 have a low membrane permeability

(58), the inhibition of spontaneous AR is likely due to inhibition of mGX after its release in the cell medium, and not to inhibition of mGX still present in the acrosome. The fact that LY329722 blocks spontaneous AR and reduces fertility suggests that the level of spontaneous AR controlled by mGX is an important factor controlling the fertility outcome. To confirm this view, we performed IVF with sperm briefly treated with 200 nM recombinant mGX during the last 10 min of capacitation (see Figure S1 for the time course of this type of experiment). In accordance with the results of Figure 4C, this treatment elicited AR of ~70% of treated sperm, and was blocked by LY329722 (Figure 8A). This treatment led to an increased rate in 2-cell embryos from $38.09 \pm 5.27\%$ for control to $57.50 \pm 4.69\%$ for treated sperm ($n=13$, $p<0.0002$) (Figure 8B). As for LY329722 (Figure 7A), mGX treatment did not change the fertilization potential of sperm since the rate of unfertilized oocytes remained constant: the increased rate of 2-cell embryos was compensated by the decreased rate of aborted embryos, from $32.95 \pm 5.06\%$ to $19.85 \pm 2.96\%$ ($n=13$, $p<0.005$). Furthermore, we found that embryos obtained with mGX-treated sperm developed normally to the blastocyst stage (Figure 8C) and that re-implanted blastocyst embryos gave rise to normal pups (not shown). The effect of exogenous mGX on fertility was dependent on its enzymatic activity since preincubation of mGX with LY329722 for 15 min before the short sperm treatment blocked the positive effect on IVF (Figure 8D). We then reasoned that mGX may influence fertility by decreasing the number of sperm able to cross the zona pellucida, and thus by decreasing the risk of polyspermy. Indeed, the number of sperm in an IVF droplet profusely exceeded the minimal number necessary to maximize the IVF outcome. To test this hypothesis, we evaluated the IVF outcome (2-cell embryos) with a non-acrosome-reacted sperm concentration equivalent to the one obtained after mGX treatment. This dilution did not increase the fertility rate (Figure 8E) and ruled out the hypothesis of a decreased risk of polyspermy due to mGX treatment. Altogether, the results shown in Figures 7 and 8 clearly

indicate that the fertility outcome of our IVF experiments is linked to the level of AR controlled by mGX.

LPC, an sPLA₂ metabolite, increases the fertilization potential of sperm.

We have demonstrated above that mGX, which is spontaneously released by sperm during capacitation triggers AR of a subpopulation of sperm via a paracrine amplification loop. Our IVF experiments further support the notion that this subpopulation of sperm is less fertile and poorly promotes normal embryo development. Moreover, mGX^{-/-} sperm also present a deficit of fertilization potential, as indicated by the decrease of fertilization rate (Figure 3D); and this is suggestive of a role for mGX or its catalytic products downstream of capacitation. To test this hypothesis, we allowed WT sperm to capacitate in the presence of YM26734, another potent sPLA₂ inhibitor (59), washed the sperm by centrifugation to remove the inhibitor, and then performed IVF experiments in the absence or presence of LPC, a major catalytic product of mGX (60). Interestingly, treatment with YM26734 alone decreased the rate of fertilization by 50%, from $58.9 \pm 6.8\%$ to $35.6 \pm 5.7\%$ (n=3) while addition of LPC could rescue the fertilization potential of YM26734-pretreated sperm with a fertilization rate of $52.7 \pm 9.7\%$ (n=3) (Figure 9A). To confirm the effect of LPC, we performed similar experiments in the presence of a mGX rabbit polyclonal antibody and obtained similar results: the 2-cell rate decreased from $51.7 \pm 5.2\%$ with control sperm to $32.4 \pm 2.1\%$ with sperm treated with mGX-Ab and LPC, introduced after the capacitation of Ab-treated sperm, rescued the 2-cell embryo rate to $57.1 \pm 8.2\%$ (n=3) (Figure 9B). Importantly, we observed that treatment of sperm with LPC alone had not effect on the rate of fertilization at this concentration (not shown). This result demonstrates that LPC, a mGX metabolite, is required for normal fertilization and suggests a second role for mGX, downstream of the control of spontaneous AR. The fertilization potential of the non-acrosome-reacted sperm subpopulation is thus dependent on

mGX enzymatic activity and mGX or LPC is likely involved in one of the different steps of fertilization occurring after capacitation, including sperm binding on ZP, ZP-induced AR and/or sperm-egg fusion.

Discussion

This paper shows for the first time that mGX sPLA₂ is present in large amounts in the sperm acrosome and plays an important paracrine role in the control of spontaneous AR during capacitation, which is associated to a dramatic impact on fertility outcome. Our results also provide indirect evidence that mGX plays a role during the downstream fertilization step, and thus likely acts at two major stages of reproduction, capacitation and fertilization. Finally, our findings may open new possibilities for the improvement of assisted reproduction techniques.

We first unambiguously identified mGX sPLA₂ as the major enzyme loaded in the mouse sperm acrosome, based on *in situ* hybridization, immunohistochemistry and time-resolved fluoroimmunoassays using mGX^{-/-} mice as negative control. There have been numerous biochemical reports in the past 40 years showing the presence of an sPLA₂-like protein in sperm cells, but the identity of this sPLA₂ was never clarified (32-36). This enzyme was of low molecular mass, reported as a proenzyme, resistant to heat and acid extraction, Ca²⁺-dependent, could hydrolyze both phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, and was sensitive to non specific sPLA₂ inhibitors such as mepacrine, p-bromophenacyl bromide, aristolochic acid, Ro-4493 and Ro-4639. All of these features match those of group X sPLA₂ (61-63). The enzyme was detected in sperm of several mammalian species including mouse, hamster, rabbit, bull, ram and humans. Although several sPLA₂s are present in mouse male reproductive organs (31), we did not detect mGIIA, mGIIE and mGV sPLA₂ proteins in mature mouse sperm cells throughout *in vitro* capacitation while the expression of mGX was very high, reaching several ng of mGX protein per million of sperm cells. This value appears

very high when compared to the level of expression of mGX protein in various mouse tissues (64) and fits with the very high expression of mGX mRNA detected in testis by RNA dot blot analysis (62). Whether group X sPLA₂ is also present in the sperm acrosome in other species including humans remains to be determined. Interestingly, a proenzyme form was detected in human sperm (34), and this would fit with the fact that human group X sPLA₂ has a propeptide sequence (61). Langlais et al then reported the N-terminal sequence of a low molecular mass PLA₂ purified from human sperm (35), but this sequence did not match any known human sPLA₂s including group X. More recently, Riffo et al (45) and Lessig et al (36) reported the presence and release of an sPLA₂ from human sperm, but the two studies were performed using antibodies with unknown specificity towards the different sPLA₂ isoforms, and were thus inconclusive regarding the identity of the sPLA₂. Finally, there are evidence suggesting that other PLA₂s including group VIA iPLA₂ and likely a cPLA₂ member are present in sperm cells (28;32). The locations of these intracellular PLA₂s and their likely distinct roles in sperm function remain to be investigated using inhibitors targeting specifically these enzymes.

We then investigated the role of mGX during *in vitro* capacitation and found that the sPLA₂ controls to a large extent the percentage of sperm cells undergoing “spontaneous” or premature AR, thereby inactivating them for the fertility race. Our experiments with WT versus mGX-deficient sperm first indicate a delayed paracrine role of endogenous mGX sPLA₂ on the rate of spontaneous AR (Figure 4A). Concerning the delayed action of mGX, it has been shown that different lipid mediators such as PGE1 and PAF can trigger AR and are produced early during *in vitro* capacitation (37;65). It is thus tempting to speculate that such lipid mediators are produced at the onset of capacitation on a subpopulation of “excessively primed” or damaged sperm by an intracellular PLA₂-dependent mechanism that triggers

initial AR and thereby releases mGX sPLA₂ which in turn amplifies spontaneous AR in a paracrine loop of activation.

The use of recombinant mGX sPLA₂ shows that subnanomolar concentrations of the enzyme can promote AR all over the time course of capacitation (Figure 4B, C and D) and thus demonstrates the high potency of mGX on AR. Interestingly, the action of mGX on AR reaches a maximal effect, even when using very high concentrations (Figure 4B), and leaves intact a subpopulation of sperm cells showing a normal morphology (Figure 6) and capable of fertilizing oocytes (Figure 8). Together, our results indicate that mGX likely contributes as an important factor to explain spontaneous AR and to participate to *in vitro* capacitation, at least by triggering “spontaneous” AR in a subpopulation of likely damaged sperm. This suggests a role of mGX in sperm cell sorting during capacitation as a mechanism to improve fertility outcome. Our current view of the *in vivo* situation is that the heterogeneous population of ejaculated sperm becomes exposed to mGX sPLA₂ (and possibly other sPLA₂ activities) after their mixing with seminal plasma secretions and during their swimming through the female tract. Indirect evidence supporting this view include the fact that i) various populations of sperm with a different lipid composition, a damaged plasma membrane and externalization of phosphatidylserine related to “spontaneous” AR have been identified (12;13;66) ii) seminal plasma and female tract secretion both contain endogenous PLA₂ regulators (67-70) iii) a relationship was found between PLA₂ activity in human sperm, semen fluid and male fertility (71),

The mechanism by which mGX promotes AR clearly depends on its enzymatic activity first because the catalytically-inactive mutant H48Q and the proenzyme form of mGX are inactive and second because the specific sPLA₂ inhibitor LY329722 prevents mGX-induced AR (Figure 5A and B). The target of mGX is likely phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine enriched in polyunsaturated fatty acids at the sn-2 position, which

are reorganized in the sperm head plasma membrane in microdomains during capacitation (7;72-75). Sphingomyelin may have a role of regulator of mGX activity. Indeed, we and others have shown that mGX has a potent hydrolytic activity on such phospholipids and that sphingomyelin could regulate its activity (63;76;77). Moreover, sphingomyelinase speeds up sperm capacitation and increases spontaneous AR (78). The fact that the two major products of mGX sPLA₂, LPC and free fatty acids are able to trigger AR also supports this mechanism (42;43;52). This direct mechanism also fits with the fact that mGX-induced AR does not require intracellular Ca²⁺ (Figure 5C). Whether mGX may be acting on a particular population of damaged sperm with altered plasma phospholipid asymmetry including externalized phosphatidylserine or oxidized phospholipids associated with a decreased fertility potential also remains to be determined (14;66;79;80).

We have clearly demonstrated that mGX sPLA₂ is a potent regulator of spontaneous AR during capacitation, and a defect in this process or its inhibition has a marked negative effect on the fertility outcome, by increasing the rate of aborted embryos and decreasing the rate of 2-cell embryos. We have indeed demonstrated that i) decreasing AR by inhibition of mGX decreases fertility outcome while increasing AR by addition of recombinant mGX increases fertility outcome, and ii) mGX^{-/-} sperm shows simultaneously a lower rate of spontaneous AR and a higher rate of aborted embryos, when compared to mGX^{+/+} sperm. In sperm from CD46-deficient mice, a positive link between the rate of spontaneous AR and fertility has been mentioned but not demonstrated (3). It is important to note that the effectors used to modify the rate of spontaneous AR have been applied only during capacitation and then washed out, and thus these effectors or mGX catalytic products are unlikely to affect the downstream fertilization events. Our experiments thus support a model where mGX sPLA₂ targets a subpopulation of sperm, triggers their premature AR during capacitation, and thereby discards them from the competition race for fertilization.

Our experiments also provide evidence for a second role of mGX during fertilization, after zona pellucida-induced AR and the release of mGX in the sperm-egg environment. Indeed, we have shown that mGX^{-/-} sperm presented a fertilization rate lower than that of mGX^{+/+} sperm, with a mean decrease of 44% to 68% (Figure 3D and 3E). In comparison, blocking mGX activity during capacitation of mGX^{+/+} sperm also produced a decrease of the fertilization rate, but remarkably lower than mGX^{-/-} sperm, with mean decreases of only 24% (with LY329722, Figure 7A), 39% (with YM26734, Figure 9A) and 37% (with mGX antibody, Figure 9B). These results clearly support a second role of mGX downstream of capacitation. Assuming that mGX has two different mechanisms of action, one during capacitation and another during fertilization, one can expect to see a more robust effect on fertility when using mGX^{-/-} sperm than when using an sPLA₂ inhibitor or an antibody which were only added during capacitation and that would block only released mGX sPLA₂. Indeed, it is important to note that in the experiments using sPLA₂ inhibitor or mGX antibody, the acrosomal mGX present in non-acrosome reacted sperm should remain fully active since inhibitors have low permeability (58), antibodies are impermeant, and these compounds were washed out before gametes mixing. Second, the fact that LPC, which was only added during the fertilization step, was able to restore the fertilizing potential of sperm capacitated in conditions where mGX was inhibited, may also supports a role of mGX when secreted during zona-pellucida-induced AR. Besides, LPC increases both sperm binding to ZP and sperm-oocyte fusion (44;45). The targets of the mGX metabolites allowing sperm to efficiently fertilize egg remain however to be determined. In conclusion, we have demonstrated that the fertility outcome is controlled by mGX, acting at two different stages, and any defects in mGX activity at these stages *in vitro* produces a drop in fertility.

We have however observed no defect in fertility when crossing mGX-deficient male mice with WT females (not shown). This would argue for a non critical role of mGX in sperm

function, but given the essential role of sperm in the propagation of life, a redundancy of systems would not be unexpected. Indeed, there are many examples of knockout mice lacking important genes in sperm physiology and AR which are apparently fertile because of redundant or compensatory mechanisms. A non-exhaustive list of such genes include Ca^{2+} channels (81;82), acrosin (83), caveolin-1 (84) or a sperm specific aminophospholipid transporter (14). The lack of obvious reproductive defect in $\text{mGX}^{-/-}$ mice is supported by the fact that multiple extra or intracellular PLA_2 activities have been described in sperm physiology which may act in concert or may be partially redundant(27;28;32). However, we observed a lower fertility when crossing male and female mGX -deficient mice (Figure 3). This result suggests that mGX is also present in the female tract and may compensate for the deficit of mGX in sperm. This view is supported by our preliminary data showing the presence of mGX sPLA_2 in the female reproductive tract, notably in the uterine and endometrial epithelium (unpublished data). Similar observations have been made for group VIA phospholipase A_2 knockout mice, where crossings between group VIA-deficient males and females produced almost no offspring while crossings between group VIA-deficient males and WT females did (28). More generally, this $\text{mGX}^{-/-}$ sperm phenotype illustrates a well-known human infertility situation where the infertility of a couple is due to the combination of male and female deficits. Such a cause is involved in approximately 20% of infertile couples (83).

Sperm population is very heterogeneous and an important fraction (20-30%) presents morphological or functional defects that impair embryo development as demonstrated for human sperm with pre-apoptotic status (85),(86) and therefore reduces the overall fertility outcome. Our data support the view that mGX triggers a premature AR of an infertile sperm subpopulation which is unable to ensure normal embryo development; and mGX would prevent this population to participate as negative competitors to the fertilization process.

Therefore, the so-called “spontaneous AR” would correspond in part to the premature AR triggered by mGX and could represent a physiological mechanism of sperm cell sorting, that compensates for the unreliable production of sperm. Such mechanisms would be important to optimize fertility both *in vivo* and *in vitro*. We have demonstrated that recombinant mGX boosts the endogenous effect of mGX on spontaneous AR and improves noticeably the rate of success of IVF. Moreover, sperm resistant to mGX-treatment, *i.e.* non-acrosome-reacted sperm, presented a normal ultrastructural morphology and fertilized oocytes obtained with mGX-treated sperm developed normally up to the blastocyst stage *in vitro*. Besides, a recent study has shown that removal of a human sperm population with externalized phosphatidylserine may enhance fertility potential in assisted medical procreation (80) and group X sPLA₂ may be useful to eliminate this population. Thus, mGX is a peculiar sPLA₂ that represents a hope for new therapeutic strategies to fight against human male infertility: mGX could be used as a potent therapeutic agent in assisted reproduction techniques, either to improve IVF outcome or to select sperm for intra-cytoplasmic sperm injection based on its acrosomal status .

Methods

All animal procedures were run according to the French and Japanese guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the respective local Ethical Review Committee.

In situ hybridization . Paraffin embedded blocks and sections of 8-wk-old mouse testis for *in situ* hybridization (ISH) were obtained from Genostaff Co., Ltd. The mice were dissected, fixed with Tissue Fixative (Genostaff Co., Ltd.), and then embedded in paraffin by their proprietary procedures, and sectioned at 6~8 μ m. For *in situ* hybridization, tissue sections were de-waxed with xylene, and rehydrate through an ethanol series and PBS. The sections were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min and then washed with PBS. The sections were treated with 8 μ g/ml proteinase K in PBS for 30 min at 37°C, washed with PBS, re-fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, again washed with PBS, and placed in 0.2 N HCl for 10 min. After washing with PBS, the sections were acetylated by incubation in 0.1 M tri-ethanolamine-HCl, pH 8.0, containing 0.25% acetic anhydride for 10 min. After washing with PBS, the sections were dehydrated through a series of ethanol. Sense and antisense cRNA probes for *mGX* were prepared by random priming with digoxigenin (DIG) RNA Labeling Mix (Roche). Hybridization was performed with the probes at concentrations of 300 ng/ml in the Probe Diluent-1 (Genostaff Co., Ltd.) at 60°C for 16 h. After hybridization, the sections were washed in 5 x HybriWash (Genostaff Co., Ltd.), equal to 5 x SSC, at 50°C for 20 min and then in 2 x HybriWash containing 50% formamide at 50°C for 20 min, followed by RNase treatment in 50 μ g/ml RNase A in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 1M NaCl and 1mM EDTA for 30 min at 37°C. Then the sections were washed twice with 2 x HybriWash at 50°C for 20 min, twice with 0.2 x HybriWash at 50°C for 20 min, and once with TBST (0.1% Tween 20 in TBS). After treatment with 0.5% blocking reagent (Roche) in TBST for 30 min,

the sections were incubated with anti-DIG alkaline phosphatase conjugate (Roche) diluted 1:1000 with TBST for 2 h at room temperature. The sections were washed twice with TBST and then incubated in 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, containing 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, and 0.1% Tween 20. Coloring reactions were performed with NBT/BCIP solution (Sigma) overnight and then washed with PBS. The sections were counterstained with Kernechtrot stain solution (Mutoh), and mounted with Crystal/Mount (Biomedica).

In situ hybridization was performed with a probe of mouse group X phospholipase A₂ (*mGX*) that encompassed the residues 221-576 ([G+C]% = 55.90) of the Accession # NM_011987.

Quantitative RT-PCR. Total RNAs were isolated from testis and epididymis of 8-week-old male C57BL/6 mice with TRIzol reagent (Invitrogen) and purified using an RNeasy RNA Purification Kit (Qiagen). First-strand cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Japan). For quantitative RT-PCR analysis, the reaction was carried out on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the Taqman probe for *mGX* (Mm00449530_m1). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 20 s, 55°C for 20 s, and 72°C for 30 s. The expression of 18S ribosomal RNA (accession # X00686) was used for normalization.

Immunohistochemistry. Mouse testis samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. The tissue sections (4 µm thick) were incubated with Target Retrieval Solution (Dako Cytomation) as required, and then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-*mGX* antibody (from M. H. Gelb, University of Washington, Seattle) or normal rabbit IgG at 1:100 dilution in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.15 M NaCl (TBS). The sections were then treated

with a CSA (catalyzed signal-amplified) System Staining Kit (Dako Cytomation) with diaminobenzidine substrate, followed by counterstaining with hematoxylin and eosin.

Immunofluorescent microscopy. Epididymal spermatozoa from C57BL/6 mice were washed with PBS and fixed on glass slides with 3% (v/v) paraformaldehyde in TBS for 1 h. After 3 washes with PBS, fixed cells were treated with blocking solution (1% (w/v) bovine serum albumin and 0.5% (w/v) saponin in TBS) for 1 h, with rabbit anti-mGX or control antibody as a primary antibody at 1:200 dilution in blocking solution for 2 h, and then with FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody at 1:200 dilution in blocking solution for 2 h, with 3 washes in each interval. After 6 washes with TBS, immunofluorescent signals were visualized with a laser scanning confocal microscope (IX70; Olympus).

Acrosome reaction assay. Sperm cells from caudae epididymes were allowed to swim in M2 medium for 10 min. If necessary, sperm were capacitated in M16 medium with 2% fatty acid free BSA (Bovine Serum Albumin) at 37°C in a 5% CO₂ incubator during various periods of time. For sPLA₂ treatment, sperm were incubated with sPLA₂ in M16 medium at 37°C for the last 10 min. Cells were transferred in PBS solution and then fixed with 4% PFA solution for 2 min. Sperm were washed with 100 mM ammonium acetate for 2 min and wet-mounted on slides and allowed to air dry. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%) for 2 min and finally rinsed with water. Slides were counted immediately and 150 sperm cells at least were scored per slide.

Electron microscopy. Sperm cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4 during 2 hours at room temperature. Cells were then washed with buffer and post fixed with 1% Osmium tetroxide in the same buffer during 1 hour at 4°C. After extensive washing with water cells were then stained with 0.5% uranile acetate pH 4 overnight at 4°C. Cells were then dehydrated through graded alcohol (30%-60%-90%-100%-

100%-100%) and infiltrate with a mix of 1/1 epon/alcohol 100% during 1 hour before several baths of fresh epon (Flukka) during 3 hours. Finally, cells were centrifugated and immersed in fresh Epon and polymerised during 3 days at 60°C. Ultrathin sections of the cell pellet were cut with an ultramicrotome (Leica). Sections were post-stained with 4% uranile acetate and 1% lead citrate before being observed in an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX).

Detection of sPLA₂ proteins in sperm cells. Sperm cells from 8 caudae epididymes of different mouse strains (C57BL/6J mGX sPLA₂-deficient mice or their WT littermates, OF1 and BalbC) were allowed to swim for 15 min at 37°C in 2.5 ml of M2 medium. Five hundreds μ l aliquotes of sperm cells were then diluted in 4.5 ml of M16 medium containing 2% fatty acid free BSA and further incubated at 37°C for 10, 45 and 90 min. In some assays, A23187 Ca²⁺ ionophore (5 μ M) was added between 60 and 90 min of incubation. After incubation, sperm cells were spun down for 8 min at 1,200 rpm, and supernatants and cell pellets were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. sPLA₂ protein and enzymatic activity were analyzed on crude supernatants and cell pellets after resuspension in 500 μ l of M16 medium containing a cocktail of protease inhibitors (EDTA-free complete inhibitor set, Roche Biochemicals) and lysis with a Branson 350 Sonifier Cell disrupter. Time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA) for sPLA₂ was performed as described with minor modifications (64). Briefly, 1 to 5 μ l of protein sample were diluted in 100 μ l of Delfia assay buffer (Tris-HCl buffered NaCl solution, pH 7.8, containing NaN₃, BSA, bovine gamma globulins, Tween 40, DTPA and inert red dye, Perkin Elmer Wallac, Turku, Finland) and added to sPLA₂ IgG-coated microtiter wells previously washed twice with TR-FIA washing solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.9% NaCl, 0.04% NaN₃ and 0.02% Tween 20). After incubation at room temperature with constant shaking at 200 cycles/min for 30 min, wells were washed four times with TR-FIA washing solution, incubated with 100 μ l of Eu-labeled mGX IgG tracer (0.5 μ g/ml diluted in Delfia Assay Buffer), and washed again four

times as above. After washing, 100 μ l of Delfia enhancement solution were added to wells, incubated at room temperature for 5 min with shaking at 200 cycles/min and thereafter for 10 min without shaking. Time-resolved fluorescence was measured using a Wallac Envision Perkin Elmer plate reader and optimized optical modules for DELFIA assays. sPLA₂ enzymatic activity was measured using radiolabeled E. coli membranes as substrate (63). Briefly, 5-50 μ l of cell lysates or supernatants were incubated for 60 min in 300 μ l of sPLA₂ activity buffer (0.1 M Tris pH 8.0, 10 mM CaCl₂, and 0.1% bovine serum albumin containing 100,000 dpm of [3H]oleate-radiolabeled E. coli membranes. Reactions were stopped by addition of 300 μ l of stop buffer (0.1 M EDTA pH 8.0 and 0.5% fatty acid-free bovine serum Albumin). Mixtures were centrifuged at 10,000 g for 5 min, and supernatants containing released [3H]oleate were counted.

Production of recombinant sPLA₂s. Recombinant mouse group IIA, IIE, V and X sPLA₂s were produced as described previously (87). PromGX sPLA₂ and the H48Q mutant of mGX sPLA₂ was produced as for mature WT mGX sPLA₂ using the pAB3 vector in which the full-length cDNA coding for PromGX was inserted in frame with the Δ GST protein and the factor Xa cleavage site, which were removed by using the factor Xa protease (87). The detailed procedure for the production and full characterization of promGX sPLA₂ will be reported elsewhere (Jemel et al., in preparation).

In vitro fertilization. Sperm cells, obtained by manual trituration of caudae epididymes from male mice (OF1, mGX^{-/-} or WT littermates), were allowed to swim in M2 medium for 10 min. Eggs were collected from mature OF1 females (6-weeks old) synchronized with 7.5 units of PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin) and 7.5 units of hCG (human chorionic gonadotrophin) before collection. Per condition, the number of scored oocytes was 43 +/- 19 (mini 20 ; max 109). We carried out IVF using standard protocols (50). Eggs were incubated with approximately 1.5 to 5 10^5 sperm cells/ml (37°C, 5% CO₂) in M16 medium. Unbound

sperms were washed away after 4 hours of incubation. Twenty four hours after fertilization, we scored the different stages (unfertilized oocytes, 2-cell embryos as an indication of successful fertilization and aborted embryos). Schematic course of IVF experiments (Figure S1): after swimming, sperm were first capacitated for 35 to 60 min in M16-2% BSA (37°C, 5% CO₂). When necessary, mGX inhibitors or mGX antibody was included during the full period of capacitation. For recombinant mGX treatment, sperm cells were incubated after capacitation for 10 min in M16 medium containing 200 nM mGX, 1 μM LY329722 or mGX + LY329722. After treatment, drugs were removed by centrifugation (1200 rpm, 5 min) and washed to remove unbound drug, possible lipid metabolites and all acrosomal compounds released during sPLA₂-induced AR. The rationale for this procedure was to avoid a subsequent and uncontrolled effect on IVF outcome by an uncharacterized compound released during AR like PAF (37). After drug washing, the concentration of remaining unbound mGX was estimated to be 1 nM, from dilution calculation. We checked that 1 nM mGX did not induce effects on sperm-oocyte fusion (38). For this purpose, we performed IVF experiments in which sperm and oocytes were incubated with 1 nM mGX throughout the capacitation and the fertilization: no difference was found between control and treated gametes (data not shown). Finally, washed sperm were introduced into droplets containing between 20 and 109 oocytes. For LysoPC rescue experiments, LysoPC is introduced in the fertilization droplets in the same time than sperm. After 4 hours of co-incubation, unbound sperm were washed away and IVF outcomes were scored at 24h00.

Chemical compounds. M2, M16 medium and BSA (Cohn Fraction V-low fatty acid) were purchased from Sigma. PMSG is from Ceva santé animal and HCG is from Intervet. LPC (L-alpha-lysophosphatidylcholine from chicken egg) is from Avanti and YM26734 from Yamanouchi Pharmaceutical, Japan.

Statistical study. Statistical analyses were performed with SigmaPlot. T-test was used to compare effect of various compounds on AR. For IVF experiment, in order to avoid problem with the variability of male fertility, the sperm from a unique male was used to compare control and treated conditions in one experiment. Thus, we used paired t-test to compare the rate of 2-cell embryos and aborted embryos.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Région Rhône-Alpes (to C.A.), CNRS (to C.A. and G.L.), INSERM (M.D.W.), the Association pour la Recherche sur le cancer [grant 3977] and the Agence Nationale de la Recherche (to G.L.), and by grants-in aid for scientific research from the Ministry of Education, Science, Culture, Sports and Technology of Japan and PRESTO from the Japan Science and Technology Agency (to M.M. and S.H.) and the NOVARTIS Foundation for the Promotion of Science, and the Toray Science Foundation (M.M.). J.E. is supported by a fellowship by the Région Rhône-Alpes. We thank Lexicon Genetics Inc. for providing us mGX-deficient mouse and Pr. Michael Gelb for providing LY329722, indoxam and mGX antibody. We thank H. de Pommier and Latoxan for their support.

Reference List

1. AUSTIN,C.R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*. **170**:326.
2. Jungnickel,M.K., Sutton,K.A., and Florman,H.M. 2003. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms. *Cell* **114**:401-404.
3. Inoue,N., Ikawa,M., Nakanishi,T., Matsumoto,M., Nomura,M., Seya,T., and Okabe,M. 2003. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol.Cell Biol.* **23**:2614-2622.
4. Travis,A.J. and Kopf,G.S. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J.Clin.Invest.* **110**:731-736.
5. Fraser,L.R., Adeoya-Osiguwa,S.A., Baxendale,R.W., and Gibbons,R. 2006. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci.* **11**:1636-45.:1636-1645.
6. Salicioni,A.M., Platt,M.D., Wertheimer,E.V., Arcelay,E., Allaire,A., Sosnik,J., and Visconti,P.E. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc.Reprod.Fertil.Suppl.* **65**:245-59.:245-259.
7. Gadella,B.M., Tsai,P.S., Boerke,A., and Brewis,I.A. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int.J.Dev.Biol.* **52**:473-480.
8. Gadella,B.M. and Harrison,R.A. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* **127**:2407-2420.
9. Jones,R., James,P.S., Howes,L., Bruckbauer,A., and Klenerman,D. 2007. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J.Androl.* **9**:438-444.
10. Visconti,P.E., Ning,X., Fornes,M.W., Alvarez,J.G., Stein,P., Connors,S.A., and Kopf,G.S. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev.Biol.* **214**:429-443.
11. Lenzi,A., Picardo,M., Gandini,L., and Dondero,F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum.Reprod.Update.* **2**:246-256.
12. Buffone,M.G., Verstraeten,S.V., Calamera,J.C., and Doncel,G.F. 2009. High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa are Associated with Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies. *J.Androl.*
13. Zalata,A., Hassan,A., Christophe,A., Comhaire,F., and Mostafa,T. 2009. Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *Int.J.Androl.*
14. Wang,L., Beserra,C., and Garbers,D.L. 2004. A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev.Biol.* **267**:203-215.
15. Schaloske,R.H. and Dennis,E.A. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim.Biophys.Acta.* **1761**:1246-1259.
16. Lambeau,G. and Gelb,M.H. 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu.Rev.Biochem.* **77**:495-520.
17. Leslie,C.C. 2004. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem.Cell Biol.* **82**:1-17.

18. Turk,J. and Ramanadham,S. 2004. The expression and function of a group VIA calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2beta) in beta-cells. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **82**:824-832.
19. Bonventre,J. 2004. Cytosolic phospholipase A2alpha reigns supreme in arthritis and bone resorption. *Trends Immunol.* **25**:116-119.
20. Balsinde,J. and Balboa,M.A. 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal.* **17**:1052-1062.
21. Kita,Y., Ohto,T., Uozumi,N., and Shimizu,T. 2006. Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim.Biophys.Acta.* **1761**:1317-1322.
22. Cedars,A., Jenkins,C.M., Mancuso,D.J., and Gross,R.W. 2009. Calcium-independent phospholipases in the heart: mediators of cellular signaling, bioenergetics, and ischemia-induced electrophysiologic dysfunction. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **53**:277-289.
23. Kikawada,E., Bonventre,J.V., and Arm,J.P. 2007. Group V secretory PLA2 regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2alpha activation. *Blood.* **110**:561-567.
24. Murakami,M. and Kudo,I. 2004. Secretory phospholipase A2. *Biol.Pharm.Bull.* **27**:1158-1164.
25. Raymond,B., Leduc,D., Ravaux,L., Le Goffic,R., Candela,T., Raymondjean,M., Goossens,P.L., and Touqui,L. 2007. Edema toxin impairs anthracidal phospholipase A2 expression by alveolar macrophages. *PLoS.Pathog.* **3**:e187.
26. Yan,W., Assadi,A.H., Wynshaw-Boris,A., Eichele,G., Matzuk,M.M., and Clark,G.D. 2003. Previously uncharacterized roles of platelet-activating factor acetylhydrolase 1b complex in mouse spermatogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**:7189-7194.
27. Koizumi,H., Yamaguchi,N., Hattori,M., Ishikawa,T.O., Aoki,J., Taketo,M.M., Inoue,K., and Arai,H. 2003. Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J.Biol.Chem.* **278**:12489-12494.
28. Bao,S., Miller,D.J., Ma,Z., Wohltmann,M., Eng,G., Ramanadham,S., Moley,K., and Turk,J. 2004. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J.Biol.Chem.* **279**:38194-38200.
29. Ohto,T., Uozumi,N., Hirabayashi,T., and Shimizu,T. 2005. Identification of novel cytosolic phospholipase A(2)s, murine cPLA(2){delta}, {epsilon}, and {zeta}, which form a gene cluster with cPLA(2){beta}. *J.Biol.Chem.* **280**:24576-24583.
30. Kallajoki,M., Alanen,K.A., Nevalainen,M., and Nevalainen,T.J. 1998. Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. *Prostate.* **35**:263-272.
31. Masuda,S., Murakami,M., Matsumoto,S., Eguchi,N., Urade,Y., Lambeau,G., Gelb,M.H., Ishikawa,Y., Ishii,T., and Kudo,I. 2004. Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim.Biophys.Acta.* **1686**:61-76.
32. Roldan,E.R. and Shi,Q.X. 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci.* **12**:89-104.
33. Thakkar,J.K., East,J., Seyler,D., and Franson,R.C. 1983. Surface-active phospholipase A2 in mouse spermatozoa. *Biochim.Biophys.Acta.* **754**:44-50.
34. Antaki,P., Guerette,P., Chapdelaine,A., and Roberts,K.D. 1989. Detection of prophospholipase A2 in human spermatozoa. *Biol.Reprod.* **41**:241-246.
35. Langlais,J., Chafouleas,J.G., Ingraham,R., Vigneault,N., and Roberts,K.D. 1992. The phospholipase A2 of human spermatozoa; purification and partial sequence. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **182**:208-214.

36. Lessig,J., Reibetanz,U., Arnhold,J., and Glander,H.J. 2008. Destabilization of acrosome and elastase influence mediate the release of secretory phospholipase A2 from human spermatozoa. *Asian J.Androl.* **10**:829-836.
37. Wu,C., Stojanov,T., Chami,O., Ishii,S., Shimizu,T., Li,A., and O'Neill,C. 2001. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J.Biol.Chem.* **276**:26962-26968.
38. Roldan,E.R. and Fraggio,C. 1993. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J.Biol.Chem.* **268**:13962-13970.
39. Yuan,Y.Y., Chen,W.Y., Shi,Q.X., Mao,L.Z., Yu,S.Q., Fang,X., and Roldan,E.R. 2003. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biol.Reprod.* **68**:904-913.
40. Pietrobon,E.O., Soria,M., Dominguez,L.A., Monclus,M.L., and Fornes,M.W. 2005. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol.Reprod.Dev.* **70**:58-63.
41. Shi,Q.X., Chen,W.Y., Yuan,Y.Y., Mao,L.Z., Yu,S.Q., Chen,A.J., Ni,Y., and Roldan,E.R. 2005. Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *J.Cell Physiol.* **205**:344-354.
42. Fleming,A.D. and Yanagimachi,R. 1984. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J.Exp.Zool.* **229**:485-489.
43. Llanos,M.N., Morales,P., and Riffo,M.S. 1993. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J.Exp.Zool.* **267**:209-216.
44. Riffo,M. and Nieto,A. 1999. Lysophosphatidylcholine induces changes in physicochemical, morphological, and functional properties of mouse zona pellucida: a possible role of phospholipase A2 in sperm-zona pellucida interaction. *Mol.Reprod.Dev.* **53**:68-76.
45. Riffo,M.S. and Parraga,M. 1997. Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. *J.Exp.Zool.* **279**:81-88.
46. Sato,H., Taketomi,Y., Isogai,Y., Miki,Y., Yamamoto,K., Hosono,T., Arata,S., Ishikawa,Y., Ishii,T., Kobayashi,T. *et al.* 2009. Deficiency of group III phospholipase A2 impairs epididymal sperm maturation and fertility. *J.Clin.Invest.* **co-submission**.
47. Nevalainen,T.J., Eerola,L.I., Rintala,E., Laine,V.J., Lambeau,G., and Gelb,M.H. 2005. Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochim.Biophys.Acta.* **1733**:210-223.
48. Henderson,W.R., Jr., Chi,E.Y., Bollinger,J.G., Tien,Y.T., Ye,X., Castelli,L., Rubtsov,Y.P., Singer,A.G., Chiang,G.K., Nevalainen,T. *et al.* 2007. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J.Exp.Med.* **204**:865-877.
49. Fujioka,D., Saito,Y., Kobayashi,T., Yano,T., Tezuka,H., Ishimoto,Y., Suzuki,N., Yokota,Y., Nakamura,T., Obata,J.E. *et al.* 2008. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation.* **117**:2977-2985.
50. Fraser,L.R. 1993. In vitro capacitation and fertilization. *Methods in Enzymology: Guide to Techniques in Mouse Development* **225**:239-253.
51. Muller,C.H. 2000. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J.Androl.* **21**:10-30.
52. Meizel,S. and Turner,K.O. 1983. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **161**:315-318.

53. Janssen,M.J., van de Wiel,W.A., Beiboer,S.H., van Kampen,M.D., Verheij,H.M., Slotboom,A.J., and Egmond,M.R. 1999. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng.* **12**:497-503.
54. Rouault,M., Rash,L.D., Escoubas,P., Boilard,E., Bollinger,J., Lomonte,B., Maurin,T., Guillaume,C., Canaan,S., Deregnaucourt,C. *et al.* 2006. Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: the N-terminal region is more important than enzymatic activity. *Biochemistry.* **45**:5800-5816.
55. Morioka,Y., Saiga,A., Yokota,Y., Suzuki,N., Ikeda,M., Ono,T., Nakano,K., Fujii,N., Ishizaki,J., Arita,H. *et al.* 2000. Mouse group X secretory phospholipase A2 induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A2 receptor. *Arch.Biochem.Biophys.* **381**:31-42.
56. Smart,B.P., Oslund,R.C., Walsh,L.A., and Gelb,M.H. 2006. The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A2: elucidation of sites for enhanced binding. *J.Med.Chem.* **49**:2858-2860.
57. Green,D.P. 1978. The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J.Cell Sci.* **32**:137-151.
58. Mounier,C.M., Ghomashchi,F., Lindsay,M.R., James,S., Singer,A.G., Parton,R.G., and Gelb,M.H. 2004. Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A(2) occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A(2)-alpha. *J.Biol.Chem.* **279**:25024-25038.
59. Hamaguchi,K., Kuwata,H., Yoshihara,K., Masuda,S., Shimbara,S., Oh-ishi,S., Murakami,M., and Kudo,I. 2003. Induction of distinct sets of secretory phospholipase A(2) in rodents during inflammation. *Biochim.Biophys.Acta.* **1635**:37-47.
60. Mitsuishi,M., Masuda,S., Kudo,I., and Murakami,M. 2007. Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim.Biophys.Acta.* **1771**:1389-1396.
61. Cupillard,L., Koumanov,K., Mattei,M.G., Lazdunski,M., and Lambeau,G. 1997. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* **272**:15745-15752.
62. Valentin,E., Ghomashchi,F., Gelb,M.H., Lazdunski,M., and Lambeau,G. 1999. On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J.Biol.Chem.* **274**:31195-31202.
63. Singer,A.G., Ghomashchi,F., Le Calvez,C., Bollinger,J., Bezzine,S., Rouault,M., Sadilek,M., Nguyen,E., Lazdunski,M., Lambeau,G. *et al.* 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J.Biol.Chem.* **277**:48535-48549.
64. Eerola,L.I., Surrel,F., Nevalainen,T.J., Gelb,M.H., Lambeau,G., and Laine,V.J. 2006. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim.Biophys.Acta.* **1761**:745-756.
65. Schaefer,M., Hofmann,T., Schultz,G., and Gudermann,T. 1998. A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**:3008-3013.
66. Silva,P.F. and Gadella,B.M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* **65**:958-978.
67. Morishita,T., Nozaki,M., Sano,M., Yokoyama,M., Nakamura,G., and Nakano,H. 1992. Regional differences of phospholipase A2 activity in the rabbit oviductal epithelium. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* **47**:199-202.

68. Manjunath,P., Soubeyrand,S., Chandonnet,L., and Roberts,K.D. 1994. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem.J.* **303**:121-128.
69. Kallajoki,M., Alanen,K.A., Nevalainen,M., and Nevalainen,T.J. 1998. Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. *Prostate.* **35**:263-272.
70. Upreti,G.C., Hall,E.L., Koppens,D., Oliver,J.E., and Vishwanath,R. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim Reprod.Sci.* **56**:107-121.
71. Wang,S.K., Huang,Y.F., Li,B.T., Xia,X.Y., and Wang,Z.Z. 2003. Detection and clinical significance of phospholipase A2 in semen of male infertile patients. *Zhonghua Nan.Ke.Xue.* **9**:90-93.
72. Asano,A., Selvaraj,V., Buttke,D.E., Nelson,J.L., Green,K.M., Evans,J.E., and Travis,A.J. 2009. Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct subtypes of membrane rafts. *J.Cell Physiol.* **218** :537-548.
73. Parks,J.E., Arion,J.W., and Foote,R.H. 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol.Reprod.* **37**:1249-1258.
74. Thaler,C.D., Thomas,M., and Ramalie,J.R. 2006. Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Mol.Reprod.Dev.* **73**:1541-1549.
75. Wathes,D.C., Abayasekara,D.R., and Aitken,R.J. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol.Reprod.* **77**:190-201.
76. Mitsuishi,M., Masuda,S., Kudo,I., and Murakami,M. 2006. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. *Biochem.J.* **393**:97-106.
77. Singh,D.K. and Subbaiah,P.V. 2007. Modulation of the activity and arachidonic acid selectivity of group X secretory phospholipase A2 by sphingolipids. *J.Lipid Res.* **48**:683-692.
78. Cross,N.L. 2000. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. *Biol.Reprod.* **63**:1129-1134.
79. Kurz,A., Viertel,D., Herrmann,A., and Muller,K. 2005. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction.* **130**:615-626.
80. de Vantery,A.C., Lucas,H., Chardonens,D., and de Agostini,A. 2009. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod.Biol.Endocrinol.* **7**:1.:1.
81. Jungnickel,M.K., Marrero,H., Birnbaumer,L., Lemos,J.R., and Florman,H.M. 2001. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat.Cell Biol.* **3**:499-502.
82. Escoffier,J., Boisseau,S., Serres,C., Chen,C.C., Kim,D., Stamboulia,S., Shin,H.S., Campbell,K.P., De Waard,M., and Arnoult,C. 2007. Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice. *J.Cell Physiol.* **212**:753-763.
83. Nayernia,K., Adham,I.M., Shamsadin,R., Muller,C., Sancken,U., and Engel,W. 2002. Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol.Hum.Reprod.* **8**:434-440.
84. Drab,M., Verkade,P., Elger,M., Kasper,M., Lohn,M., Lauterbach,B., Menne,J., Lindschau,C., Mende,F., Luft,F.C. *et al.* 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* **293**:2449-2452.
85. Marti,E., Perez-Pe,R., Colas,C., Muino-Blanco,T., and Cebrian-Perez,J.A. 2008. Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim Reprod.Sci.* **106**:113-132.

86. Grunewald,S., Reinhardt,M., Blumenauer,V., Said,T.M., Agarwal,A., Abu,H.F., Glander,H.J., and Paasch,U. 2008. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil.Steril.*
87. Rouault,M., Le Calvez,C., Boilard,E., Surrel,F., Singer,A., Ghomashchi,F., Bezzine,S., Scarzello,S., Bollinger,J., Gelb,M.H. *et al.* 2007. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry.* **46**:1647-1662.

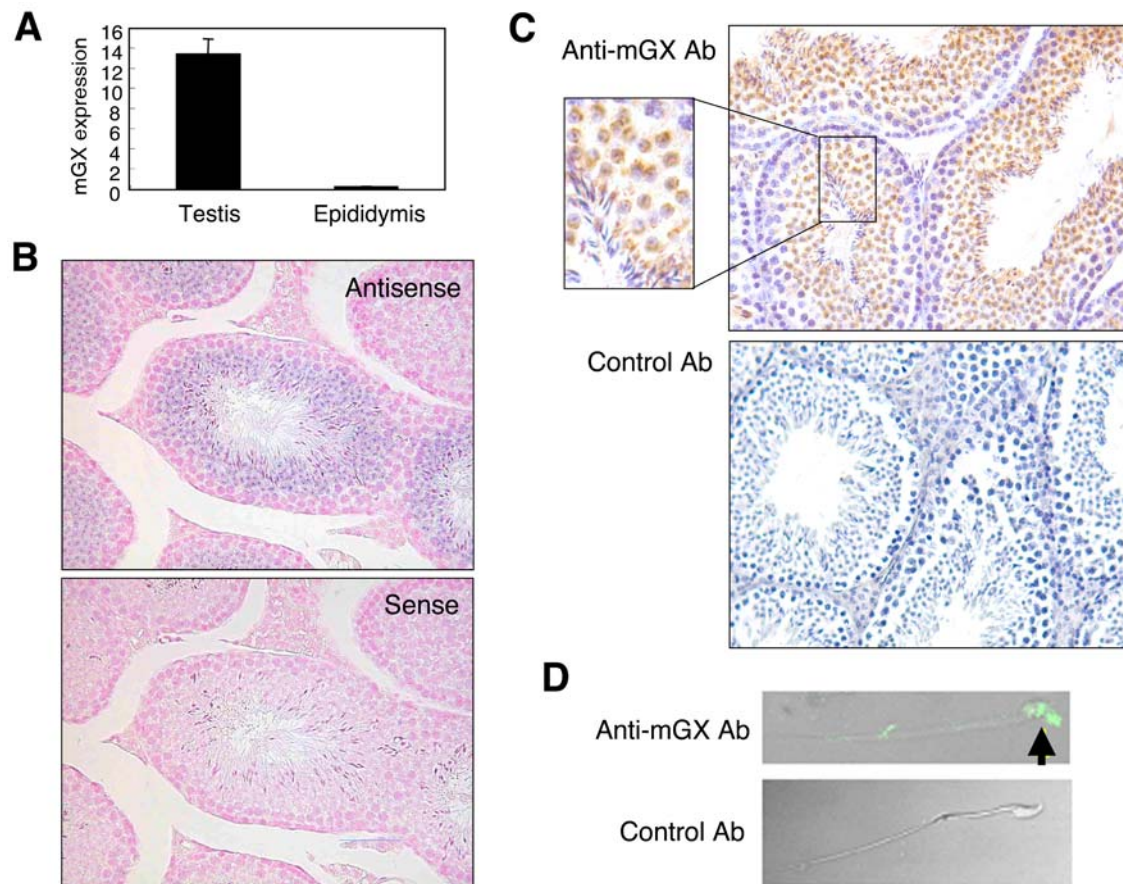


Figure 1

Expression of mGX sPLA₂ in mouse spermatogenic cells. (A) Quantitative RT-PCR analysis revealed that mGX mRNA is expressed in the testis, but only minimally in the epididymis. (B) In situ hybridization. Sections of the testis from 8-week-old C57BL/6J mice were hybridized with antisense and sense probes for mGX. Positive signal for mGX was detected in spermatogenic cells (spermatocytes and spermatids, but not spermatogonia) in the seminiferous tubules. (C) Immunohistochemistry. Sections of the testis from 8-week-old C57BL/6J mice were stained with anti-mGX antibody or control antibody. Intense staining was found in spermatocytes and spermatids in the seminiferous tubules, but not in spermatogonia. In magnified views, scattered signals with crescent and elongated shapes were evident in spermatocytes and spermatids, suggesting labeling in the acrosomal area. (D) Spermatozoa from *cauda* epididymis were stained with anti-mGX antibody or control antibody. Immunofluorescent signal for mGX sPLA₂ was confined to the sperm head.

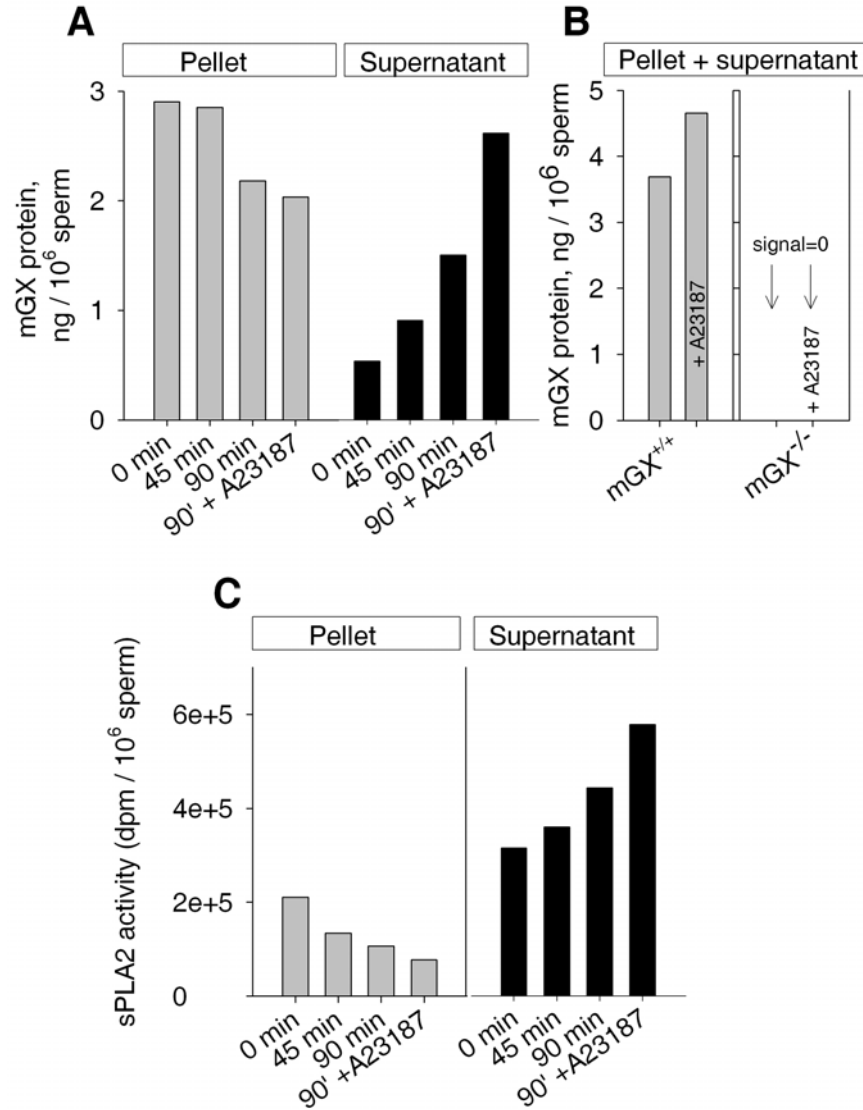


Figure 2 Catalytically-active mGX sPLA₂ is released from sperm during AR. (A) Total amount of mGX protein from time-resolved fluoroimmunoassays were measured in parallel in cell pellets and supernatants of WT sperm during capacitation (up to 90 min) and after AR triggered by addition of the Ca²⁺ ionophore A23187 (5 μ M) between 60 and 90 min. (B) Similar assays using mGX^{-/-} sperm, showing no mGX signal. (C) total sPLA₂ enzymatic activity measured using *E. coli* radiolabeled enzymatic assays in cell pellets and supernatants of WT sperm during capacitation. Data (A,B,C) correspond to the mean of two separate experiments, with 4 mice each.

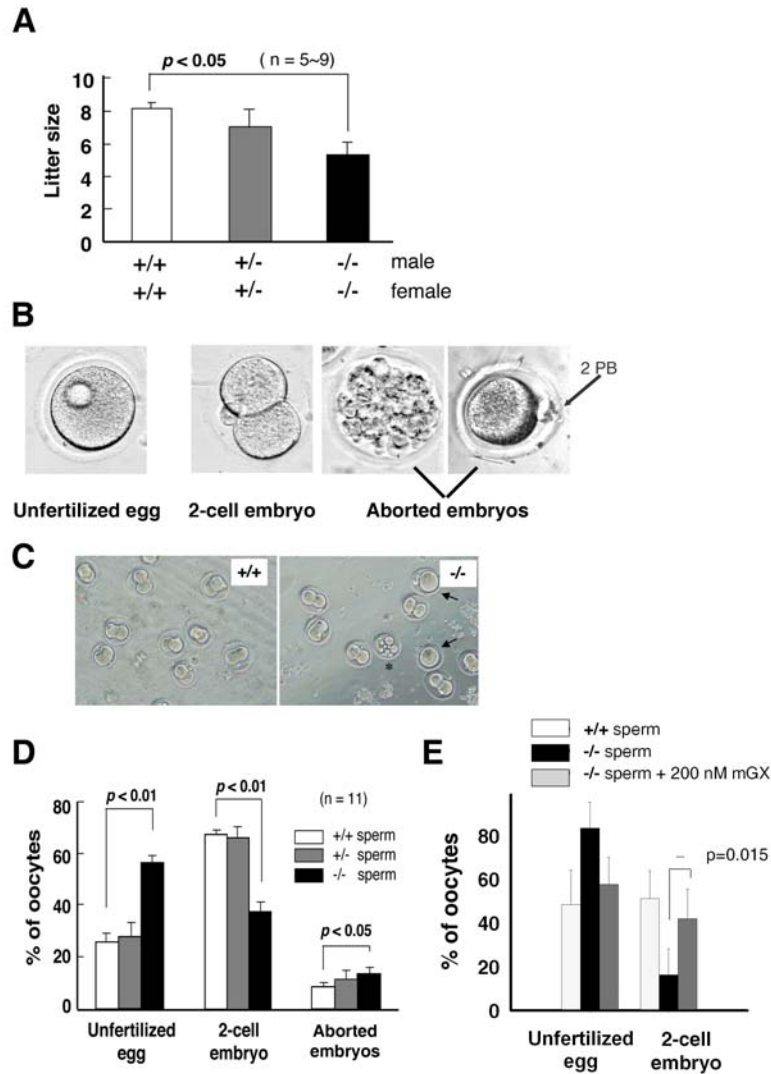


Figure 3 Escoffier et al

Figure 3

Lack of mGX in sperm affects male fertility. (A) The litter sizes of mGX-deficient mice are lower than those of littermates WT mice. (B) Pictures of the different stages obtained after IVF at 24 hours: unfertilized oocytes; 2-cell embryos (normal development); aborted embryos corresponding to oocytes with either multiple and uncontrolled divisions or presenting a second polar body (2 PB) but no cell division (arrows). (C) pictures of embryo development at 24 hours after fertilization: (+/+), WT sperm crossed with WT oocytes; (-/-), mGX^{-/-} sperm crossed with WT oocytes; arrows show unfertilized oocytes and asterix show aborted embryos (D) IVFs performed with mGX^{-/-} sperm and WT oocytes (black bars) have a lower rate of 2-cell embryos and a higher rate of aborted embryos than IVFs performed with WT littermate sperm and WT oocytes (white bars, $n=11$). (E) The low fertilizing potential of mGX^{-/-} sperm is rescued by recombinant mGX. IVF was performed by mixing WT oocytes with (i) WT control sperm from littermates (black bars, $n=4$), (ii) mGX^{-/-} sperm (white bars, $n=4$), or (iii) mGX^{-/-} sperm briefly treated with 200 nM mGX (treatment for 10 min at the end of the capacitation period (grey bars, $n=4$)). The development of eggs was evaluated after 24 hours by counting the different stages: unfertilized oocytes, 2-cell embryos and aborted embryos. *** statistically significant, p as indicated.

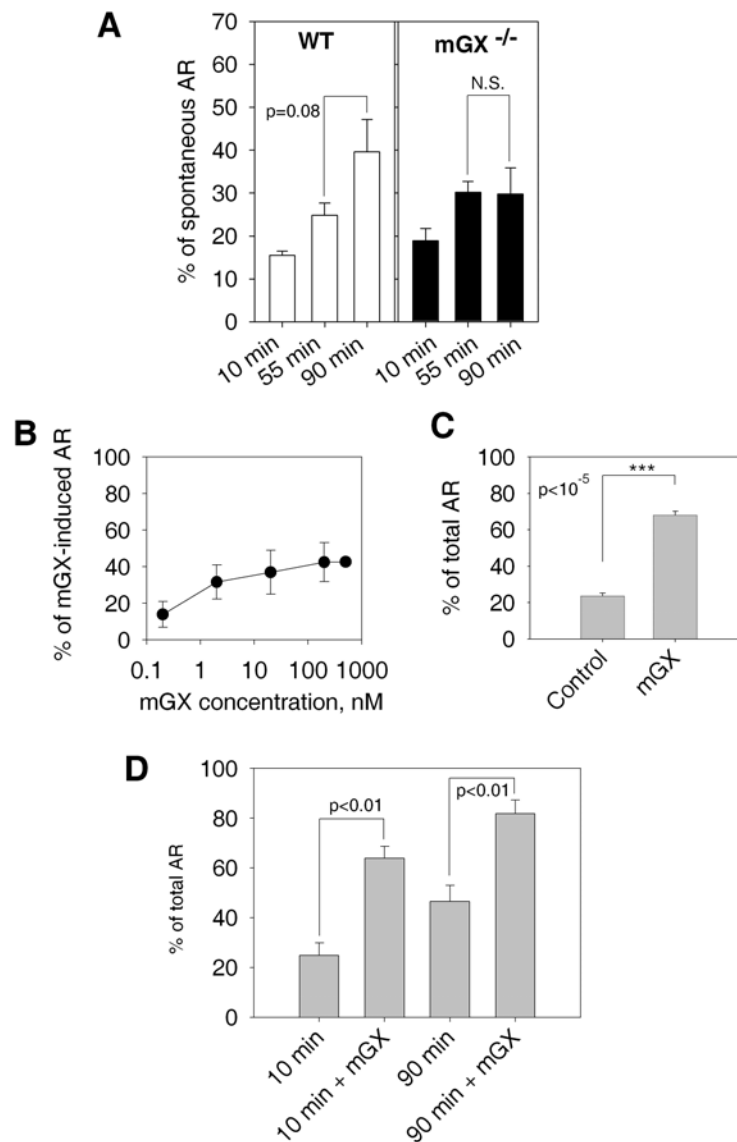


Figure 4

Endogenous mGX regulates spontaneous AR during capacitation. (A) Spontaneous AR of mGX^{-/-} sperm does not progress beyond 55 min of *in vitro* capacitation. Spontaneous AR was quantified during capacitation at 10, 55 and 90 min in mGX^{+/+} littermate sperm (white bars, n=5) and in mGX^{-/-} sperm (black bars, n=6). (B) Recombinant mGX sPLA2 is a potent inducer of AR. Dose-response curves for AR of non-capacitated sperm triggered by mGX (●, n=3 to 8). Results are expressed as total AR minus spontaneous AR to underline specific sPLA2-induced AR. (C) Recombinant mGX at 200 nM induced AR of non-capacitated sperm, n=23. Here, results correspond to total AR (D) Recombinant mGX sPLA₂ is a potent inducer of AR throughout *in vitro* capacitation (n=3). AR triggered by sPLA₂ was compared to spontaneous AR at 10 and 90 min of capacitation. Sperm were capacitated at 37°C in M16 with 2% BSA in a 5% CO₂ chamber. *** statistically significant, p as indicated.

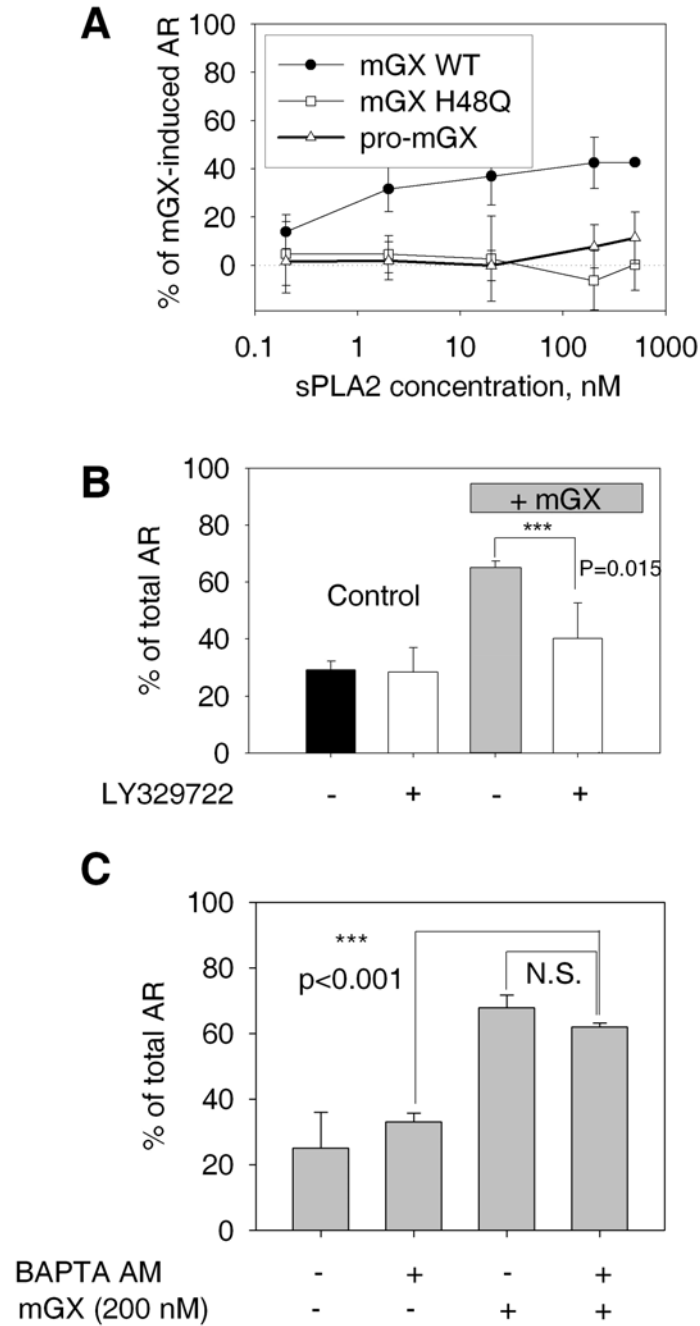


Figure 5

mGX triggered AR via its catalytic activity and independently of cytosolic Ca^{2+} rise. (A) Dose-response curves for AR of non-capacitated sperm triggered by mGX (●, n=3 to 8), mGX-H48Q (□, n=3) and pro-mGX (Δ, n=3). Results are expressed as sPLA₂-specific AR, i.e. total AR minus spontaneous AR. (B) The specific sPLA₂ inhibitor LY329722 (1 μM) blocked the ability of 200 nM mGX to trigger AR of sperm capacitated during 45 min (n=3). Results correspond to total AR (C) Loading sperm with 10 μM BAPTA did not modify spontaneous AR (two left columns, n=3) and mGX-induced AR (two right columns, t-test N.S., n=3) of sperm incubated in a non capacitating medium (no BSA). In the presence of BAPTA, the level of AR between non-treated sperm and mGX treated sperm is statistically significant, p as indicated.

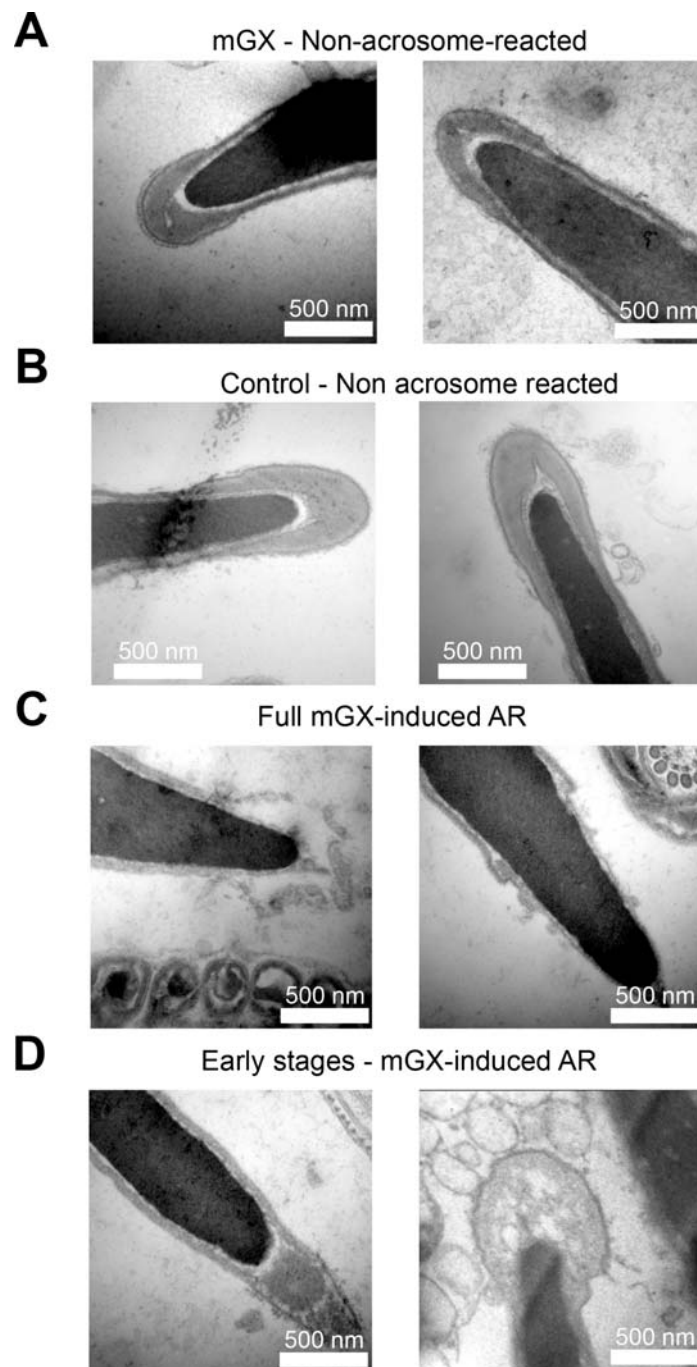


Figure 6

Ultrastructure of the head of mGX-sPLA₂ treated sperm (A) Electron micrographs of non acrosome-reacted sperm treated by 200 nM mGX (non capacitated sperm). (B) Electron micrographs of non acrosome-reacted control (untreated) sperm (non capacitated sperm). (C) Acrosome-reacted sperm (non capacitated sperm) in the presence of 200 nM mGX presented a normal morphological feature of sperm undergoing AR: fusion between the plasma and acrosomal membrane produced vesiculation (left picture) and the outer acrosomal membrane was fused with the plasma membrane and presented a typical double hair pin shape at the base of the acrosome (right picture) or (D) presented early stages of AR, *i.e.* cavitation.

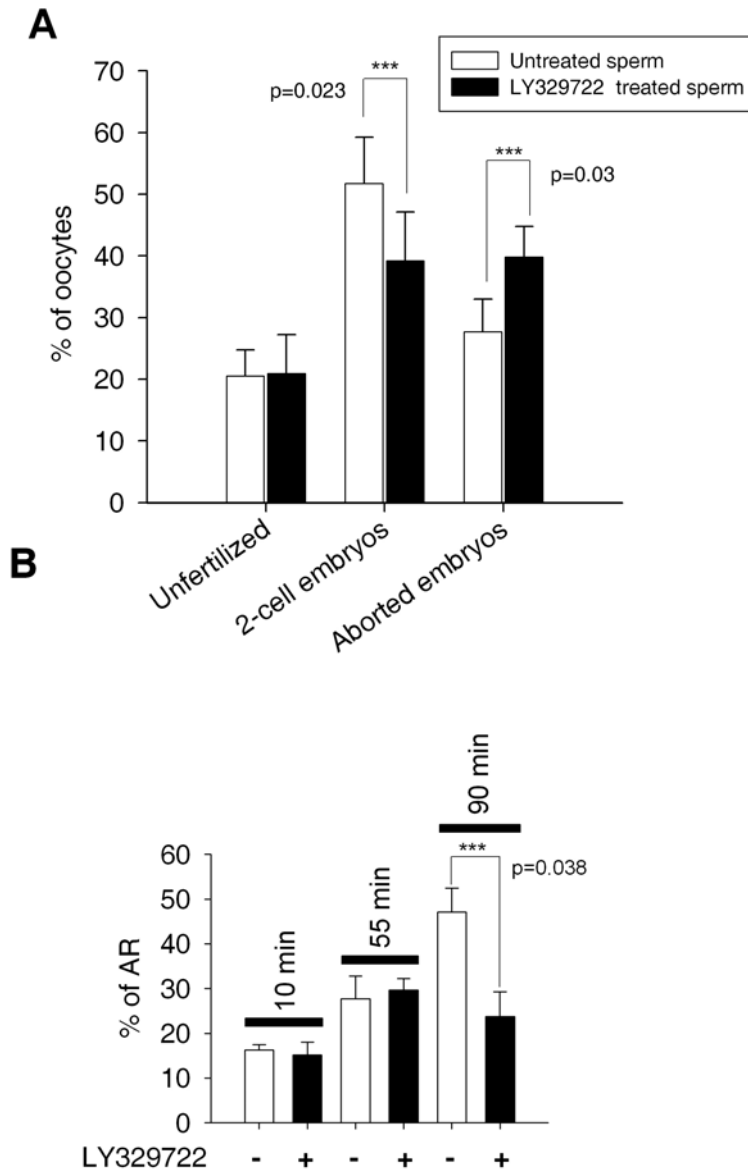


Figure 7

Blocking endogenous mGX with the specific inhibitor LY329722 impacts both fertility outcome and spontaneous AR. (A) Endogenous mGX, secreted during spontaneous AR, controls the yield of viable embryos, without changing the rate of fertilization. IVF experiments were performed either with control sperm (white bars) or with the same sperm treated throughout capacitation with 1 μ M LY329722 (black bars, n=8 males) and unfertilized oocytes, 2-cell embryos and aborted embryos were scored: inhibiting mGX decreases 2-cell embryos and increases aborted embryos. The design of the experiments clearly indicates that LY329722 controls the yield of viable embryos by inhibiting endogenous mGX secreted during spontaneous AR. (B) The sPLA₂ inhibitor LY329722 blocked the late phase of spontaneous AR. Spontaneous AR was quantified during capacitation at 10, 55 and 90 min in the absence (white bars) or presence of 1 μ M LY329722, (black bars, n=5). *** statistically significant, p as indicated (paired t-test).

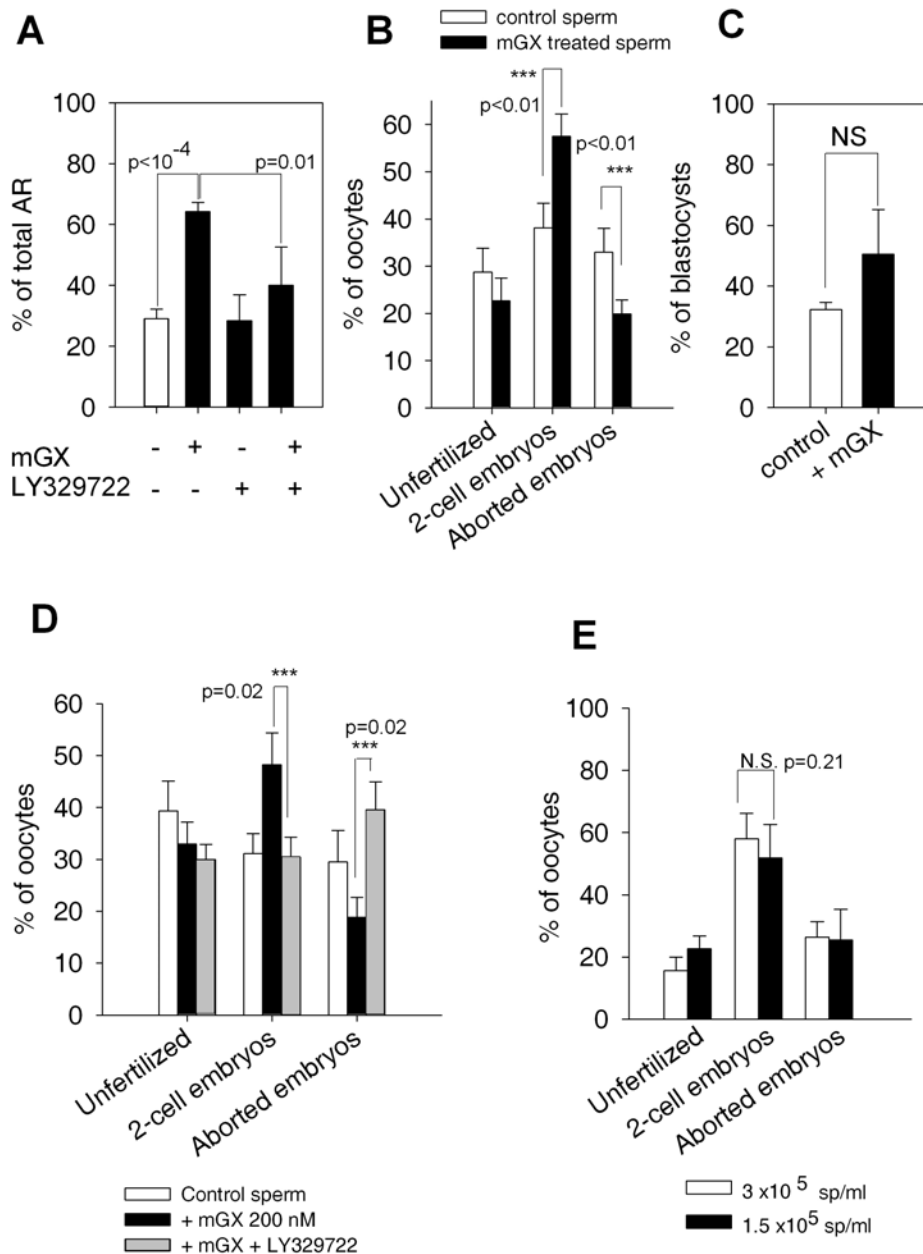


Figure 8

Exogenous mGX reinforces the effect of endogenous mGX on spontaneous AR and improves the fertility outcome. (A) Sperm used for IVF and briefly pretreated with exogenous mGX present a higher rate of spontaneous AR. WT sperm were allowed to capacitate for 45 min and incubated during the last 10 min of capacitation with mGX alone (200 nM), LY329722 alone (1 μ M), or mGX preincubated with LY329722. Only the mGX treatment triggered significant AR over the untreated condition (n=6). (B) Recombinant mGX controls the yield of viable embryos, without changing the rate of fertilization. IVF was performed either with control sperm (untreated, white bars) or with the same sperm treated briefly 10 min before the end of the capacitation period with 200 nM mGX (black bars, n=13 males, $p<0.01$) and unfertilized oocytes, 2-cell embryos and aborted embryos were scored: recombinant mGX increases 2-cell embryos and decreases aborted embryos. (C) 2-cell embryos obtained with mGX -treated sperm developed normally to the blastocyst stage in comparison to control embryos. (D) The specific mGX inhibitor LY329722 blocks the mGX-dependent increase in fertility. IVF was performed either with control sperm (untreated, white bars) or with the same sperm treated briefly for 10 min before the end of the capacitation period with 200 nM mGX (black bars, n=6 males, $p=0.02$) or with the same sperm treated briefly with 200 nM mGX but preincubated with 1 μ M LY329722 (grey bars, n=6, $p=0.02$) and unfertilized oocytes, 2-cell embryos and aborted embryos were scored (E) The number of sperm incubated with oocytes does not impact the fertility outcome. IVF were performed at two different concentrations of WT sperm. The number of non-acrosome-reacted sperm measured at the low concentration of sperm (70% of 1.5×10^5 cells – obtained from Figure 8A) was similar to the number of non-acrosome-reacted sperm measured at the high concentration when treated by 200 nM mGX (35% of 3×10^5 cells - obtained from Figure 8A), (n=4, $p=0.21$). Thus, changing sperm concentration does not change the 2-cell embryos and aborted embryos outcomes. *** statistically significant, p as indicated (paired t-test).

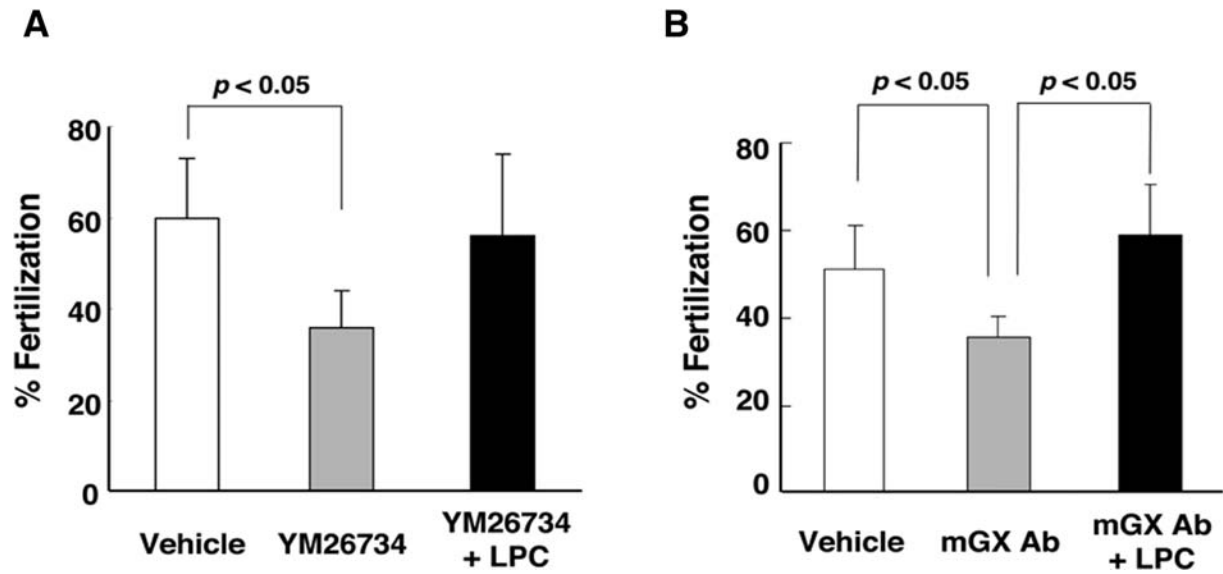


Figure 9

Addition of LPC during fertilization rescues the fertilization potential of sperm treated with sPLA₂ inhibitor or anti-mGX antibody during capacitation. (A) IVF experiments were performed with sperm treated or not with the sPLA₂ inhibitor YM26734 only during the capacitation period. LPC (1 µg/ml) was added only during gamete mixing. The ~50% reduction of the IVF rate measured with YM26734-treated sperm (grey bar n=3, p<0.05) was restored by supplementation with LPC (black bar). (B) A similar reduction and recovery of IVF were observed when sperm were treated with anti-mGX antibody during capacitation and LPC added back during gamete mixing (n=3, p<0.05), respectively.

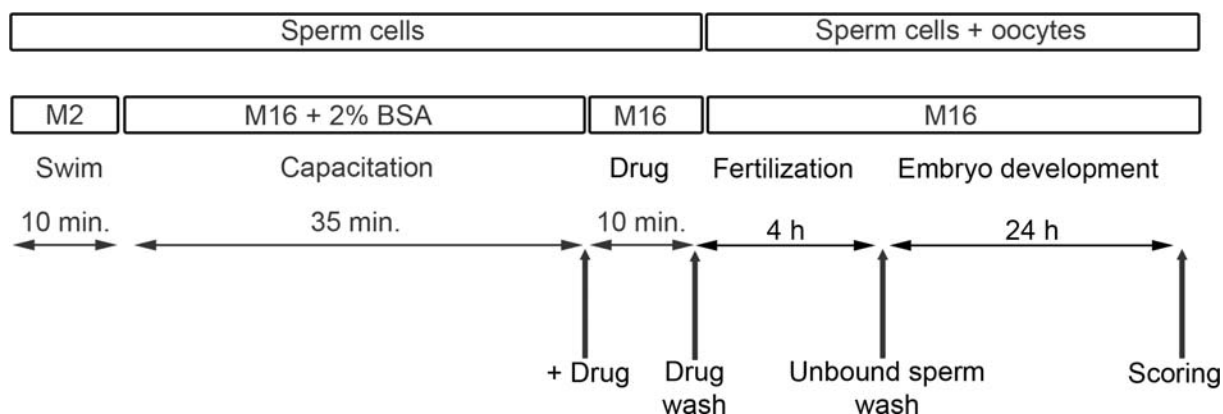


Figure S1

Schematic drawing of typical IVF experiments. Sperm were first capacitated for 35 min in M16-2% BSA and then incubated for the last 10 min with M16 medium containing the different effectors as specified in Figure legends, *i.e.* mGX recombinant protein, sPLA₂ inhibitors or a combination of both. After treatment, sperm were washed by centrifugation to remove unbound effectors, putative mGX catalytic products and all acrosomal compounds released during sPLA₂-induced AR. Finally, washed sperm were introduced into droplets containing oocytes (20-109 oocytes per experiment). After 4 hours of gamete mixing, unbound sperm were washed away and IVF outcomes were scored at 24 h.

Commentaires des reviewers pour l'article: Group X phospholipase A2 is secreted during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome

Dear Dr. ARNOULT,

I am writing to you on behalf of the Journal of Clinical Investigation's Editorial Board to thank you for submitting your manuscript, "Group X phospholipase A2 is secreted during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome" (our reference 40494-RG-1). After careful examination of your manuscript by both expert outside reviewers as well as the Editors, the Board has determined that your manuscript, in its current form, does not achieve the priority necessary for publication in the Journal of Clinical Investigation. Although all reviewers agree that your study is of potential interest and importance, a number of substantive concerns were raised upon review. If you believe that you can respond to the issues raised in the review process, we would be pleased to consider a revised version of this manuscript.

We hope that you will find the reviewers' comments helpful as you revise your manuscript. Following receipt of a revised manuscript, your paper will be re-evaluated and assigned a new priority ranking. Please be aware that current editorial policy permits only one revision of this manuscript and that we can offer no assurances that the work will ultimately be accepted. Also bear in mind that we will be reluctant to approach the original referees again in the absence of appropriate changes to address their concerns.

If you choose to resubmit, please enclose a point-by-point response to the reviewers' comments and a list of the incorporated changes, including the location in the manuscript of those changes. Thank you for giving us the opportunity to review this work, and we look forward to seeing the revised manuscript.

Sincerely, Laurence A. Turka, M.D. Editor-in-Chief

Reviewer comments: Reviewer A:

This manuscript provides novel information on the role of mGX sPLA2 in male fertility. The clinical relevance of the study would be enhanced if the authors could demonstrate the presence of GX sPLA2 in human sperm.

Specific comments:

Abstract: The statement “The size of litters from male mGX-deficient mice was slightly smaller than that of wild-type males” is somewhat misleading.

Methods: The authors should describe how the GX sPLA2^{-/-} mice were generated (or provide reference).

Figure 1D: If the authors want to conclude that GX sPLA2 is “confined” to the sperm head, they should provide more convincing data. Fluorescent microscopic images (rather than Nomarsky(?)) showing multiple cells would be appropriate. For the example shown, there seems to be green staining along the length of the tail region.

There are aspects of the data presented in Fig. 2 that don’t appear to “add up”. For example, it is notable that the Ca²⁺ ionophore triggers a ~2-fold increase in GX sPLA2 release at 90 min, yet the amount of GX sPLA2 in the pellet does not change. Also, the kinetics of the loss of GX sPLA2 mass in cells does not correspond to loss in activity (e.g., 45 min. time point). No error bars are indicated on the histograms; how many times was this experiment performed, and with how many replicates?

For enzymatic assays of cell pellets (Fig. 2C), how does the assay distinguish between sPLA2, cPLA2 and iPLA2? The authors provide data for mGX sPLA2 mass in WT and KO mice (Fig. 2B), but no data for sPLA2 activity. What does “the measured enzymatic activity was due to mGX since no variation of enzymatic activity was observed in mGX^{-/-} sperm” mean (p. 9, line 10)?

The authors should include activity data for WT and KO mice to make clear the contribution of GX sPLA2. The text describing Fig. 4 is confusing, and this is confounded by the fact that the data is presented as “% of spontaneous AR”, “% of mGX-induced AR” and “% of total AR.” The authors state “mGX caused a dose-dependent activation of AR with a maximal increase of ~50%...” (p. 11 line 5); what is being compared? Is the effect of GX sPLA2

deficiency on spontaneous AR statistically significant (Fig. 4A)? What is the dose of mGX used in Fig. 4D ?

How is the experiment depicted in Fig. 4C different from Fig.4D, 10 min timepoint? Results presented in Fig. 4A and Fig. 7B give the impression that the sPLA2 inhibitor has a greater effect on the late phase of spontaneous AR than deficiency in GX sPLA2, suggesting the possible involvement of another sPLA2 in this process or non-target effects of the inhibitor.

Discussion: The authors suggest that GX sPLA2 improves fertility by triggering spontaneous AR in a subpopulation of damaged cells, perhaps by targeting phospholipid-damaged sperm. This would imply that hydrolysis per se, and not the generation of lipolytic products, is important in this paracrine effect of GX sPLA2. To complement the studies in Fig. 9, the authors should determine whether addition of LPC rescues the decrease in spontaneous AR produced by LY329722 treatment.

Reviewer B:

This manuscript by Escoffier et al describes the invalidation of mGX sPLA2 a member of the secreted Phospholipase A2 family and its impact on mouse fertility. This manuscript is presented as an accompanying paper with another manuscript from a Japanese group (Sato et al., MS 40493) reporting the KO of another testis- and epididymis-expressed sPLA2.

Specifically dealing now with the Escoffier's story, the manuscript is correctly written but unnecessarily too long especially in the Discussion section. Although at a lower extent, the Introduction and the results sections could be more concise. The number of references is also large and should be kept to the most relevant articles. The story is of particular interest to specialists in male reproductive issues however it is relatively not that important in terms of clinical relevance. Although the invalidation of mGX PLA2 has an impact on fertility outcome when crosses were conducted with both males and females deficient for mGX PLA2, the fact that there is no fertility problem when KO-males were crossed with WT females argues for a non critical role of this enzyme in sperm function.

The female mGX

PLA2 activity thus compensates for the sperm defects. It should also be noted that the impacts recorded by the authors in terms of spontaneous AR with the male deficient gametes are quite

small (10% difference). The same observation can be made regarding the impact of blocking mGX activity on the percentage of oocytes reaching the 2 cell stage or/and on the percentage of aborted embryos. These figures are not in agreement with the "marked negative effect" on fertility outcome claimed by the authors. It is not clearly indicated at which age (both for males and females) were carried out the different crosses to evaluate the fertility impact? May be more serious impact on fertility could be observed with aging KO males? The observation that mGX sPLA2 is the major mouse sperm sPLA2 and that it contributes to most of the sPLA2 enzymatic activity should be illustrated at least as supplemental data. The fact that even high concentrations of recombinant mGX never induce AR in at least 30% of the sperm should be tentatively explained. One could eventually consider that this fraction of sperm cells are not responsive because they are damaged.

Minor points:

The title should be changed since the mGX sPLA2 is not "secreted" but released during AR. In the Introduction it is stated that capacitation depends on ion fluxes and protein phosphorylations. This is correct however according to Gagnon and Aitken it should be also stated that capacitation and AR are dependent on ROS signalling events that are as important as ions fluxes to trigger tyrosine phosphorylation events.

Figure 1D "upper panel" is not convincing at all. The selected spermatozoa appears quite abnormal.

Figure 2A: It is surprising to note that if you add the amount of protein found in the pellet to that present in the supernatant at 0 min it is largely less (by 25%) that the amount of protein present when you add the pellet and supernatant fractions at 90min + A23187 ? This might reflect that n=2 is probably not sufficient to be confident with the data.

Figure 3A. As said above, it would be more appropriate and correct to indicate here that males-/- mated with WT females present no change in fertility (as far as litter size is concerned). If the numbers are correct YM26734 treatment of sperm decrease the rate of fertilization by 40% and not by 50%.

Figure 4A. A 10% decrease overall in spontaneous AR is not that drastic.

Figure 6 is totally dispensable.

There are confusing statements: In the first paragraph of the Discussion section it is stated that the protein was detected in the sperm of several mammals including human while two sentences later it is indicated that its presence in human sperm should be checked out? Overall the Discussion is speculative. Although the idea of mGX sPLA2 released from sperm and functioning as a sperm cell sorting actor in order to remove a certain population of sperm cells presenting membranous lipid abnormalities is interesting, it is difficult to understand how the enzyme would sense these gametes?

4. Discussion

Comme je l'ai précisé dans la partie introduction, plusieurs études ont suggéré un rôle pour une ou plusieurs phospholipases A₂ sécrétées au niveau de la capacitation, la réaction acrosomique (AR) et la fécondation, mais la nature moléculaire de ces enzymes et leurs rôles spécifiques restent à l'heure actuelle encore inconnus. Le spermatozoïde mature exprime les sPLA₂ des groupes IID, IIC, V, X et IIF (Masuda, Murakami et al. 2004). Nous avons regardé dans ces deux manuscrits l'effet de différents sPLA₂ de mammifères sur deux étapes clés de la physiologie spermatique : la mobilité flagellaire (cf Article 2) et la réaction acrosomique (cf Article 3).

➤ ***Identification d'une nouvelle voie moléculaire de contrôle de la mobilité spermatique (Article 2).***

A l'heure actuelle, plusieurs aspects de la mobilité flagellaire ont été étudiés : la structure moléculaire de l'axonème (Escalier 2006), les mécanismes moléculaires impliqués dans le glissement des microtubules par le complexe dynéine (Esposito, Jaiswal et al. 2004), la régulation de la mobilité spermatique par le Ca²⁺ (Ren, Navarro et al. 2001; Castellano, Trevino et al. 2003; Ho and Suarez 2003; Schuh, Cartwright et al. 2004), la régulation de la mobilité spermatique par les lipides (Roudebush 2001; Wu, Stojanov et al. 2001). Mais les voies moléculaires impliquées dans la mobilité spermatique sont complexes et restent encore mal comprises. Nous avons ici montré pour la première fois que la motilité spermatique de souris est spécifiquement modulée par une nouvelle voie moléculaire : la voie enzymatique des sPLA₂, plus précisément par la sPLA₂ mGX.

Nous avons évalué l'effet de différentes phospholipase A₂ sécrétées de mammifères connus pour être présents dans les organes reproducteurs mâles, comme mGIIA, mGIID, mGIIE, MGX-et MGX-sPLA₂ (Masuda, Murakami et al. 2004) ou dans les voies féminines comme mGIIE (Valentin, Ghomashchi et al. 1999) sur la mobilité des spermatozoïdes en utilisant l'analyse du mouvement spermatique par le système CASA.

Seule la sPLA₂ mGX module la motilité des spermatozoïdes, contrairement aux autres sPLA₂s de mammifères. mGX diminue les paramètres de la mobilité spermatique de 30 % pour la VCL et de 17 % pour l'ALH. La modulation de la mobilité spermatique par mGX est

effectuée *via* son activité enzymatique, car deux isoformes de mGX inactif, H48Q-mGX et pro-mGX, ont été incapables de moduler la mobilité des spermatozoïdes.

La sPLA₂ mGX est une enzyme qui hydrolyse la liaison ester des phospholipides membranaires en position *sn*-2, produisant ainsi des lysophospholipides et des acides gras libres. Nous avons voulu voir si le mécanisme d'action de mGX sur la mobilité spermatique n'était pas lié à un changement lipidique de la membrane. Pour ce faire, nous avons utilisé un marqueur spécifique des phosphatidylsérines (PS) l'Anexine V-Cy3. Nous avons pu observer une externalisation des PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique des spermatozoïdes après l'application de mGX. Nous pouvons en conclure que mGX va moduler la mobilité des spermatozoïdes par un changement de la composition phospholipidique de la membrane plasmique.

➤ ***mGX est exprimée au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes et relâché durant la réaction acrosomique (article 3).***

Nous avons ici, montrée pour la première fois par hybridation *in situ*, immunohistochimie et technique TR-FIA (Time Resolved fluoroimmunoassays) que mGX est la principale sPLA₂ présente dans l'acrosome des spermatozoïdes de souris. Les résultats de TR-FIA et de réaction acrosomique *in vitro* nous ont permis de montrer qu'elle était libérée au cours de la réaction acrosomique sous sa forme active, et qu'elle contribue à l'établissement d'une activité enzymatique sPLA₂ dans le milieu extérieur où sont situés les spermatozoïdes pendant la capacitation.

➤ ***Rôle de mGX dans la physiologie spermatique (article 3).***

Nous avons évalué le rôle paracrine de mGX sur les spermatozoïdes voisins durant la capacitation, pour ce faire nous avons quantifié le taux de réaction acrosomique spontanée des spermatozoïdes mGX^{-/-}, des spermatozoïdes traités avec un inhibiteur de sPLA₂ et des spermatozoïdes traités avec des protéines recombinantes inactive de mGX et des spermatozoïdes traités avec mGX.

L'utilisation des formes recombinantes de mGX, des souris mGX^{-/-} et de l'inhibiteur de sPLA₂ nous a permis de mettre en évidence :

- que la phospholipase A₂ mGX augmente le taux de réaction acrosomique spontanée des spermatozoïdes en cours de capacitation (de 30 à 40%) et ce à des concentrations inférieures au nanomolaire.

- que l'augmentation du taux de réaction acrosomique spontanée par mGX est effectuée *via* son activité enzymatique, car les deux isoformes de mGX inactif, H48Q-mGX et pro-mGX ont été incapables de déclencher la RA et que l'inhibiteur de sPLA₂ diminue le taux de RA spontanées des souris contrôles.
- que mGX induit la RA d'une sous-population de spermatozoïdes.

De ces résultats, nous avons pu en conclure que mGX contrôle la physiologie spermatique au cours de la capacitation, par le déclenchement de réaction acrosomique spontanée d'une sous-population spécifique de spermatozoïdes.

Nous avons ensuite effectué des fécondations *in vitro* avec des spermatozoïdes mGX^{-/-}, des spermatozoïdes traités avec un inhibiteur de sPLA₂, des spermatozoïdes traités avec mGX des et spermatozoïdes mGX^{-/-} traités avec mGX. Ces fécondations *in vitro* nous a permis de montrer que mGX améliore le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, en augmentant le taux d'embryons au stade 2 cellules et en diminuant le taux d'embryons avortés.

Tous ces résultats nous suggèrent que le rôle de mGX dans la physiologie spermatique est d'induire des réactions acrosomiques à une sous-population de spermatozoïdes dite sous-fertile afin de trier les spermatozoïdes pour améliorer le taux de fécondation.

III. Évaluation du rôle fonctionnel et physiologique des canaux $\text{Ca}_v3.1$ et $\text{Ca}_v3.2$ dans une étape physiologie spermatique : La réaction acrosomique

5. Introduction

Comme je l'ai déjà précisé dans la partie introduction, la réaction acrosomique exige l'activation successive de trois types différents de canaux : le premier à s'activer est le canal calcique dépendant du voltage de type T (CCVD-bas seuil), puis c'est le tour du récepteur à l' IP_3 (Walensky and Snyder 1995; O'Toole, Arnoult et al. 2000) et le dernier à s'ouvrir est le canal de type SOC (appelé TRPC2).

L'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage produit un courant transitoire calcique, environ 1 seconde après l'application de ZP3 (Arnoult, Kazam et al. 1999), ce transitoire va contrôler l'activation du récepteur à l' IP_3 et *in fine* l'activation de TRPC2. Différents types d'inhibiteurs comme les dihydropyridines, bloquent les canaux calciques dépendants du voltage.

L'utilisation de ces inhibiteurs sur les spermatozoïdes va bloquer le courant calcique transitoire (correspondant à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage de type T) et le courant calcique soutenu (correspondant à l'ouverture des canaux IP_3 R et TRPC2). Ils vont ainsi bloquer la réaction acrosomique (Arnoult, Cardullo et al. 1996). La caractérisation moléculaire et le rôle physiologique des canaux calciques dépendants du voltage dans les spermatozoïdes sont très étudiés et sont le sujet de beaucoup de discordes. (Arnoult, Cardullo et al. 1996; Santi, Darszon et al. 1996; Goodwin, Leeds et al. 1997; Goodwin, Leeds et al. 1998; Arnoult, Kazam et al. 1999; Serrano, Trevino et al. 1999; Westenbroek and Babcock 1999; Jagannathan, Punt et al. 2002; Stambouljian, Kim et al. 2004). Comme il est impossible d'enregistrer des courants calciques dépendants du voltage par Patch Clamp dans les spermatozoïdes matures, beaucoup d'équipes travaillent sur la caractérisation moléculaire de ces canaux dans les cellules spermatogéniques (Arnoult, Cardullo et al. 1996; Lievano, Santi et al. 1996; Espinosa, Lopez-Gonzalez et al. 1999; Sakata, Saegusa et al. 2001; Jagannathan, Punt et al. 2002; Stambouljian, Kim et al. 2004). Les cellules spermatogéniques représentent un bon modèle d'étude des courants calciques dépendants du voltage des spermatozoïdes matures. Dans ces cellules, seuls les courants calciques de type T ont été enregistrés par Patch Clamp. Bien que des études de RT-PCR ont révélé la présence des transcrits de $\text{Ca}_v3.1$ et

Ca_v3.2 dans les cellules spermatogéniques, les résultats de la caractérisation moléculaire des souris Ca_v3.1^{-/-} suggèrent que Ca_v3.2 est le principal canal calcique dépendant du voltage de type T dans les cellules spermatogéniques (Stambouliau, Kim et al. 2004).

Si la plupart des études montrent le rôle central des canaux LVA dans la réaction acrosomique, quelques autres études suggèrent que les canaux HVA joueraient un rôle important dans la physiologie du spermatozoïde (Goodwin, Leeds et al. 1998; Goodwin, Leeds et al. 1999). Ainsi, plusieurs auteurs ont tenté de démontrer qu'une partie des courants calciques dépendants du voltage de type T était dû à l'activation de canaux HVA, tels que Ca_v1.2 (Goodwin, Leeds et al. 1999) ou Ca_v2.2 et Ca_v2.3 (Wennemuth, Westenbroek et al. 2000) ; Westenbroek and Babcock 1999)

La conclusion concernant le rôle central des canaux LVA dans la réaction acrosomique, a été essentiellement obtenue à partir d'outils pharmacologiques spécifiques conçus contre des canaux LVA (Arnoult, Villaz et al. 1998). Cependant la spécificité des bloqueurs des canaux LVA n'est jamais totale et une concentration bloquant la plupart des canaux LVA, bloque également une petite proportion de canaux HVA.

Le développement des souris Ca_v 3.1^{-/-} et Ca_v3.2^{-/-} nous donne l'opportunité aujourd'hui dans cette étude d'évaluer la contribution des canaux Ca_v 3.1 et Ca_v3.2 dans la physiologie des spermatozoïdes comme la réaction acrosomique et la fertilité.

Article 4: Expression, Localization and Functions in Acrosome Reaction and Sperm Motility of CaV3.1 and CaV3.2 Channels in Sperm Cells: an evaluation from CaV3.1 and CaV3.2 Deficient Mice

Jessica Escoffier, Sylvie Boisseau, Catherine Serres, Chien-Chang Chen, Daesoo Kim, Séverine Stambouliau, Hee-Sup Shin, Kevin P. Campbell, Michel De Waard, And Christophe Arnoult¹

Journal of Cellular Physiology. 212: 753–763, 2007

Expression, Localization and Functions in Acrosome Reaction and Sperm Motility of $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ Channels in Sperm Cells: an Evaluation from $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ Deficient Mice

JESSICA ESCOFFIER,¹ SYLVIE BOISSEAU,¹ CATHERINE SERRES,² CHIEN-CHANG CHEN,³ DAESOO KIM,⁴ SÉVERINE STAMBOULIAN,¹ HEE-SUP SHIN,⁴ KEVIN P. CAMPBELL,³ MICHEL DE WAARD,¹ AND CHRISTOPHE ARNOULT^{1*}

¹INSERM U836 Equipe 3, Laboratoire "Canaux Calciques Fonctions et Pathologies"; CEA/Grenoble, iRTSV; Université Joseph Fourier, Grenoble France

²Service d'Histologie-Embryologie-Biologie de la Reproduction, Université Paris René Descartes—Faculté de Médecine, Paris, France

³Howard Hughes Medical Institute, Department of Physiology and Biophysics, Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City

⁴National CRI Center for Calcium and Learning, Korea Institute of Science and Technology, Cheongryang, Seoul, Republic of Korea

In spermatozoa, voltage-dependent calcium channels (VDCC) have been involved in different cellular functions like acrosome reaction (AR) and sperm motility. Multiple types of VDCC are present and their relative contribution is still a matter of debate. Based mostly on pharmacological studies, Low-Voltage-Activated Calcium Channels (LVA-CC), responsible of the inward current in spermatocytes, were described as essential for AR in sperm. The development of $\text{Ca}_v3.1$ or $\text{Ca}_v3.2$ null mice provided the opportunity to evaluate the involvement of such LVA-CC in AR and sperm motility, independently of pharmacological tools. The inward current was fully abolished in spermatogenic cells from $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. This current is thus only due to $\text{Ca}_v3.2$ channels. We showed that $\text{Ca}_v3.2$ channels were maintained in sperm by Western-blot and immunohistochemistry experiments. Calcium imaging experiments revealed that calcium influx in response to KCl was reduced in $\text{Ca}_v3.2$ null sperm in comparison to control cells, demonstrating that $\text{Ca}_v3.2$ channels were functional. On the other hand, no difference was noticed in calcium signaling induced by zona pellucida. Moreover, neither biochemical nor functional experiments, suggested the presence of $\text{Ca}_v3.1$ channels in sperm. Despite the $\text{Ca}_v3.2$ channels contribution in KCl-induced calcium influx, the reproduction parameters remained intact in $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. These data demonstrate that in sperm, besides $\text{Ca}_v3.2$ channels, other types of VDCC are activated during the voltage-dependent calcium influx of AR, these channels likely belonging to high-voltage activated Ca^{2+} channels family. The conclusion is that voltage-dependent calcium influx during AR is due to the opening of redundant families of calcium channels.

J. Cell. Physiol. 212: 753–763, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

The acrosome reaction (AR), the first step of fertilization, is an exocytotic event, allowing sperm to cross the zona pellucida (ZP) and to become competent for fusion with the oocyte, by unmasking the izumo protein (Inoue et al., 2005). ZP3, one of the three glycoproteins present in the zona pellucida, represents the main physiological agonist of the AR in rodent. The fusion of the outer acrosomal membrane with the plasma membrane is dependent of a cytoplasmic calcium rise. The calcium signaling requires the successive opening of at least three different types of calcium channels. Voltage-dependent calcium channels (VDCC), localized in the plasma membrane, are the first to be activated. Subsequently, an Inositol-1,4,5-triphosphate (InsP3) receptor, localized in the outer membrane of the acrosome, is activated (Walensky and Snyder, 1995; O'Toole et al., 2000) and leads to the calcium depletion of the acrosome, an operational calcium store (De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2004). The depletion of this store finally leads to the activation of store-operated calcium channels like TRPC2 (Jungnickel et al., 2001).

The successive activation of these channels determines two phases in the sperm acrosome calcium signaling: i) during a first

phase, the opening of VDCCs elicits a very short transient calcium rise, of about 100 msec duration (Arnoult et al., 1999), ii) a second phase, corresponding to the activations of the InsP3 receptor and subsequently TRPC store-operated calcium channels, is characterized by a slow calcium increase (between few second to few minutes, dependent of reports), followed by a long lasting calcium entry. Different types of VDCC blockers like amiloride, PN200-110 (a dihydropyridine) or pimozide (a diphenylbutylpiperidine) inhibit both the calcium transient and the subsequent slow calcium increase and calcium plateau

*Correspondence to: Christophe Arnoult, CEA/Grenoble, iRTSV, Laboratoire "Canaux Calciques Fonctions et Pathologies," Unité INSERM U836 Equipe 3, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9- France. E-mail: carnoult@cea.fr

Received 7 September 2006; Accepted 6 February 2007

DOI: 10.1002/jcp.21075

(Arnoult et al., 1996; Arnoult et al., 1999). In consequence, the calcium influx through VDCC is currently understood as the key triggering element for the second phase of calcium signaling in sperm cells.

Voltage-dependent calcium channels are subdivided in high-voltage (HVA) and low-voltage-activated (LVA) calcium channels, represented by L, N, P/Q, R and by T-type calcium channels, respectively. At the molecular level, 10 different genes encode for VDCC α_1 subunits, the pore subunit. The molecular characterization of VDCC present in sperm cells and their respective role in the sperm physiology is a hotly debated and studied question (Arnoult et al., 1996; Santi et al., 1996; Goodwin et al., 1997; Goodwin et al., 1998; Arnoult et al., 1999; Serrano et al., 1999; Westenbroek and Babcock, 1999; Jagannathan et al., 2002; Stambouliau et al., 2004; Zhang et al., 2006).

Owing to the high difficulties to record voltage-dependent calcium currents in mature sperm cells, many groups have worked on the molecular characterization of voltage-dependent channels in spermatogenic cells (Arnoult et al., 1996; Lievano et al., 1996; Espinosa et al., 1999; Sakata et al., 2001; Jagannathan et al., 2002; Stambouliau et al., 2004). In these cells, only T-type calcium currents are recorded during patch-clamp experiments. Although mRNA encoding for both $\text{Ca}_v3.1$ (Sakata et al., 2001) and $\text{Ca}_v3.2$ (Jagannathan et al., 2002) have been found in spermatogenic cells, results from $\text{Ca}_v3.1$ deficient mice suggested that $\text{Ca}_v3.2$ is the main calcium channel in spermatogenic cells (Stambouliau et al., 2004). On the other hand, several authors have claimed that part of the T-type current in spermatogenic cells could be due to activation of HVA channels, $\text{Ca}_v1.2$ (Goodwin et al., 1999) or $\text{Ca}_v2.2$ and $\text{Ca}_v2.3$ (Wennemuth et al., 2000). The development of transgenic mice deficient in $\text{Ca}_v3.2$ channels provides the opportunity to evaluate the actual contribution of $\text{Ca}_v3.2$ channels in the inward calcium current of spermatogenic cells.

In this manuscript, we compare for the first time the inward calcium current density from wild-type spermatogenic cells with those of spermatogenic cells isolated from $\text{Ca}_v3.1$ or $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. The inward current elicited by depolarization is fully abolished in spermatogenic cells obtained from $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. This result ends a long-term controversy over the molecular identity of the LVA inward current in spermatogenic cells: this current is due only to activation of $\text{Ca}_v3.2$ channels. In mature sperm cells, Western blotting experiments demonstrate for the first time the presence of $\text{Ca}_v3.2$ channel protein. By immunohistochemistry, we illustrate that $\text{Ca}_v3.2$ is localized in a specific patch of the plasma membrane located at the base of the acrosome, an area known to be the starting point of the calcium signaling during the acrosome reaction. Moreover, this area of the plasma membrane that contains the $\text{Ca}_v3.2$ channels overlays the external acrosomal membrane involved in exocytosis during acrosome reaction, since the $\text{Ca}_v3.2$ immunoreactivity is lost on acrosome reacted spermatozoa. Because of the presence of $\text{Ca}_v3.2$ channels in mature sperm cells, it was important to evaluate the contribution of $\text{Ca}_v3.2$ channels in sperm calcium signaling. First, we evaluated the contribution of $\text{Ca}_v3.2$ channels in voltage-dependent calcium influx, induced by high external K^+ . The depolarization-induced calcium signaling is biphasic: a calcium rise followed by a calcium plateau. In $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice, both calcium rise and calcium plateau are reduced, demonstrating the functional state of $\text{Ca}_v3.2$ channels in mature sperm cell. Second, we evaluated the importance of such channels in calcium signaling induced by solubilized ZP. In $\text{Ca}_v3.2^{-/-}$ sperm, the calcium signaling induced by ZP was identical to the one measured in wild-type sperm.

Concerning $\text{Ca}_v3.1$ channels, we were unable to find any specific staining with an antibody designed specifically against $\text{Ca}_v3.1$ channels, in agreement with the

electrophysiological data. Moreover, the calcium signaling induced by high K^+ is not affected in $\text{Ca}_v3.1$ deficient mice. These data, taken together, strongly suggest that $\text{Ca}_v3.1$ channels do not play a physiological role in sperm.

Despite the presence of $\text{Ca}_v3.2$ channels and their contribution in K^+ -induced calcium influx, the reproduction parameters (sperm concentration per epididymis, pups number, delay between mating and delivery), and the cellular functions (AR and sperm motility) of $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice remain intact. These data demonstrate that in sperm, besides $\text{Ca}_v3.2$ channels, other types of VDCC are activated during the voltage-dependent calcium influx of AR. The absence of reproduction phenotype at the animal or cellular levels, indicates that the expression of different types of VDCC are redundant.

Finally, we show in this paper that the motility parameters of sperm from $\text{Ca}_v3.1$ or $\text{Ca}_v3.2$ deficient animals are not statistically different to those obtained from sperm of wild-type animals, suggesting that neither $\text{Ca}_v3.1$ nor $\text{Ca}_v3.2$ are involved in sperm motility.

Materials and Methods

Biological preparations

Knock-out mice. $\text{Ca}_v3.1$ (Kim et al., 2001b) and $\text{Ca}_v3.2$ (Chen et al., 2003) deficient mice have been described previously. Control mice corresponded to C57BL/6 males if non specified (Charles River-France). The genetic backgrounds of both knockout mice are different. The genetic background of $\text{Ca}_v3.1$ deficient mice is a cross between C57BL/6 strain and SVJ129 strain. On the other hand, the genetic background of $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice is a C57BL/6 strain.

Spermatogenic cells preparation. Seminiferous tubules were isolated from the testes of mice (8–16 weeks old) and incubated at 37°C for 30 min in 3 ml of a solution containing (mM): NaCl (150), KCl (5), CaCl_2 (2), MgCl_2 (1), NaH_2PO_4 (1), NaHCO_3 (12), D-glucose (11), pH 7.3 and collagenase type IA (1 mg/ml - Sigma). Tubules were rinsed twice in collagenase-free medium and cut into 2 mm sections. Spermatogenic cells were obtained by manual trituration and attached to culture dishes coated with Cell-Tak (Beckton Dickinson France). Pachytene spermatocytes and round spermatids are the prominent cell types obtained from the diploid meiotic and the haploid post-meiotic stages of spermatogenesis, respectively. These cells are readily distinguished based on cellular and nuclear morphology (Romrell et al., 1976). These stages were routinely used for electrophysiological recordings. However, similar results were obtained with both stages and data were pooled for presentation.

Sperm membrane preparation. Sperm cells, obtained by manual trituration of caudae epididymes from $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice or control C57BL/6 mice (16 weeks old, Charles River), were pelleted (500 g, 10 min) and re-suspended in RIPA buffer containing in (mM) Tris (50), NaCl (150), 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% DOC complemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA-free, Roche). Sperm cells were then sonicated (Sonicator Ultrasonic Processor XL, Misonix, Farmingdale, NY) for 1 sec on ice, repeated 30 times, with 7 sec intervals. Cell debris were pelleted (500 g, 15 min) and the supernatant used for Western blotting. To obtain a head-plasma membrane enriched fraction, sperm were capacitated in M16 (Sigma-Aldrich France) supplemented with 2% BSA (fraction V, Sigma-Aldrich France) pH 7.4 for 1 hour at 37°C. Sperm were pelleted (500 g, 10 min) and treated with 10 μM A23187 during 30 min at 37°C in the presence of a cocktail of protease inhibitors. Sperm were then centrifuged 5 min at 1000 g. The supernatant was collected and subsequently ultra-centrifuged at 100 000 g for 1 hour at 4°C. The pellet was re-suspended in RIPA buffer.

Cell culture and transfection. HEK-293 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin and transiently transfected with a plasmid containing $\text{Ca}_v3.1$ cDNA (generous gift of Dr Anne Feltz) or $\text{Ca}_v3.2$ cDNA (generous gift of Dr Emmanuel Bourinet), using JetPEI from Qiogene according to the instructions of the manufacturer. Two days after transfection, transfected and control cells were collected

and re-suspended in RIPA buffer complemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA-free, Roche).

Electrophysiological recordings

Ca²⁺ currents were recorded in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Pipettes were pulled from Corning #7052 glass (Gardner Glass Co., CA) and fire polished. Pipette resistance was 1–3 MΩ. Currents were obtained with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments). All traces were corrected for leak currents, filtered at 2 kHz, and digitized at 20 kHz.

The pipette solution was designed to eliminate all K⁺ currents and consisted of the following components (mM): Cs-glutamate (130), D-glucose (5), HEPES (10), MgCl₂ (2.5), Mg₂ATP (4), EGTA-Cs (10) pH 7.2 (adjusted with 1 N CsOH). For experiments, the bath solution was changed to a recording solution containing (mM): NaCl (100), KCl (5), CaCl₂ (10), MgCl₂ (1), TEA-Cl (26), Na-lactate (6), HEPES (10), D-glucose (3.3) and pH 7.4 (adjusted with 1 N NaOH). All experiments were done at room temperature (~25°C).

Primary antibodies

In the absence of specific commercial antibodies designed for immuno-histochemistry, we designed two antipeptide antibodies against the II-III loop of the Ca_v3.2 channels, a region presenting no homology with other VDCC. The peptides have been chosen in the II-III loop of the α₁ subunit and correspond to the amino acids 1025-1034 (Ab-1025) and 1169-1180 (Ab-1169) of the swissprot locus CAC1H_MOUSE, accession O88427. Antibodies against Ca_v3.1 were from Alomone Labs - Israel. For Western blotting: antibodies against Ca_v3.2 were Ab-1025 or Ab-1169 or a commercial Ab (sc-16261 from Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA); antibody against Ca_v3.1 was a commercial Ab (ACC-021 from Alomone, Israel).

Western blot analysis

Proteins of sperm enriched plasma membrane preparation were separated on 10% polyacrylamide denaturing gels and electrotransferred for 90 min at 350 mA to Immobilon P transfer membrane (Millipore). The membranes were then blocked 60 min with 4% non-fat dry milk (Biorad) in PBS Tween 0.1%. The primary antibody was added and incubated overnight at 4°C. After washing in PBS Tween 0.1%, the secondary antibody was added at 1:10,000 during 3 hours at room temperature. Brain and testis proteins were separated on 7% polyacrylamide denaturing gels and electrotransferred over night at 22 V to Immobilon P transfer membrane (Millipore). The membranes were then blocked over night with 5% non-fat dry milk (Biorad) in PBS Tween 0.1%. The primary antibody was added and incubated for 2h00 at room temperature. After washing with 5% non-fat dry milk (Biorad) in PBS Tween 0.1%, the secondary antibody was added at 1:10,000 during 30 min at room temperature. The reactive proteins were detected using chemiluminescence assay followed by exposure to Biomax film (Kodak).

Immunohistochemistry and indirect immunofluorescence

Sperm cells were harvested from the caudae epididymes, washed in PBS and fixed in 4% PFA for 30 min on ice. Fixed spermatozoa were allowed to air-dry on poly-L-Lysine coated slides. The slides were washed in PBS (3 × 5 min), 50 mM NH₄Cl (2 × 15 min), PBS (3 × 5 min), 0.1% triton X-100 in PBS (15 min) and PBS (3 × 5 min). Slides were blocked with 1% BSA and 2% normal goat serum during 60 min at room temperature. Antibodies against Ca_v3.1 or Ca_v3.2 α₁ subunit, as described above were diluted in blocking solution at 1/100 and slides were incubated overnight at 4°C. Slides were then incubated 60 min with secondary alexa fluor546-conjugated antibodies (Molecular probes), diluted at 1/1000 and washed in PBS (3 × 5 min). For a double stain of the acrosomal status and Ca_v3.2 channels, lectin from *Pisum sativum* conjugated to fluorescein isothiocyanate (PSA-FITC, Sigma Aldrich, France) was used to label the acrosomal matrix, allowing to identify the PSA-FITC negative cells as acrosome reacted cells. For the double staining experiments, sperm cells were first treated with 10 μM A23187 for 30 min after a 60 min capacitation period in a solution (M2, Sigma-A.) containing 2% BSA, to obtain acrosome reacted sperm. Staining with PSA-FITC was used to evidence acrosome reacted sperm. Fixed sperm were washed in PBS for 3 × 5 min and incubated with PSA-FITC

(10 μg/ml in PBS) for 15 min at room temperature, in the dark before starting the immunostaining protocol for calcium channels detection.

Slides were analyzed on a confocal laser scanning microscope (Leica TCS-SP2, Mannheim, Germany).

Calcium imaging

Sperm cells were obtained from C57Bl/6 mice (12 weeks old, Charles Rivers, France), Ca_v3.1 and Ca_v3.2 deficient mice from caudae epididymes by manual trituration. The fraction of motile sperm was determined by visual inspection within 10 mi, and preparations with <75% motile cells were discarded. Sperm were loaded with 5 μM of the calcium indicator Oregon green BAPTA 1-AM (Molecular probes) by a 40 min incubation (37°C) in a solution A containing (in mM): NaCl (109), KCl (4.8), MgCl₂ (1.2), CaCl₂ (1.7), KH₂PO₄ (1.2), NaHCO₃ (10), HEPES (25), sodium lactate (25), sodium pyruvate (1), D-glucose (5.6) and BSA 0.1%.

Sperm were then centrifuged (5 min, 1200 rpm) and re-suspended in the solution A containing 2% BSA in order to promote *in vitro* capacitation for a period of 80 min incubation (37°C). Sperm were then centrifuged and re-suspended in the solution A without BSA and kept at 37°C until imaging experiment. 100 μl aliquots of capacitated sperm cells (6 × 10⁶/ml) were transferred to an imaging chamber, in which the lower surface was a glass coverslip treated with Cell-Tak (Beckton-Dickinson, France). The chamber was then connected to the perfusion apparatus and at least 10 ml of fresh medium was washed through. All experiments were carried out at 37°C in a continuous flow of medium. Solubilized zona pellucida, prepared as precisely described (Rockwell and Storey, 2000), was introduced in the recording medium by adding 10 μL of a solution containing 20 solubilized ZP by μL (final volume 100 μL). Thus, the final solubilized ZP concentration is 2 ZP/μL. Only sperm presenting a motile flagellum were studied. Cells were imaged on an inverted Nikon TE200U microscope, fitted with an X-cite 120 EXFO source. Images were acquired with an IXON ANDOR TE885KCS-VP camera and the frame acquisition frequencies are 4 Hz for KCl and 1 Hz for ZP.

Data were processed offline using ANDOR IQ 1.5 software. Fluorescence was measured in the whole head of the sperm.

Acrosome reaction assay

Sperm cells from the caudae epididymes were allowed to swim in M2 medium for 10 min. Then sperm cells were capacitated for 45 min at 37°C in M16 medium containing 20 mg/ml BSA. The AR was triggered by lacto-N-fucopentaose III-BSA (LNFP III-BSA). The compounds were injected in the capacitation medium and sperm were incubated for an additional period of 80 min. Sperm cells were then fixed in 4% PFA and stained with coomassie blue, as previously described (Arnoult et al., 1996).

M2 and M16 medium were purchased from Sigma and LNFP III-BSA from Dextra laboratories (Reading, UK). 1 mg of LNFP III-BSA was diluted in 500 μl of solution A, corresponding to a concentration of 23.6 μM. LNFP III-BSA was used at a final concentration of 5 μM.

Computer-assisted motility analysis

Five hundred μl of sperm suspension in M2 medium were mixed with the same volume of M2 medium containing 4% BSA (Fraction V Sigma) to initiate the capacitation. After incubation for 1 hour at 37°C, 10 μl of the sperm suspension was immediately placed onto analysis chamber (2X-CEL Slides, 80 μm depth, Leja Products B.V., Netherlands) kept to 37°C for microscopic quantitative study of sperm movement.

Sperm motility parameters were measured at 37°C using a sperm analyzer (Hamilton Thorn Research, Beverly). The settings employed for analysis were as followed: acquisition rate: 60 Hz; number of frames: 30; minimum contrast: 30; minimum cell size: 4; low-size gate: 0.13; high-size gate: 2.43; low-intensity gate: 0.10; high-intensity gate: 1.52; minimum elongation gate: 5; maximum elongation gate: 100; magnification factor: 0.81.

The motility parameters measured were: straight line velocity (VSL); curvilinear velocity (VCL); averaged path velocity (VAP); amplitude of lateral head displacement (ALH); beat cross frequency (BCF); linearity (LIN); straightness (STR). A minimum of 100 motile spermatozoa by sample was analysed.

Results

Recording of inward current in spermatogenic cells

In order to determine the molecular identity of the channels responsible for the inward calcium current in spermatogenic cells, still unresolved since their first recording in 1984 (Hagiwara and Kawa, 1984), we first performed patch-clamp experiments, in the whole cell configuration, on spermatogenic cells from $\text{Ca}_v3.x$ deficient mice. In Fig. 1A, we compared the current-density of inward current elicited by depolarization from a holding potential of -90 mV to a test potential of -20 mV of spermatogenic cells obtained from three different mouse strains: wild-type-OF1 (control), $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. The current density was fully abolished in spermatogenic cells from $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. In comparison, no modification of inward current in $\text{Ca}_v3.1$ deficient pachytene spermatocytes was noticed, as already published (Stambouliau et al., 2004). The absence of $\text{Ca}_v3.2$ channels in

testis was confirmed by Western Blot analysis. A specific antibody against $\text{Ca}_v3.2$ channels immunodecorates around 250 kDa a band on brain and testis loaded proteins, obtained from wild-type animals. In the other hand, no band is present at the same molecular weight of 250 kDa on brain and testis loaded proteins, obtained from $\text{Ca}_v3.2^{-/-}$ animals (Fig. 1B). Fig. 1C shows representative traces of inward calcium current of pachytene spermatocytes from wild-type and both deficient mice.

Presence and Localization of $\text{Ca}_v3.2$ channels in mature sperm cell

The molecular identification of channels responsible for the inward current in spermatogenic cells made us to wonder if the $\text{Ca}_v3.2$ channels are still present in the mature sperm cell.

By Western blot, two different antibodies, designed against $\text{Ca}_v3.2$ channels and named Ab-1025 and Ab-1169, immunodecorate a band at the same molecular weight (around 250 kDa) on wild-type head-plasma membrane enriched fraction (Fig. 2A, lanes 2 and 4 respectively). To check that both antibodies immunodecorate the same band, both antibodies

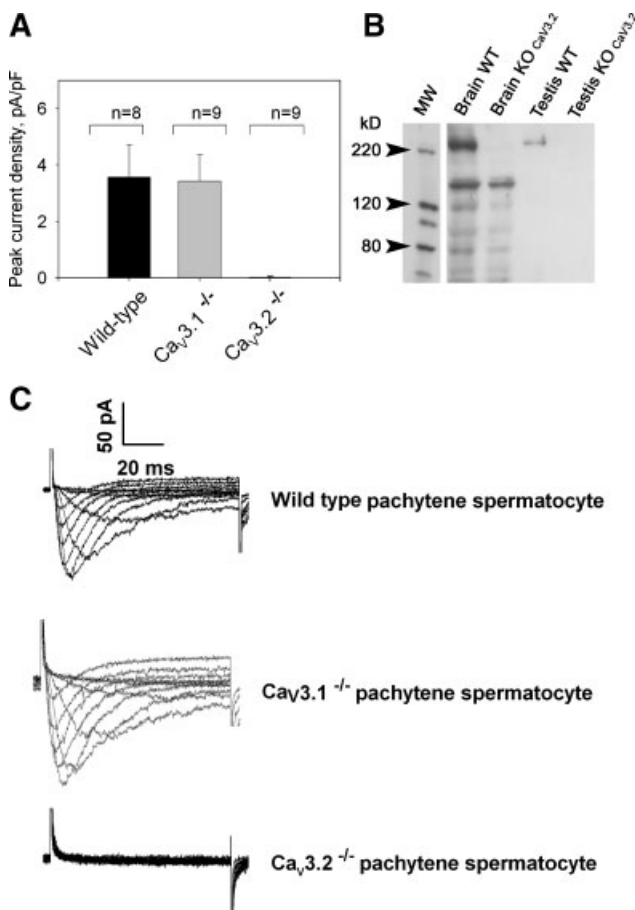


Fig. 1. Inward calcium current in spermatogenic cells measured in the whole cell configuration of the patch-clamp technique. **A:** Current densities measured at the peak current, corresponding to a depolarization of a holding potential of -90 mV to a test potential of -20 mV in spermatogenic cells from wild-type, $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Above histograms, *n* indicates the number of cells recorded. **B:** Western blots of mouse testis membrane proteins obtained with anti- $\text{Ca}_v3.2$ Ab. Membrane proteins were loaded on polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose. The apparent molecular size markers are indicated on the left. **C:** Representative superimposed traces of inward current recorded in spermatogenic cells from wild-type, $\text{Ca}_v3.1$ or $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. Holding potential -90 mV, test potentials from -60 mV to $+30$ mV, 10 mV increments.

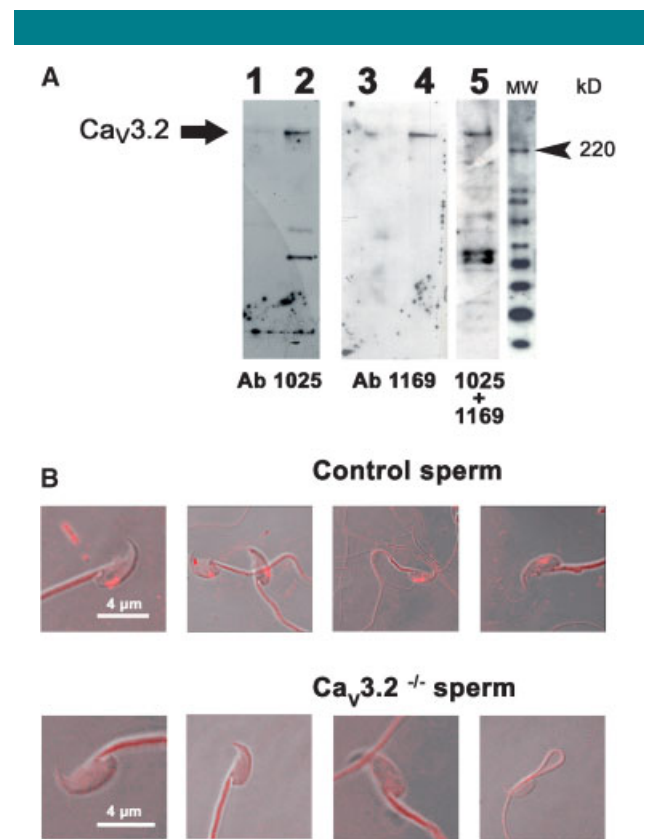


Fig. 2. Immunodetection and localization of $\text{Ca}_v3.2$ channels in mature sperm cells. **A:** Western blot showing the presence of $\text{Ca}_v3.2$ channels in mature sperm cells. The microsomes recovered by centrifugation after acrosome reaction of sperm from $\text{Ca}_v3.2$ deficient animals (lanes 1 and 3) or wild-type OF1 animals (lanes 2, 4 and 5) were loaded on polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose. Lanes 1 and 2, antibody Ab-1169; lanes 3 and 4, antibody Ab-1025, lane 5 both antibodies. **B:** Specific antibody against $\text{Ca}_v3.2$ channel evidences a specific localization of $\text{Ca}_v3.2$ channels, at the base of the acrosome (red staining in control sperm). The staining is absent in sperm from $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice. The fluorescence and phase contrast pictures were superimposed to precisely localize the staining in relation to structures. The staining obtained in flagellum is unspecific since identical staining was observed in flagellum of wild-type or $\text{Ca}_v3.2^{-/-}$ sperm.

have been mixed: in these conditions, only one band is elicited around 250 kDa (Fig. 2A, lane 5). Moreover, these bands are absent on sperm microsomes from Ca_v3.2^{-/-} sperm (Fig. 2A, lanes 1 and 3 respectively). The Ca_v3.2 deficient mice guaranty the specificity against Ca_v3.2 channels of the immunostaining. The Ca_v3.2 channels are thus present in mature sperm cells.

By immuno-histochemistry, the antibody Ab-1169 evidenced a head staining, localized at the base of the acrosome, whereas no staining was observed in the sperm head of Ca_v3.2 deficient sperm, attesting again the specificity of this reactivity (Fig. 2B). The same antibody gave unspecific staining in the flagellum, making impossible to conclude whether the Ca_v3.2 channel was present in the tail (data not shown).

It is well known that membrane reorganization occurs during capacitation. We followed the Ca_v3.2 staining during capacitation and we observed that it was not modified during this step (Fig. 3A).

From studies in neurons, we know that calcium channels involved in neurotransmission are localized in close vicinity to the secretion vesicles (Kim and Catterall, 1997). In order to further study the specific localization of Ca_v3.2 channels, we investigated if Ca_v3.2 channels are positioned in the pool of the plasma membrane merging with the outer acrosomal membrane during acrosome reaction. After capacitation, sperm cells were incubated 30 min in the presence of the Ca²⁺ ionophore A23187, and a double staining was performed using PSA-FITC to assess the status of the acrosome and Ab-1169 to localize the Ca_v3.2 channels. Acrosome reacted sperm were evidenced by the loss of the specific acrosomal matrix staining (negative PSA staining). Figure 3B shows clearly that the Ca_v3.2

staining was strongly diminished or lost during acrosome reaction since Ca_v3.2 immunostaining was very strongly reduced in acrosome reacted spermatozoa. From the western blot of Figure 2A and the immuno-histochemistry of Figure 3 results, we can conclude that at least, part of the Ca_v3.2 channels are localized in the plasma membrane that merged with the acrosome membrane during acrosome reaction.

Calcium signaling in Ca_v3.1 and Ca_v3.2 deficient mice

The localization of Ca_v3.2 channels at the base of the sperm acrosome, is of potential interest since it has been demonstrated that calcium signaling induced by agonists as progesterone or ZP3 starts precisely in the same subcellular area (Shirakawa and Miyazaki, 1999; Kirkman-Brown et al., 2000; Fukami et al., 2003). We therefore studied the voltage-dependent calcium signaling in sperm from Ca_v3.2 deficient mice, to further analyze the impact of the loss of Ca_v3.2 channels. We also studied for the first time the impact of the loss of Ca_v3.1 channels on voltage-dependent calcium signaling, using sperm from Ca_v3.1 mice. Control capacitated sperm cells, loaded with the calcium dye Oregon green, presented a large calcium increase in the head sperm, when the plasma membrane was suddenly depolarized with a high concentration of external potassium (Fig. 4). For Ca_v3.1 deficient sperm cells, the amplitude and kinetics of high-K⁺-induced calcium signaling were similar to those recorded for control sperm cells. By contrast, for Ca_v3.2 deficient sperm cells, both amplitude and kinetics of high-K⁺-induced calcium signaling were modified: the mean amplitude was decreased by 30% and the calcium signal was more transient (Fig. 4). By comparing the integrated calcium signal from control and Ca_v3.2 deficient sperm cells, a decrease of 68% was observed in the latter.

Because K⁺-induced calcium increase was modified in Ca_v3.2 deficient sperm cells, we wondered if the calcium signaling induced by solubilized ZP, the physiological agonist, would be also altered. Indeed, voltage-dependent calcium channel antagonists were described to inhibit both the amplitude of the short calcium transient (Arnoult et al., 1999) and the rate of calcium increase which follows the short calcium transient (Arnoult et al., 1996). Solubilized ZP elicited a fast calcium increase, followed by a calcium plateau, returning slowly to zero, in both wild-type and Ca_v3.2 deficient sperm cells (Fig. 5A). In order to characterize calcium signaling, we calculated for each sperm cell responding to ZP, the time to peak, the normalized maximum amplitude and the time necessary to decrease the calcium peak by two (t_{1/2}). In our experimental conditions, peaks were reached in 14.5 ± 6.9 sec and in 11.4 ± 3.9 sec in wild-type (n = 9) and in Ca_v3.2^{-/-} sperms (n = 7), respectively (Fig. 5B), showing no statistical difference. These values fall in the range of previously described ZP-induced kinetics. Indeed, a wide range of ZP-induced calcium increase kinetics have been reported in the past and peaks were reached from few seconds (Shirakawa and Miyazaki, 1999; Rockwell and Storey, 2000; Fukami et al., 2003) to minutes (Arnoult et al., 1996; Fukami et al., 2003). This range is likely due to experimental differences between groups, like ZP concentration, capacitation time or medium composition. No difference was also noticed for normalized peak amplitude and t_{1/2} (Fig. 5B). In our experimental conditions, normalized peak amplitudes were 1.45 ± 0.1 and in 1.47 ± 0.3 and the time necessary to decrease the calcium peak by two were 66 ± 35 sec and in 62 ± 52 sec, in wild-type (n = 9) and in Ca_v3.2^{-/-} sperms (n = 7), respectively.

The facts that we still recorded voltage-dependent calcium influx in Ca_v3.2 deficient sperm and that Ca_v3.1 deficient sperm did not present calcium signaling defect, strongly suggests that the remaining voltage-dependent calcium influx

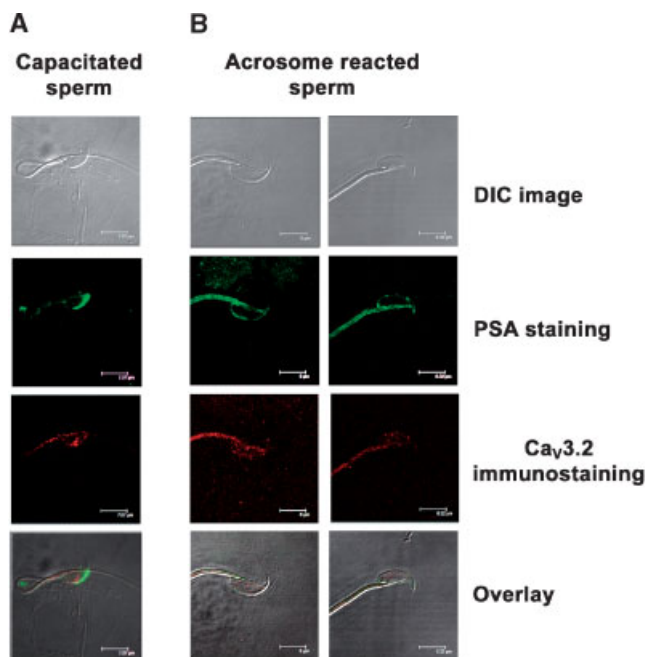


Fig. 3. Ca_v3.2 channels localization after capacitation and acrosome reaction. Double-staining with anti-Ca_v3.2 antibody and with lectins from *Pisum sativum* conjugated to FITC (green), localized Ca_v3.2 channels and the acrosome matrix, respectively. **A:** Capacitation does not modify Ca_v3.2 staining (images of the left column): capacitated sperm cells displayed a staining at the base of the acrosome, identical to that observed on non capacitated sperm. **B:** Acrosome reacted sperm loose the Ca_v3.2 channel staining (images of the two right columns). AR is evidenced by the absence of PSA staining

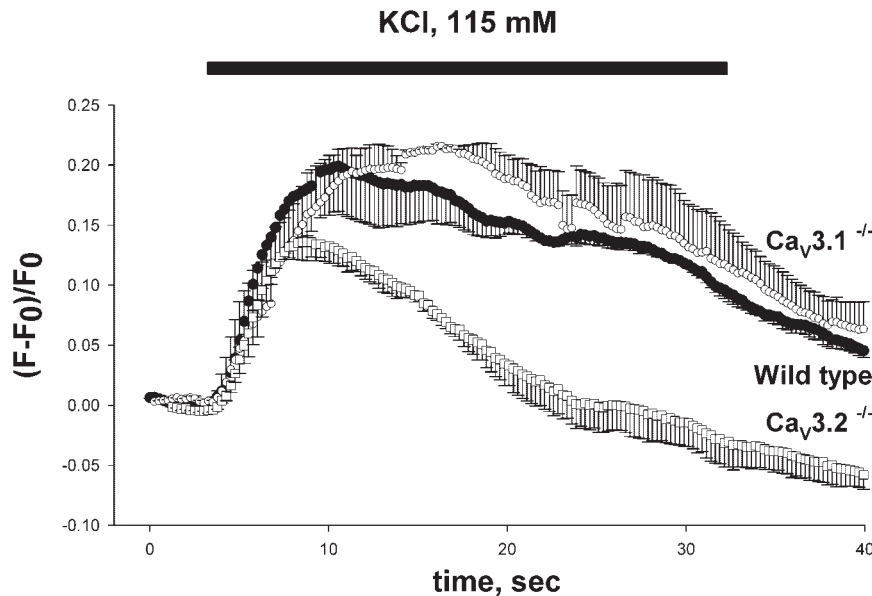


Fig. 4. Comparison of high- K^+ -induced calcium signaling in sperm from wild-type, $Ca_v3.1$ or $Ca_v3.2$ deficient animals. KCl-induced depolarization elicits a large calcium signaling in control sperm ($\bullet$, $n = 7$) and a similar calcium signaling in sperm from $Ca_v3.1$ deficient animals ($\circ$, $n = 10$). On the other hand, calcium signaling is reduced in sperm from $Ca_v3.2$ deficient animals ($\square$, $n = 13$). Results are expressed as normalized mean intensities $\pm$ s.d.

observed in $Ca_v3.2$ deficient sperm is due to the opening of different type of VDCC. High-voltage-activated calcium channels or $Ca_v3.3$ channels, present in sperm cells, could be responsible of the remaining calcium influx in $Ca_v3.2$ deficient spermatozoa.

Reproduction parameters of $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ deficient mice

We showed that $Ca_v3.2$ channels are present in mature sperm cell and that $Ca_v3.2$ deficient sperm cells present an altered K^+ -induced calcium signaling profile, with lower amplitude and a more transient calcium signals. These changes in calcium signaling induced by the loss of $Ca_v3.2$ channels may decrease the fertility of $Ca_v3.2$ deficient males. We studied two macroscopic reproduction parameters, the interval between mating and birth and the litter size. No difference in these two parameters was noticed (Fig. 6A, B) when males of C57Bl/6, $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ deficient strains were interbred with OF1 females.

The absence of a specific macroscopic reproductive phenotype defect does not exclude i) an alteration of spermatogenesis leading to a reduction of sperm number or ii) a lowering of some sperm functions at the cellular level. Although membrane potential of spermatogenic cells does not allow T-type calcium activation, the fact that inward calcium current was totally absent in $Ca_v3.2$ deficient spermatogenic cells indeed raises the question of a role of $Ca_v3.2$ channels in sperm production. We measured the sperm concentration in cauda epididymis and no difference was noticed between wild-type and in $Ca_v3.2^{-/-}$ sperms (Fig. 7), both having a standard sperm concentration of around 5 millions of sperm per milliliters.

Because voltage-dependent calcium channels are supposed to play a role in both sperm acrosome reaction and sperm motility, we focused our studies on these two cellular

functions. Again, the development of transgenic mice deficient in $Ca_v3.1$ or $Ca_v3.2$ channels provided a unique opportunity to test the physiological importance of such channels in sperm functions. We compared the number of acrosome reacted sperm induced by the lacto-N-fucopentaose III-BSA (LNFP III-BSA), a synthetic molecule designed to replace the signaling sugars of ZP3 (Hanna et al., 2004), after a capacitation of 120 min in 2% BSA (Fig. 8A). In these peculiar conditions, we did not observe a lower rate of acrosome reacted sperm in $Ca_v3.2$ deficient mice, when compared to control mice, suggesting that the remaining voltage-dependent calcium influx in $Ca_v3.2$ deficient mice is sufficient to promote a complete acrosome reaction. From experiments using pharmacological tools, it has been suggested that LVA calcium channels could be involved in sperm motility (Trevino et al., 2004). Using a sperm movement analyzer, the different parameters characterizing sperm movement were studied for $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ null mice or control capacitated sperm (Fig. 8B). No statistical difference was observed between the mean values of the different parameters measured for the three populations of sperm.

Presence and immunolocalization of $Ca_v3.1$ channels in sperm

The absence of inward calcium currents in spermatogenic cells from $Ca_v3.2$ deficient mice, the specific staining of $Ca_v3.2$ channels in sperm head and the decrease of depolarization-induced calcium influx in sperm from $Ca_v3.2$ deficient animals, clearly demonstrate that $Ca_v3.2$ channels are present and functional in sperm. On the other hand, the presence of $Ca_v3.1$ channels in sperm is still controversy since i) $Ca_v3.1$ deficient spermatogenic cells present no alteration of the inward current and ii) $Ca_v3.1$ deficient sperm exhibit a similar depolarization-induced calcium to control sperm cells. The presence of $Ca_v3.1$ channels in rodent sperm is only supported by RT-PCR experiments, which clearly shows specific products

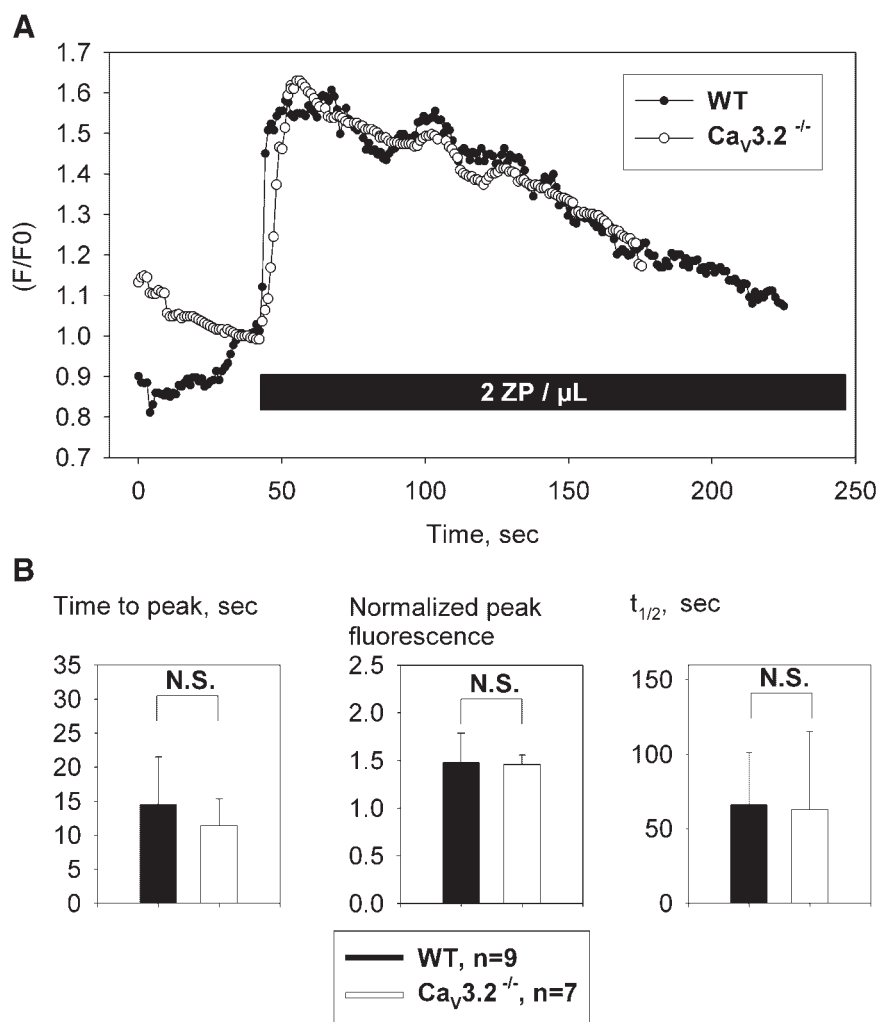


Fig. 5. Comparison of calcium signaling induced by solubilized ZP in single sperm from wild-type or Cav3.2 deficient animals. **A.** Solubilized ZP (2 ZP/ μ L) elicits a fast calcium increase, followed by a calcium plateau in both control sperm (●) and sperm from Cav3.2 deficient animals (○). Acquisition rate, 1 Hz. **B.** Characteristics of calcium signaling induced by solubilized ZP. Histograms showing the time to peak, the normalized maximum amplitude, and the time necessary to decrease the calcium peak by two ($t_{1/2}$) for wild-type (black bars, $n = 9$) and for Cav3.2^{-/-} sperms (white bars, $n = 7$). In our experimental conditions, peaks were reached in 14.5 ± 6.9 sec and in 11.4 ± 3.9 sec, normalized peak amplitudes were 1.45 ± 0.1 and in 1.47 ± 0.3 and the time necessary to decrease the calcium peak by two were 66 ± 35 sec and in 62 ± 52 sec in wild-type and in Cav3.2^{-/-} sperms, respectively. Results are expressed as mean $\pm$ s.d.

amplification (Trevino et al., 2004). In order to better understand this apparent discrepancy between functional and molecular data, we did important efforts to attempt to evidence Cav3.1 channels by immunohistochemistry and Western blotting. For immunohistochemistry experiments, we tested a commercial antibody (Alomone, anti Cav3.1). In our experimental conditions, this antibody did not evidence a specific staining by immunochemistry in sperm (Fig. 9A). The flagellum is stained by the antibody but the Cav3.1 deficient sperm present an identical staining. In Western blotting, the same antibody specifically recognized a band of approximately at 240 kDa in HEK-293 cells transfected with Cav3.1 clone. This band corresponds to Cav3.1 channels since in non transfected HEK-293 cells, no band is evidenced in the same area of molecular weight. In the whole sperm plasma membrane preparations, no signal was detected by the Alomone antibody (Fig. 9B), even if, to compensate an eventual low level of Cav3.1 channels expression in sperm, 1.7 times more of sperm protein

(25 μ g) than control HEK cells extract (14 μ g) was loaded in the gel.

Discussion

In spermatogenic cells, inward current is only due to Cav3.2 channels

The molecular identity of voltage-dependent inward calcium current in spermatogenic cells has been a debated question. If the pharmacological and biophysical properties of this current are close to those expected for Cav3.2 channels, some doubts were still present because the spermatogenic calcium current present some specific biophysical (Stambouliau et al., 2004) and pharmacological (Arnoult et al., 1998; Wennemuth et al., 2000) properties in comparison to those obtained by re-expression of cloned channels. The fact that no inward current is present in Cav3.2 deficient spermatogenic cells, represent a conclusive

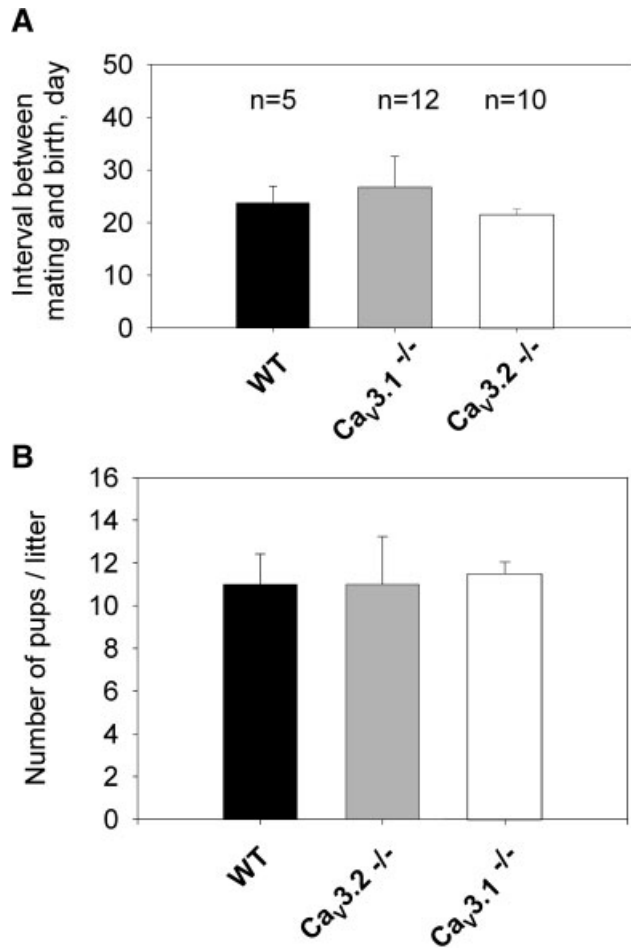


Fig. 6. Macroscopic reproduction parameters of *Ca_v3.1* and *Ca_v3.2* deficient animals. **A:** Interval between mating and pups delivery in function of the different strains of mice. **B:** Average litter size in function of the different strains of mice. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Above histograms, *n* indicates the number of litter studied.

proof that spermatogenic inward calcium current is only due to the opening of *Ca_v3.2* channels. It would be interesting to clone spermatogenic *Ca_v3.2* channels in order to further understand the biophysical and pharmacological specificities carried by this channel at the molecular level.

***Ca_v3.2* channels are present in mature sperm head and participate to the voltage-dependent calcium influx during acrosome reaction**

In this manuscript, we showed that *Ca_v3.2* channels are present from pachytene stages, by patch-clamp experiments, to mature sperm cells, by Western blot and immuno-histochemistry experiments. The *Ca_v3.2* deficient mice channels provide the unique opportunity to guaranty the specificity of immuno-localization. Its localization, at the base of the acrosome is unique, and different to the localizations already described for other voltage-gated channels (Westenbroek and Babcock, 1999; Trevino et al., 2004) or store-operated channels (Jungnickel et al., 2001; Trevino et al., 2001; Castellano et al., 2003; Sutton et al., 2004). The localization of *Ca_v3.2* channels is particularly interesting since its localization seems to coincide with the locus of calcium signaling initiation during

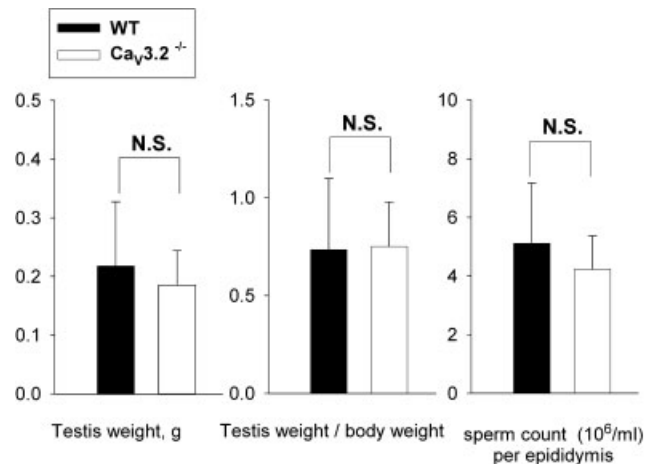


Fig. 7. Testis weight and sperm count of *Ca_v3.2* deficient animals. **A** t-test indicates that neither testis weight nor sperm count are different between wild-type animals (*n* = 6) and *Ca_v3.2^{-/-}* animals (*n* = 6).

progesterone or ZP3-activated acrosome reaction (Shirakawa and Miyazaki, 1999; Kirkman-Brown et al., 2000; Fukami et al., 2003). This result indicates that it may be one of the first calcium channel activated during the depolarization event that follows ZP3 receptor activation. Moreover, we demonstrated herein that the plasma membrane, which merges with the acrosomal membrane during acrosome reaction, contains *Ca_v3.2* channels. This result provides essential information. First, although *Ca_v3.2* channels are expressed early during spermatogenesis, *Ca_v3.2* channels play a physiological role in a narrow temporal window between the end of the capacitation, when it becomes functional, and the end of the acrosome reaction, when it is lost in membrane vesicle secretion. Indeed, as a low-voltage-activated calcium channel, *Ca_v3.2* is fully inactivated at potential above -60 mV. Spermatogenic cells and non-capacitated sperm cells have a membrane potential around -30 mV and only fully capacitated sperm present a hyperpolarized membrane potential (Arnoult et al., 1999). Among all voltage-dependent calcium channels present in sperm (Westenbroek and Babcock, 1999), only *Ca_v3.2* channels present an early expression pattern during spermatogenesis and the reasons of this specific expression pattern are still not understood. Secondly, the fact that immunostaining of *Ca_v3.2* disappears in acrosome reacted sperm demonstrates that the surface of the plasma membrane merging with the outer acrosomal membrane is not restricted to the acrosomal crescent when AR is induced by A23187 but extends to the equatorial segment. The fact that *Ca_v3.2* channels are present at a strategic localization for calcium signaling in sperm head made us wonder if calcium signaling is affected during acrosome reaction. In *Ca_v3.2* deficient sperm, the peak calcium increase, elicited by KCl-induced depolarization, is diminished by 30% and the calcium signal is more transient. The integrated calcium signal is reduced overall by 68%. These results indicate that sperm *Ca_v3.2* channels are functional and contribute significantly but partially to KCl-induced calcium signaling. This result differs from those obtained previously (Wennemuth et al., 2000), where KCl-induced calcium signaling has been attributed mainly to HVA calcium channels. This difference evidences the recurrent problem of the specificity of calcium channels blockers. The localization of *Ca_v3.2* channels in sperm head and their functionality strongly suggest that they contribute significantly to the calcium signaling during acrosome reaction.

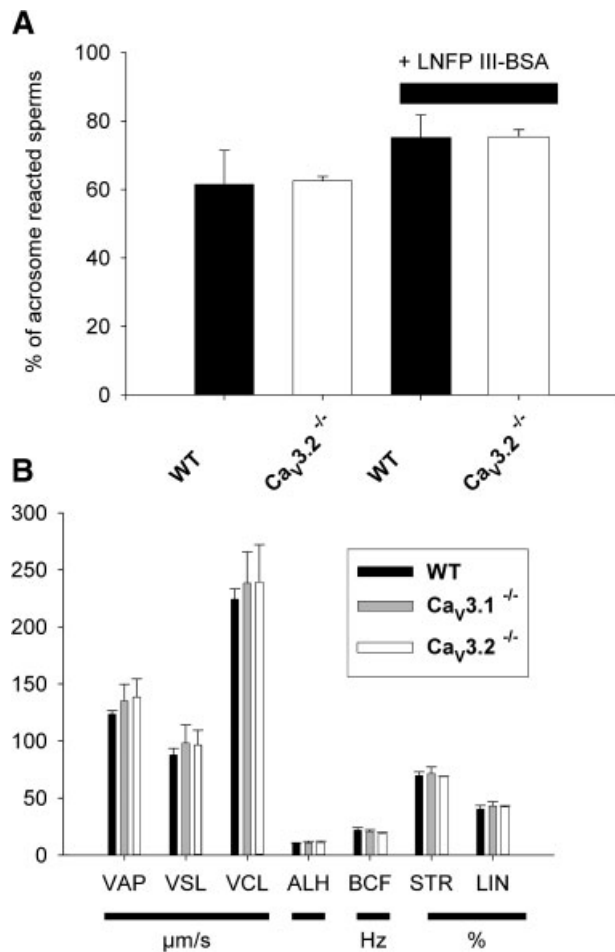


Fig. 8. Cellular reproduction parameters of Cav3.1 and Cav3.2 deficient animals. **A:** Acrosome reaction induced by 5 μ M LNFP III-BSA of Cav3.2 deficient mice and wild-type mice. The two left columns correspond to sperm incubated during 125 min in the capacitation medium, the two right columns correspond to sperm incubated first during 45 min in the capacitation medium, and subsequently in the presence of 5 μ M of LNFP III-BSA for an extra period of 80 min in the capacitation medium. Mean $\pm$ SD, of three independent experiments. In each experiment, more than 150 sperm cells have been analyzed. **B:** Sperm motility parameters of Cav3.1 and Cav3.2 deficient animals in comparison to wild-type sperm. The motility parameters measured were: averaged path velocity (VAP); straight line velocity (VSL); curvilinear velocity (VCL); amplitude of lateral head displacement (ALH); beat cross frequency (BCF); straightness (STR); linearity (LIN). Black columns: control sperm cells, light grey columns: sperm cells from Cav3.1 null mice and dark grey columns: sperm cells from Cav3.2 null mice. Results are expressed as mean $\pm$ SD.

Functional Cav3.1 channel protein is likely absent in rodent sperm

The presence of Cav3.1 channels in mature sperm cell was previously suggested, based on RT-PCR experiments (Trevino et al., 2004), *in situ* hybridization (Jagannathan et al., 2002) and immuno-histochemistry experiments. From inhibition experiments, it was suggested that Cav3.1 channels may play a role in flagellum beat (Trevino et al., 2004). The Cav3.1 deficient mice gave us the opportunity to search for the Cav3.1 channels implications in two important sperm functions: acrosome reaction and sperm motility. Acrosome reaction is activated by

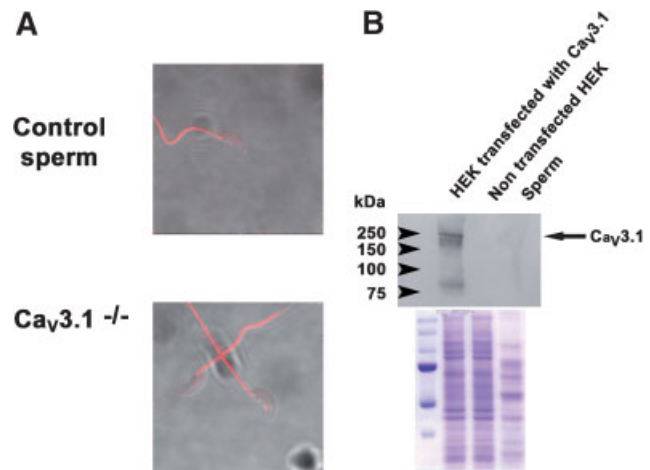


Fig. 9. No evidence for the presence of Cav3.1 channel in mouse sperm. **A:** Immunostaining with anti-Cav3.1 antibody from Alomone on two types of mature sperm: control sperm (OF1) and Cav3.1 deficient sperm. **B:** Western blot with anti-Cav3.1 Alomone antibody should be affected in Cav3.1 deficient sperm in comparison to control sperm, in a similar way to Cav3.2 deficient sperm. No difference was observed in Cav3.1 deficient sperm in comparison to control sperm. This result clearly shows that Cav3.1 does not play a role in calcium signaling during acrosome reaction. In order to test a putative role of Cav3.1 in sperm motility, we compared with a sperm movement analyzer the different characteristics of sperm motility after capacitation of Cav3.1 sperm versus control sperm. No obvious difference was observed.

an increase of intracellular calcium concentration. The initial rise is due to voltage-dependent calcium channels opening. If Cav3.1 channels were present and activated during this initial phase, calcium signaling elicited by KCl-induced depolarization should be affected in Cav3.1 deficient sperm in comparison to control sperm, in a similar way to Cav3.2 deficient sperm. No difference was observed in Cav3.1 deficient sperm in comparison to control sperm. This result clearly shows that Cav3.1 does not play a role in calcium signaling during acrosome reaction. In order to test a putative role of Cav3.1 in sperm motility, we compared with a sperm movement analyzer the different characteristics of sperm motility after capacitation of Cav3.1 sperm versus control sperm. No obvious difference was observed.

The lack of cellular phenotype of Cav3.1 deficient mice is in good accordance with biochemical or immunohistology results obtained. Indeed, we were unable to obtain a specific staining of Cav3.1 channels using the same antibody previously used (Trevino et al., 2004). We did obtain a signal in flagellum as well, but Cav3.1 deficient sperm presented identical staining. From our experiences, a lot of antibodies, known to give specific staining in several tissues, stain also sperm flagellum in a non specific manner. In Western blot, the absence of signal in sperm extract does not necessary mean that Cav3.1 channels are absent, but this result is in good accordance with the absence of phenotype of Cav3.1 deficient mice.

Although the presence of Cav3.1 channels in flagellum sperm remains to be established, this result demonstrates that the contribution of Cav3.1 channels to sperm flagellum beat would be very minor.

Cav3.2 channels are not the only VDCC activated during acrosome reaction

The facts that i) the K⁺-induced calcium signaling was not abolished and ii) the second phase of ZP-induced calcium signaling was not altered in Cav3.2 deficient sperm, suggest that

other voltage-dependent calcium channels are present and functional in sperm head, as well. Because calcium signaling is not affected in $\text{Ca}_v3.1$ deficient sperm, it is unlikely that the remaining voltage-dependent calcium increase in $\text{Ca}_v3.2$ deficient sperm is due to $\text{Ca}_v3.1$ channels opening.

Different publications pointed out the presence of several other VDCC in spermatogenic or mature sperm cells. High-voltage-activated (HVA) calcium channels, but also $\text{Ca}_v3.3$, the last member of the LVA calcium channel family, have been described to be present. $\text{Ca}_v3.3$ RNA have been amplified in spermatogenic cells. In mature sperm cells, two groups have showed by immunohistochemistry realized with two different antibodies that the channels is restricted to the flagellum and is absent of the head (Trevino et al., 2004; Zhang et al., 2006) and then, $\text{Ca}_v3.3$ unlikely contributes to the remaining calcium influx in sperm head from $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice.

HVA channels, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v2.2$ and $\text{Ca}_v2.3$, are present in the sperm head (Goodwin et al., 1999; Westenbroek and Babcock, 1999; Wennemuth et al., 2000). These HVA channels are likely activated during the physiological depolarization induced by ZP3 and contribute to the transient calcium influx sensitive to different classes of calcium blockers (Arnoult et al., 1999).

Expression of VDCC in sperm is redundant

Most of the studies pointing out the central role of LVA channel in acrosome reaction were based on pharmacological studies. The different calcium channel blockers used were potent inhibitors of the spermatogenic $\text{Ca}_v3.2$ channels (Arnoult et al., 1998) and were also potent inhibitors of acrosome reaction (Arnoult et al., 1996; Arnoult et al., 1999). From these results, we have contributed with others groups (Santi et al., 1996; Florman et al., 1998; Trevino et al., 2004) to popularize the fact that LVA channels were key channels in sperm physiology. However the specificity of voltage-dependent calcium channel blockers among the different types of VDCC is only relative, the specificity representing generally a 10–20 fold difference in affinity. An LVA calcium channel blocker which is used at a concentration that blocks most of the LVA channels, also blocks a small proportion of HVA channels. Then, during an inhibition experiment, when 100% of the LVA calcium channels are blocked, a small proportion of HVA channels (around 20%) are blocked, as well. Because $\text{Ca}_v3.2$ is responsible of 62% of the integrated calcium entry, in the presence of a $\text{Ca}_v3.2$ channel blocker, an extra inhibition of 20% of the remaining calcium influx, via the inhibition of HVA channels, could diminish the voltage-dependent calcium influx in such way that acrosome reaction would be then blocked. Although the channel antagonists are important tools in the characterization of ionic channels involved in a specific physiological function, the response obtained is always dependent of the specificity of these tools. In the other hand, the development of transgenic mice deficient in $\text{Ca}_v3.1$ or $\text{Ca}_v3.2$ channels provided a unique opportunity to evaluate the physiological importance of these channels in sperm physiology in general and in the acrosome reaction or sperm motility in particular, independently of pharmacological agents.

The reproduction parameters of $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice studied at different levels are normal. We did not observe alteration in the number of pups by litter, the delay between mating and delivery, the rate of acrosome reaction induced by an agonist of ZP3 receptor, sperm motility and the ZP-induced calcium signaling. We can then conclude that there is no macroscopic fertility or cellular functions troubles in $\text{Ca}_v3.2$ deficient mice, although we demonstrated that $\text{Ca}_v3.2$ channels are present and functional in wild-type sperm cells. These data suggest that $\text{Ca}_v3.2$ channels are redundant calcium channels. Similar results were obtained with $\text{Ca}_v2.2$ (Kim et al., 2001a)

or $\text{Ca}_v2.3$ (Sakata et al., 2001) deficient mice, which do not present any fertility trouble, as well. The likely conclusion is that voltage-dependent calcium influx during acrosome reaction is due to the opening of redundant families of calcium channels. Finally, the redundancy of VDCC seems to be a general feature. Indeed, there is a large discrepancy between the high number of cellular types where VDCC are expressed and the low number of physiological anomalies generated by the lack of only one VDCC in the different knock-out mice (Jun et al., 1999; Saegusa et al., 2000; Kim et al., 2001a; Kim et al., 2001b; Chen et al., 2003).

Acknowledgments

We are thankful to Florence Appaix (INSERM U836-Grenoble-F) and Emmanuel Bourinet (IGH/CNRS-Montpellier-F) for Westernblotting expertise and to Isabelle Marty for her skills in antibody design (INSERM U836-Grenoble-F).

Literature Cited

- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. 1996. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13004–13009.
- Arnoult C, Villaz M, Florman HM. 1998. Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* 53:1104–1111.
- 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* 96:6757–6762.
- Castellano LE, Trevino CL, Rodriguez D, Serrano CJ, Pacheco J, Tsutsumi V, Felix R, Darzon A. 2003. Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett* 541:69–74.
- Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP. 2003. Abnormal coronary function in mice deficient in $\alpha 1\text{H}$ T-type Ca^{2+} channels. *Science* 302:1416–1418.
- De Blas G, Michaut M, Trevino CL, Tomes CN, Yunes R, Darzon A, Mayorga LS. 2002. The intracrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 277:49326–49331.
- Espinosa F, Lopez-Gonzalez I, Serrano CJ, Gasque G, De La Vega-Beltran JL, Trevino CL, Darzon A. 1999. Anion channel blockers differentially affect T-type Ca^{2+} currents of mouse spermatogenic cells, $\alpha 1\text{E}$ currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev Genet* 25:103–114.
- Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CM. 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 59:12–16.
- Fukami K, Yoshida M, Inoue T, Kurokawa M, Fissore RA, Yoshida N, Mikoshiba K, Takenawa T. 2003. Phospholipase $\text{C}\delta 4$ is required for Ca^{2+} mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol* 161:79–88.
- Goodwin LO, Leeds NB, Hurley I, Mandel FS, Pergolizzi RG, Benoff S. 1997. Isolation and characterization of the primary structure of testis-specific L-type calcium channel: Implications for contraception. *Mol Hum Reprod* 3:255–268.
- Goodwin LO, Leeds NB, Hurley I, Cooper GW, Pergolizzi RG, Benoff S. 1998. Alternative splicing of exons in the $\alpha 1$ subunit of the rat testis L-type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites. *Mol Hum Reprod* 4:215–226.
- Goodwin LO, Leeds NB, Guzowski D, Hurley IR, Pergolizzi RG, Benoff S. 1999. Identification of structural elements of the testis-specific voltage dependent calcium channel that potentially regulate its biophysical properties. *Mol Hum Reprod* 5:311–322.
- Hagiwara S, Kawa K. 1984. Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J Physiol* 356:135–149.
- Hanna WF, Kerr CL, Shaper JH, Wright VVV. 2004. Lewis X-containing neoglycoproteins mimic the intrinsic ability of zona pellucida glycoprotein ZP3 to induce the acrosome reaction in capacitated mouse sperm. *Biol Reprod* 71:778–789.
- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. 2004. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 202:663–671.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434:234–238.
- 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* 277:8449–8456.
- Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS. 1999. Ablation of P/Q-type Ca^{2+} channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the $\alpha 1\text{A}$ subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15245–15250.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. 2001. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3:499–502.
- Kim DK, Catterall WA. 1997. Ca^{2+} -dependent and -independent interactions of the isoforms of the $\alpha 1\text{A}$ subunit of brain Ca^{2+} channels with presynaptic SNARE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14782–14786.
- Kim C, Jun K, Lee T, Kim SS, McEnery MW, Chin H, Kim HL, Park JM, Kim DK, Jung SJ, Kim J, Shin HS. 2001a. Altered nociceptive response in mice deficient in the $\alpha 1\text{B}$ subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol Cell Neurosci* 18:235–245.
- Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS. 2001b. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking $\alpha 1\text{G}$ T-type Ca^{2+} channels. *Neuron* 31:35–45.
- Kirkman-Brown JC, Bray C, Stewart PM, Barratt CL, Publicover SJ. 2000. Biphasic elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* 222:326–335.

- Lievano A, Santi CM, Serrano CJ, Trevino CL, Bellve AR, Hernandez-Cruz A, Darszon A. 1996. T-type Ca^{2+} channels and $\alpha 1\text{E}$ expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett* 388:150–154.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. 2000. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 11:1571–1584.
- Rockwell PL, Storey BT. 2000. Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca^{2+} changes monitored by fluo-3. *Mol Reprod Dev* 55:335–349.
- Romrell LJ, Bellve AR, Fawcett DW. 1976. Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev Biol* 49:119–131.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Minowa O, Kazuno A, Han W, Matsuda Y, Yamanaka H, Osanai M, Noda T, Tanabe T. 2000. Altered pain responses in mice lacking $\alpha 1\text{E}$ subunit of the voltage-dependent Ca^{2+} channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6132–6137.
- Sakata Y, Saegusa H, Zong S, Osanai M, Murakoshi T, Shimizu Y, Noda T, Aso T, Tanabe T. 2001. Analysis of Ca^{2+} currents in spermatocytes from mice lacking $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1\text{E}$) Ca^{2+} channel. *Biochem Biophys Res Commun* 288:1032–1036.
- Santi CM, Darszon A, Hernandez-Cruz A. 1996. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol* 271:C1583–C1593.
- Serrano CJ, Trevino CL, Felix R, Darszon A. 1999. Voltage-dependent Ca^{2+} channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett* 462:171–176.
- Shirakawa H, Miyazaki S. 1999. Spatiotemporal characterization of intracellular Ca^{2+} rise during the acrosome reaction of mammalian spermatozoa induced by zona pellucida. *Dev Biol* 208:70–78.
- Stambouliau S, Kim D, Shin HS, Ronjat M, De Waard M, Arnoult C. 2004. Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the $\text{Ca}_v3.1$ ($\alpha 1\text{G}$) calcium channel: $\text{Ca}_v3.2$ ($\alpha 1\text{H}$) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J Cell Physiol* 200:116–124.
- Sutton KA, Jungnickel MK, Wang Y, Cullen K, Lambert S, Florman HM. 2004. Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev Biol* 274:426–435.
- Trevino CL, Serrano CJ, Beltran C, Felix R, Darszon A. 2001. Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett* 509:119–125.
- Trevino CL, Felix R, Castellano LE, Gutierrez C, Rodriguez D, Pacheco J, Lopez-Gonzalez I, Gomora JC, Tsutsumi V, Hernandez-Cruz A, Fiordeliso T, Scalling AL, Darszon A. 2004. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca^{2+} channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett* 563:87–92.
- Walensky LD, Snyder SH. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol* 130:857–869.
- Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF. 2000. $\text{Ca}_v2.2$ and $\text{Ca}_v2.3$ (N- and R-type) Ca^{2+} channels in depolarization-evoked entry of Ca^{2+} into mouse sperm. *J Biol Chem* 275:21210–21217.
- Westenbroek RE, Babcock DF. 1999. Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel $\alpha 1$ subunits in sperm. *Dev Biol* 207:457–469.
- Zhang D, Chen J, Saraf A, Cassar S, Han P, Rogers JC, Brioni JD, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. 2006. Association of CatSper1 or 2 with $\text{Ca}_v3.3$ leads to suppression of T-type calcium channel activity. *J Biol Chem* 281:22332–22341.

6. Discussion

Le développement des souris $Ca_v3.1^{-/-}$ et $Ca_v3.2^{-/-}$ nous a donné l'opportunité aujourd'hui d'évaluer la contribution des canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ dans une étape de la physiologie des spermatozoïdes : la réaction acrosomique.

Dans ce manuscrit, nous avons tout d'abord caractérisé pour la première fois les courants calciques dépendants du voltage de type T dans les cellules germinales. Nous avons ensuite statué sur la présence et le rôle physiologique des canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ dans les spermatozoïdes matures, grâce à des expériences d'immunofluorescence, de Western Blot, de mobilité spermatique, de fécondation, d'imagerie calcique et de réaction acrosomique *in vitro*.

➤ *Les courants calciques dépendant du voltage de type T des cellules germinales est due seulement à l'activation du canal $Ca_v3.2$*

Bien que des transcrits pour $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ aient été identifiés dans les cellules spermatogéniques, nos résultats montrent que la sous-unité $Ca_v3.1$ ne participe pas à l'établissement des courants calciques voltages dépendants de type T des cellules germinales. En effet, la densité de courant calcique T dans les cellules spermatogéniques des souris déficientes pour $Ca_v3.1$ est identique à celle des souris contrôles et le courant calcique entrant de type T provoquée par une dépolarisation de la membrane disparaît entièrement chez la souris déficiente pour $Ca_v3.2$. Ces résultats mettent fin à la controverse sur l'identité moléculaire du courant calcique entrant dépendant du voltage de type T dans les cellules germinales : ce courant est dû seulement à l'activation des canaux $Ca_v3.2$.

➤ *Le canal $Ca_v3.1$ est absent des spermatozoïdes matures*

Jusqu'à présent, la présence des canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ dans le spermatozoïde mature était seulement soutenue par des expériences de RT-PCR, qui ont montré clairement la présence de transcrits de $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ dans les précurseurs des spermatozoïdes : les spermatocytes (Trevino, Felix et al. 2004).

Dans ce manuscrit, nous avons observé pour la première fois la présence du canal $Ca_v3.2$ au niveau des spermatozoïdes matures par immuno-histochimie ou par Western Blot mais aucune présence du canal $Ca_v3.1$. L'absence du canal $Ca_v3.1$ est confirmée par le fait que la signalisation calcique, la mobilité flagellaire et la fertilité des spermatozoïdes $Ca_v3.1^{-/-}$ ne sont pas affectées. On peut donc dire clairement que les canaux $Ca_v3.1$ ne jouent pas de rôle dans la signalisation calcique qui initie réaction acrosomique.

➤ ***Seule la signalisation calcique des spermatozoïdes $Ca_v3.2^{-/-}$ est affectée lors de la réaction acrosomique***

La signalisation calcique des spermatozoïdes $Ca_v3.1^{-/-}$ et $Ca_v3.2^{-/-}$ a été induite soit par une forte concentration de chlorure de potassium (KCl) extracellulaire, soit par la Zone Pellucide solubilisée. La dépolarisation par le KCl a produit une augmentation calcique biphasée, constituée d'un pic calcique suivi d'un plateau calcique. La signalisation calcique biphasée induite par le KCl dans les spermatozoïdes $Ca_v3.2^{-/-}$ est moins importante que dans les spermatozoïdes contrôles : le pic calcique est réduit de 30% et la signalisation calcique est devenue plus transitoire.

Ces résultats prouvent clairement que les canaux $Ca_v3.2$ contribuent de manière significative à la signalisation calcique qui initie la réaction acrosomique. Cependant, le fait que la signalisation calcique n'est pas supprimée dans les spermatozoïdes $Ca_v3.2^{-/-}$ suggère que d'autres canaux calciques dépendants du voltage soient présents et fonctionnels dans la tête de spermatozoïde. Puisque la signalisation calcique n'est pas affectée dans les spermatozoïdes $Ca_v3.1^{-/-}$, il est peu probable que l'augmentation calcique dépendante du voltage restant des spermatozoïdes $Ca_v3.2^{-/-}$ soit due à l'ouverture des canaux $Ca_v3.1$.

Lors de l'induction de la RA dans des conditions physiologiques (ZP solubilisé), est observée une augmentation calcique dans la tête des spermatozoïdes $Ca_v3.2^{-/-}$, suggérant que l'amplitude de la dépolarisation induite par la liaison de la ZP au spermatozoïde est suffisante pour activer les canaux HVA.

➤ ***Les canaux $Ca_v3.2$ ne sont pas les seuls canaux calciques impliqués dans la signalisation de la RA***

Lors des RA *in vitro* nous observons que le taux de RA réalisés par les spermatozoïdes $Ca_v3.2^{-/-}$ est identique au contrôle. Ces résultats nous suggèrent donc que l'influx calcique dépendant du voltage restant est suffisant pour déclencher la RA et que les canaux $Ca_v3.2$ contribuent seulement à la bonne mise en place de la réaction acrosomique.

Toutes ces données démontrent clairement que l'influx de calcium nécessaire lors de la réaction acrosomique est contrôlé en premier lieu par les deux familles de VDCC, les canaux dépendants du voltage à bas seuil d'activation (LVA) et les canaux dépendants du voltage à haut seuil d'activation (HVA).

Afin de poursuivre cette étude sur les mécanismes d'activation de la réaction acrosomique, il faudrait évaluer le rôle des canaux HVA dans le contrôle de la RA. Certains auteurs ont montré par des techniques immuno-histochimiques qu'il existait une grande variété de canaux calciques dépendants du voltage, à **haut seuil d'activation (CCDV-HS)**, dans le spermatozoïde mature (Wennemuth, Westenbroek et al. 2000). L'expression ou la traduction des canaux calciques à haut seuil d'activation doivent se réaliser dans les étapes ultimes de la spermatogenèse, stades auxquels nous n'avons pas accès par les techniques d'électrophysiologie. Puisque dans les spermatocytes, il n'existe qu'un seul type de courant calcique dépendant du voltage, dit de type T.

Conclusion générale
et perspectives

Le développement de nouvelles stratégies expérimentales pour comprendre les mécanismes de régulation du pouvoir fécondant du spermatozoïde a été la base de ce travail de thèse. Le but de ce travail de thèse a été d'élucider les voies de signalisations qui régulent la physiologie spermatique à l'aide de nouveaux outils pharmacologiques découverts dans les venins d'animaux.

Ainsi, nous avons pu caractériser une nouvelle voie de régulation de la physiologie spermatique : la voie des phospholipases A_2 sécrétées et nous avons aussi caractérisé l'implication des canaux calciques de type T dans la régulation d'une des étapes de la physiologie spermatique : la réaction acrosomique.

Régulation de la physiologie spermatique par les phospholipases A_2 sécrétées

La recherche de nouveaux outils pharmacologiques dans les venins par des tests d'activités biologiques nous a permis de mettre en évidence la voie de régulation de la physiologie spermatique par les phospholipases A_2 sécrétées. Plusieurs études ont suggéré un rôle pour une ou plusieurs phospholipases A_2 sécrétées au niveau de la capacitation, de la réaction acrosomique (RA) et de la fécondation, mais la nature moléculaire de ces enzymes et leurs rôles spécifiques restaient encore inconnus (Roldan and Frago 1993 ; Garde and Roldan 1996) ;(Lui and Meizel 1979; Ono, R. Yanagimachi et al. 1982 ; Llanos, Morales et al. 1993);(Singleton and Killian 1983) ; (Fry, Ghosh et al. 1992) ; (Riffo and Parraga 1996).

À partir de nos résultats, nous avons pu établir un modèle de régulation de la physiologie spermatique par la sPLA $_2$ mGX. Les connaissances actuelles ont permis de déterminer qu'*in vivo* la population de spermatozoïdes est très hétérogène et qu'une fraction importante (20-30%) présente des défauts morphologiques ou fonctionnels compromettant ainsi le développement de l'embryon.

Les spermatozoïdes sont exposés à mGX (et éventuellement à d'autres activités sPLA $_2$) lors de leur mélange avec le liquide séminal (Masuda, Murakami et al. 2004) mais aussi lors de leur ascension dans les voies féminines (capacitation) (Valentin, Ghomashchi et al. 1999).

Nos données appuient l'idée que mGX induit des réactions acrosomiques prématurées et réduit la mobilité spermatique d'une sous-population de spermatozoïdes dite sous-fertile afin d'écarter les spermatozoïdes qui sont incapables d'assurer le développement normal de

l'embryon du processus de fécondation. Et ce, lors de leur mélange avec le liquide séminal et lors de leur ascension dans les voies féminines (capacitation). Par conséquent, la réaction acrosomique qu'on appelle « réaction acrosomique spontanée » correspondrait en partie à la réaction acrosomique déclenchée par mGX et pourrait représenter un mécanisme physiologique de tri des spermatozoïdes dans les organes génitaux mâles et femelles, qui compense le manque de fiabilité de la production des spermatozoïdes (Figure 40).

Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle la sPLA₂ mGX sécrétés lors de la réaction acrosomique induite par la zone pellucide serait impliquée dans le mécanisme d'interaction gamétique *via* ses métabolites lipidiques. Notamment l'addition des métabolites des sPLA₂ (lysoPC) au moment de la fécondation, ont permis de rétablir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes mGX^{-/-}.

Une étude récente montre que l'élimination de la population des spermatozoïdes qui présente une externalisation des phosphatidylsérines permettait d'améliorer le taux de fécondation lors de procréation médicale assistée (Upreti, Hall et al. 1999). mGX pourrait être utile pour éliminer cette population *in vitro*. Ainsi, mGX est une sPLA₂ particulière qui représente un espoir pour de nouvelles stratégies thérapeutiques de lutte contre l'infertilité masculine. Elle pourrait être utilisée dans les techniques de reproduction assistée, pour améliorer les résultats des FIV ou pour sélectionner les spermatozoïdes pour les ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) sur leur statut acrosomique.

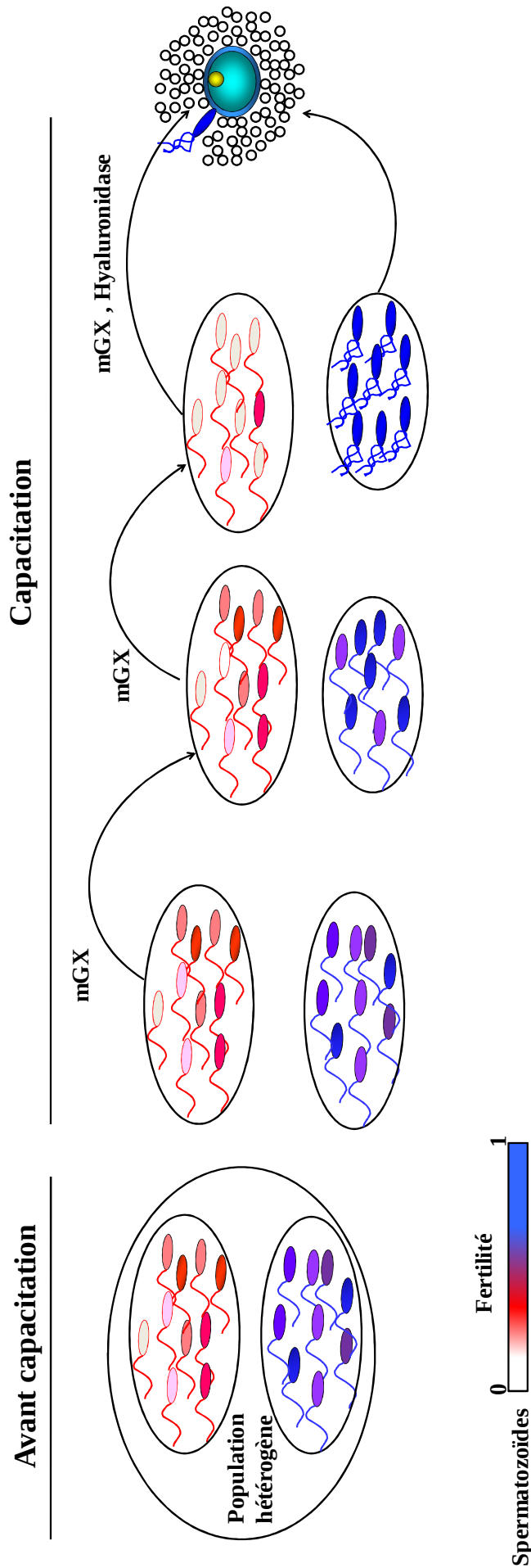


Figure 40: Modèle de la régulation de la physiologie spermatique par la phospholipase A_2 sécrétée mGX.

Les spermatozoïdes vont être exposés à mGX lors de leur ascension dans les voies féminines (capacitation). mGX va induire des réactions acrosomiques spontanées et réduire la mobilité spermatique de la sous-population de spermatozoïdes dite sous-fertile afin de les écarter du processus de fécondation.

Les réactions acrosomiques spontanées et les réactions acrosomiques induites par la zone pellucide vont permettre la libération du contenu acrosomique et augmenter la concentration extracellulaire de mGX et de hyaluronidase. L'augmentation de la concentration extracellulaire de mGX et de hyaluronidase va favoriser l'interaction gamétique et permettre la fécondation.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois que la phospholipase A₂ sécrétée mGX régule différentes étapes clefs de la fécondation : la mobilité spermatique, la réaction acrosomique et l'interaction gamétique. Afin de poursuivre cette étude, il faudrait s'attacher à comprendre les mécanismes moléculaires à la base de ces différentes régulations physiologiques spermatiques.

Les objectifs seront de caractériser : 1) les phospholipides spermatiques impliqués et ciblés par la sPLA₂ mGX, 2) les métabolites importants issus du métabolisme des phospholipides spermatique 3) les cibles moléculaires des métabolites produits et 4) les cascades de signalisation cellulaire induite par des métabolites produits.

➤ ***Identifications des cibles de la sPLA₂-mGX***

L'identification des cibles phospholipidiques et des métabolites produits par la sPLA₂ mGX pourra s'effectuer selon deux méthodes. La première consistera par une analyse des phospholipides membranaires par TLC-FID (flame-ionization detection). La deuxième consistera en une analyse lipidomique par HPLC couplée à la spectrométrie de masse afin d'identifier les métabolites produits. Ces analyses sont très sensibles, elles permettent une analyse complète de la composition lipidique des membranes (Guiraud, de Lorgeril et al. 2008) ainsi qu'une analyse globale de l'ensemble des lipides produits sur une cellule donnée (Bollinger, Li et al. 2009). Nous traiterons les spermatozoïdes purifiés avec la sPLA₂ mGX et identifierons les cibles phospholipidiques spermatiques de mGX ainsi que les différents types d'acides gras, d'éicosanoïdes et de lysophospholipides produits. L'identification et la purification de ces métabolites nous permettront par la suite d'établir leurs cibles moléculaires et leurs mécanismes d'action.

➤ ***Évaluation des mécanismes moléculaires de régulation de deux étapes la physiologie spermatique : la mobilité spermatique et la réaction acrosomique par les métabolites lipidiques produits par mGX***

Comme je l'ai expliqué dans la partie introduction, les canaux ioniques sont importants dans la physiologie du spermatozoïde et contrôlent chaque étape clé : les canaux potassiques, la capacitation et les canaux calciques, la RA et le battement flagellaire. Ainsi, nous pouvons envisager que la phospholipase A₂ mGX régule la mobilité spermatique *via* une modification de la signalisation calcique spermatique par ses métabolites lipidiques.

Bien que le mécanisme de la motilité des spermatozoïdes soit peu connu, il a été montré que la modification de la balance du calcium par différents mécanismes était très importante. Les canaux CatSper sont à l'heure actuelle, les acteurs principaux de la signalisation calcique qui régule la mobilité spermatique. En effet, l'invalidation d'un des 4 gènes de CatSper (CatSper 1, 2, 3 ou 4) chez la souris mâle induit une immobilité flagellaire et une infertilité (Ren, Navarro et al. 2001; Avidan, Tamary et al. 2003; Carlson, Westenbroek et al. 2003; Lobley, Pierron et al. 2003; Carlson, Quill et al. 2005; Qi, Moran et al. 2007; Navarro, Kirichok et al. 2008; Carlson, Burnett et al. 2009).

La caractérisation de l'action des métabolites lipidiques de mGX sur le flux calcique Catsper dépendant est difficile. En effet, les canaux CatSper, bien que clonés, ne permettent pas des études pharmacologiques par des techniques de réexpression dans des systèmes hétérologues. De ce fait, il semblerait que des sous-unités essentielles de régulation seraient manquantes pour que leur expression membranaire soit possible. Seule la technique d'imagerie calcique sur des spermatozoïdes matures nous permettra de visualiser les vagues calciques induites par l'activation de ce type de canaux (Ren, Navarro et al. 2001). Ainsi, dans cette optique nous envisageons de prétraiter les spermatozoïdes matures avec les métabolites lipidiques purifiés de la sPLA₂ mGX et regarder leurs effets sur la vague calcique de CatSper induit par de l'AMP_c (Ren, Navarro et al. 2001).

Cependant, malgré le rôle principal de Catsper dans la mobilité spermatique, on peut aussi envisager que ces métabolites régulerait d'autres canaux calciques. Des études d'immunolocalisations situent les canaux TRPC1, 3, 4 et 6 dans le flagelle du spermatozoïde (Castellano, Trevino et al. 2003) et l'utilisation d'antagonistes des canaux TRPCs montre que ces protéines pourraient jouer un rôle dans le contrôle du mouvement flagellaire humain. Ainsi, il serait intéressant de caractériser l'effet des métabolites lipidiques de mGX sur les courants calciques des canaux TRPC par la technique de patch clamp et d'imagerie calcique.

L'utilisation de la technique du patch clamp en configuration « cellule entière » nous permettra de perfuser la cellule avec les métabolites identifiés précédemment et de tester leurs effets sur les flux ioniques. Les différents canaux TRPC seront sur-exprimés dans des cellules HEK de telle manière que l'immense majorité du courant mesurée corresponde au canal introduit dans la cellule.

L'utilisation de l'imagerie calcique est plus difficile, car on mesure la variation de calcium sur les spermatozoïdes entiers. Ainsi, nous prétraiterons les spermatozoïdes matures avec les métabolites lipidiques purifiés de la sPLA₂ mGX et regarderons leurs effets sur la vague calcique de TRPC activée par un outil pharmacologique qui entraîne une vidange des stocks calciques : la thapsigargine. La thapsigargine, alcaloïde de plante, est un inhibiteur des pompes Ca²⁺-ATPases de type SERCA. Ce type de pompe se localise au niveau de la membrane du réticulum. Le blocage de ces pompes entraîne une fuite passive de calcium hors du réticulum (le stock calcique est poreux) et aboutit *in fine* à l'activation des canaux calciques sensibles à la vidange des stocks (TRPC). Cette activation se traduit par un influx de calcium dans la cellule. La thapsigargine est appliquée en absence de calcium externe, afin de mesurer dans un premier temps l'augmentation de calcium cytoplasmique induite par la vidange du stock. Lorsque la vidange est terminée et que le calcium est retourné à son niveau basal dans la cellule, le calcium est réintroduit dans le milieu externe. Le signal d'ouverture des canaux TRPC étant toujours présent (stocks calciques vides), l'influx de calcium est alors enregistré.

En ce qui concerne la modulation de la réaction acrosomique par les métabolites lipidiques de la sPLA₂ mGX, nos résultats nous ont permis d'établir qu'elle ne passait pas par une régulation des canaux calciques. Car, l'ajout de BAPTA-AM n'empêchait pas la modulation de la réaction acrosomique par mGX.

La réaction acrosomique est un processus très régulé, composée de plusieurs étapes. Les protéines SNAREs y jouent un rôle primordial, elles constituent des étiquettes qui permettent la reconnaissance mutuelle et le déclenchement de la fusion entre la vésicule acrosomique et la membrane plasmique du spermatozoïde (Tomes, Michaut et al. 2002; Tomes 2007). Certaines études ont montré que l'exocytose des vésicules synaptiques pouvait être induite par l'ajout d'acide gras (De Blas, Michaut et al. 2002; De Blas, Roggero et al. 2005; Darios, Connell et al. 2007; Davletov, Connell et al. 2007). Ces acides gras permettraient la régulation d'une protéine SNARE : la syntaxine.

Il existe différentes isoformes de la syntaxine. Une isoforme : la syntaxine 1, est présente dans les complexes SNAREs spermatiques qui sont impliqués dans la mise en place de la réaction acrosomique (Tomes, Michaut et al. 2002; Tomes 2007). Nous pouvons, envisager

que les métabolites lipidiques spermatiques produits par la sPLA₂ mGX régulent la réaction acrosomique par une modulation de l'activité des protéines SNAREs spermatiques.

L'utilisation d'une combinaison de neurotoxines, d'anticorps anti-SNAREs, des métabolites lipidiques produits par mGX et de chélateur de Ca²⁺ photosensible (De Blas, Roggero et al. 2005) nous permettra de déterminer *in vitro* la modulation de l'activité des protéines SNAREs.

➤ ***Évaluation de l'implication de la sPLA₂-mGX dans l'interaction gamétique***

L'étude des voies moléculaires de régulation de l'interaction gamétique par la sPLA₂ mGX est plus difficile à mettre en place. En effet, cette interaction fait intervenir deux cellules distinctes. De plus, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction gamétique sont peu connus. Les connaissances actuelles permettent de savoir qu'ils existent différents partenaires protéiques tels que : la famille des protéines ADAM, l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$, la protéine CD9 et la protéine Izumo.

Pour caractériser les voies moléculaires de régulation de l'interaction gamétique par la sPLA₂ mGX, nous envisageons dans un premier temps de confirmer son implication par des expériences *in vitro* en évaluant le pourcentage de spermatozoïdes accrochés à la zone pellucide de l'ovocyte après pré-traitement avec la sPLA₂ mGX ou ses métabolites lipidiques. Et dans un deuxième temps, de regarder si la sPLA₂ mGX ou ses métabolites sont capables ou non de réguler l'interaction gamétique par une interaction directe avec un des partenaires protéiques, par exemple Izumo par la technique de Pull-Down.

➤ ***Évaluation du rôle des autres sPLA₂ de mammifères***

Il existe *in vivo* un grand nombre de sPLA₂ qui pourraient potentiellement moduler la physiologie des spermatozoïdes. Il sera intéressant de tester ces différentes sPLA₂ humaines ou de souris seules ou en présence de la sPLA₂ de groupe X. De plus, plusieurs peptides antimicrobiens, présent naturellement dans le liquide séminal, sont co-sécrétés avec certaines sPLA₂ et sont connus pour moduler l'activité enzymatique des sPLA₂ ou bien agissent en synergie avec ces dernières (Pruzanski, de Beer et al. 1995; Muller, Autenrieth et al. 2005). Il sera donc important de tester l'effet des sPLA₂ en présence des peptides antimicrobiens naturellement présents dans le liquide séminal (Moura, Chapman et al. 2007) au niveau des différentes étapes clés de la physiologie spermatique. Nous envisageons dans un premier

temps de mesurer l'activité des onze sPLA₂ présentes, soit au niveau des spermatozoïdes (au niveau de l'épididyme), soit dans le liquide séminal (avant éjaculation), par une technique particulièrement sensible d'immuno-essai qu'est la technique TRFIA (Time-Resolved Fluorescence Immunoassay). Et dans un deuxième temps de tester les sPLA₂ les plus représentatives sur les étapes clés de la physiologie spermatique : La mobilité, la réaction acrosomique et la fécondation *in vitro*.

Si les rôles joués par les autres sPLA₂ présentes dans le liquide séminal dans la physiologie spermatique s'avèrent indispensables, une étude du polymorphisme de leur gène au niveau de patients recrutés dans les laboratoires médicaux de procréation assistée, permettra de mieux comprendre les causes de l'infertilité masculine et peut-être de pouvoir les traiter.

Implication des canaux calciques de type T dans la régulation de la réaction acrosomique

Le développement des souris Ca_v3.1^{-/-} et Ca_v3.2^{-/-} nous a donné l'opportunité d'évaluer l'implication des canaux Ca_v3.1 et Ca_v3.2 dans la réaction acrosomique.

Nos données démontrent clairement que l'influx de calcium nécessaire lors de la réaction acrosomique est contrôlé en premier lieu par les deux familles de VDCC, les canaux dépendants du voltage à bas seuil d'activation Ca_v3.2 et les canaux dépendants du voltage à haut seuil d'activation (HVA).

Afin de poursuivre cette étude sur les mécanismes d'activation de la réaction acrosomique, il faudrait évaluer le rôle des canaux HVA dans le contrôle de la RA. Certains auteurs ont montré par des techniques immuno-histochimiques qu'il existait une grande variété de canaux calciques dépendants du voltage, à **haut seuil d'activation (CCDV-HS)**, dans le spermatozoïde mature, (Wennemuth, Westenbroek et al. 2000). Ainsi, on retrouve au niveau de la tête du spermatozoïde les canaux Ca_v1.2, Ca_v2.1, 2.2 et 2.3. Ces résultats, obtenus par immuno-histochimie, ne sont pas supportés par l'enregistrement de ces types de canaux calciques par électrophysiologie. En effet, l'étude des canaux ioniques du spermatozoïde est rendue complexe par le fait que la technique du patch-clamp n'est pas possible sur les spermatozoïdes à l'heure actuelle. Une technique alternative consiste à enregistrer les courants dans les cellules spermatogéniques des testicules. Cette expérience n'a révélé la

présence que de courants T. Ainsi, l'expression ou la traduction de ces canaux calciques à haut seuil d'activation doivent se réaliser dans les étapes ultimes de la spermatogenèse, stades auxquels nous n'avons pas accès par les techniques classiques d'électrophysiologie. Puisque dans les spermatocytes, il n'existe qu'un seul type de courant calcique dépendant du voltage, dit de type T.

Dans l'optique de déterminer l'implication des canaux HVA dans la physiologie spermatique, des souris ko de $Ca_v1.2$; $Ca_v2.1$, 2.2 et 2.3 ont été élaborées (Jun, Piedras-Renteria et al. 1999; Kim, Jun et al. 2001; Sakata, Saegusa et al. 2001). Ces souris ont permis de mettre en évidence que les canaux $Ca_v2.1$, 2.2 et 2.3 n'étaient pas impliqués dans les mécanismes de régulation de la physiologie spermatique (Jun, Piedras-Renteria et al. 1999; Kim, Jun et al. 2001; Sakata, Saegusa et al. 2001). Aucune donnée sur l'implication de $Ca_v1.2$ dans la physiologie spermatique n'a pu être obtenue, car le KO $Ca_v1.2$ est létal.

Cependant, le rôle putatif de ce canal est renforcé par les résultats qui montrent l'existence d'une délétion dans les transcrits pour les canaux calciques de type $Ca_v1.x$ dans les testicules d'homme infertile avec varicocèles (Benoff, Goodwin et al. 2005).

Il serait souhaitable de mieux appréhender le rôle de ce canal calcique HVA $Ca_v1.2$ dans la physiologie spermatique. Pour cela, nous envisageons une stratégie originale qui consiste à invalider le gène $Ca_v1.2$ dans le temps et dans l'espace avec un système de recombinaison Cre/Lox P (Barrionuevo, Bagheri-Fam et al. 2006).

Dans un premier temps, on élaborera des souris transgéniques où deux sites lox P seront insérés de part et d'autre de l'exon du gène de $Ca_v1.2$. Dans un second temps, des souris transgéniques où la Cre recombinase sera placée sous la dépendance d'un promoteur testicule spécifique de la protamine. Le croisement des souris transgéniques Lox P/ $Ca_v1.2$ et Cre/protamine nous permettra de créer des souris saines où les canaux $Ca_v1.2$ seront invalidés seulement dans les testicules. Ces souris nous permettront d'évaluer l'implication des canaux $Ca_v1.2$ dans le mécanisme de spermatogenèse et la physiologie spermatique.

Références Bibliographiques

- A -

- Aanesen, A., G. Fried, et al. (1996). "Carrier-mediated gamma-aminobutyric acid uptake in human spermatozoa indicating the presence of a high-affinity gamma-aminobutyric acid transport protein." Biol Reprod 54(4): 841-6.
- Almeida, E. A., A. P. Huovila, et al. (1995). "Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor." Cell 81(7): 1095-104.
- Alvarez, J. G. and B. T. Storey (1995). "Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa." Mol Reprod Dev 42(3): 334-46.
- Arnoult, C., R. A. Cardullo, et al. (1996). "Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 13004-9.
- Arnoult, C., I. G. Kazam, et al. (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): 6757-62.
- Arnoult, C., M. Villaz, et al. (1998). "Pharmacological properties of the T-type Ca^{2+} current of mouse spermatogenic cells." Mol Pharmacol 53(6): 1104-11.
- Arnoult, C., Y. Zeng, et al. (1996). "ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization." J Cell Biol 134(3): 637-45.
- Ashraf, M., R. N. Peterson, et al. (1982). "Activity and location of cation-dependent ATPases on the plasma membrane of boar spermatozoa." Biochem Biophys Res Commun 107(4): 1273-8.
- Auger, J., J. M. Kunstmann, et al. (1995). "Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years." N Engl J Med 332(5): 281-5.
- Avidan, N., H. Tamary, et al. (2003). "CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene." Eur.J.Hum.Genet. 11(7): 497-502.

- B -

- Bai, J. and Y. Shi (2002). "Inhibition of T-type Ca^{2+} currents in mouse spermatogenic cells by gossypol, an antifertility compound." Eur.J.Pharmacol. 440(1): 1-6.
- Baldi, E., R. Casano, et al. (1991). "Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa." J Androl 12(5): 323-30.

- Baldi, E., M. Luconi, et al. (2000). "Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction." Front Biosci 5: E110-23.
- Bao, S., D. J. Miller, et al. (2004). "Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility." J Biol Chem 279(37): 38194-200.
- Barfield, J. P., C. H. Yeung, et al. (2005). "Characterization of potassium channels involved in volume regulation of human spermatozoa." Mol Hum Reprod 11(12): 891-7.
- Barrionuevo, F., S. Bagheri-Fam, et al. (2006). "Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice." Biol Reprod 74(1): 195-201.
- Baumert, M., P. R. Maycox, et al. (1989). "Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain." EMBO J 8(2): 379-84.
- Bennett, M. K., N. Calakos, et al. (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." Science 257(5067): 255-9.
- Benoff, S., L. O. Goodwin, et al. (2005). "Deletions in L-type calcium channel alpha1 subunit testicular transcripts correlate with testicular cadmium and apoptosis in infertile men with varicoceles." Fertil Steril 83(3): 622-34.
- Benoff, S., A. Jacob, et al. (2000). "Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium." Hum Reprod Update 6(2): 107-21.
- Berridge, M. J. (1995). "Capacitative calcium entry." Biochem J 312 (Pt 1): 1-11.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "Signal transduction. The calcium entry pas de deux." Science 287(5458): 1604-5.
- Biel, M., M. Seeliger, et al. (1999). "Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3." Proc Natl Acad Sci U S A 96(13): 7553-7.
- Bingham, C. O., 3rd, R. J. Fijneman, et al. (1999). "Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells." J Biol Chem 274(44): 31476-84.
- Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J 348 Pt 2: 241-55.
- Bleil, J. D. and P. M. Wassarman (1980). "Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm." Cell 20(3): 873-82.

- Bleil, J. D. and P. M. Wassarman (1980). "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.
- Block, M. R., B. S. Glick, et al. (1988). "Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport." Proc Natl Acad Sci U S A 85(21): 7852-6.
- Bock, J. B., H. T. Matern, et al. (2001). "A genomic perspective on membrane compartment organization." Nature 409(6822): 839-41.
- Boehning, D., S. K. Joseph, et al. (2001). "Single-channel recordings of recombinant inositol trisphosphate receptors in mammalian nuclear envelope." Biophys J 81(1): 117-24.
- Bojarski, L., P. Pomorski, et al. (2009). "Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca^{2+} entry in familial Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta 1793(6): 1050-7.
- Bollinger, J. G., H. Ii, et al. (2009). "Improved method for the quantification of lysophospholipids including enol ether species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Lipid Res.
- Bork, P. (1996). "Sperm-egg binding protein or proto-oncogene?" Science 271(5254): 1431-2; author reply 1434-5.
- Brandelli, A., P. V. Miranda, et al. (1996). "Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminyl/mannosyl neoglycoproteins." J Androl 17(5): 522-9.
- Breitbart, H. and S. Rubinstein (1982). "Characterization of Mg^{2+} - and Ca^{2+} -ATPase activity in membrane vesicles from ejaculated ram seminal plasma." Arch Androl 9(2): 147-57.
- Breitbart, H. and B. Spungin (1997). "The biochemistry of the acrosome reaction." Mol Hum Reprod 3(3): 195-202.
- Breitbart, H., B. Stern, et al. (1983). "Calcium transport and Ca^{2+} -ATPase activity in ram spermatozoa plasma membrane vesicles." Biochim Biophys Acta 728(3): 349-55.
- Brennwald, P. and P. Novick (1993). "Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4." Nature 362(6420): 560-3.
- Brewis, I. A., R. Clayton, et al. (1998). "Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3." Mol Hum Reprod 4(12): 1136-44.
- Brokaw, C. J. (1991). "Calcium sensors in sea urchin sperm flagella." Cell Motil Cytoskeleton 18(2): 123-30.

- Brokaw, C. J. and S. M. Nagayama (1985). "Modulation of the asymmetry of sea urchin sperm flagellar bending by calmodulin." J Cell Biol 100(6): 1875-83.
- Brown, W. J., K. Chambers, et al. (2003). "Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function." Traffic 4(4): 214-21.
- Buffone, M. G., J. A. Foster, et al. (2008). "The role of the acrosomal matrix in fertilization." Int J Dev Biol 52(5-6): 511-22.
- Burgos, C., C. Maldonado, et al. (1995). "Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C4 in mice." Biol Reprod 53(1): 84-92.
- Burks, D. J., R. Carballada, et al. (1995). "Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization." Science 269(5220): 83-6.

- C -

- Calogero, A. E., N. Burrello, et al. (1999). "Gamma-aminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone." Fertil Steril 71(5): 930-6.
- Carlson, A. E., L. A. Burnett, et al. (2009). "Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation." PLoS One 4(8): e6844.
- Carlson, A. E., T. A. Quill, et al. (2005). "Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm." J.Biol.Chem. 280(37): 32238-32244.
- Carlson, A. E., R. E. Westenbroek, et al. (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.
- Carr, D. W., A. Fujita, et al. (2001). "Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA." J Biol Chem 276(20): 17332-8.
- Castellano, L. E., C. L. Trevino, et al. (2003). "Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility." FEBS Lett. 541(1-3): 69-74.
- Ceccarelli, C., D. Canale, et al. (2008). "Radioactive iodine (131I) effects on male fertility." Curr Opin Urol 18(6): 598-601.
- Chapelin, C., B. Duriez, et al. (1997). "Isolation of several human axonemal dynein heavy chain genes: genomic structure of the catalytic site, phylogenetic analysis and chromosomal assignment." FEBS Lett 412(2): 325-30.

- Chapman, E. R., P. I. Hanson, et al. (1995). "Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1." J Biol Chem 270(40): 23667-71.
- Chavrier, P., J. P. Gorvel, et al. (1991). "Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal." Nature 353(6346): 769-72.
- Chen, Y., M. J. Cann, et al. (2000). "Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor." Science 289(5479): 625-8.
- Cheng, A., T. Le, et al. (1994). "Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3." J Cell Biol 125(4): 867-78.
- Chin, G. J. and S. A. Goldman (1992). "Purification of squid synaptic vesicles and characterization of the vesicle-associated proteins synaptobrevin and Rab3A." Brain Res 571(1): 89-96.
- Cho, C., D. O. Bunch, et al. (1998). "Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta." Science 281(5384): 1857-9.
- Cho, C., H. Ge, et al. (2000). "Analysis of mouse fertilin in wild-type and fertilin beta(-/-) sperm: evidence for C-terminal modification, alpha/beta dimerization, and lack of essential role of fertilin alpha in sperm-egg fusion." Dev Biol 222(2): 289-95.
- Colledge, C. J., J. P. Hunsperger, et al. (1992). "Precursor structure of omega-conotoxin GVIA determined from a cDNA clone." Toxicon 30(9): 1111-6.
- Collodel, G., S. Capitani, et al. (2009). "Semen Quality of Male Idiopathic Infertile Smokers and Nonsmokers: An Ultrastructural Study." J Androl.
- Cosson, J. (1996). "A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating." Cell Biol Int 20(2): 83-94.
- Cox, J. F., V. Alfaro, et al. (2006). "Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus." Theriogenology 66(4): 860-7.
- Cross, N. L. (2007). "Effect of pH on the development of acrosomal responsiveness of human sperm." Andrologia 39(2): 55-9.
- Cummins, J. M., A. D. Fleming, et al. (1986). "Labelling of living mammalian spermatozoa with the fluorescent thiol alkylating agent, monobromobimane (MB): immobilization upon exposure to ultraviolet light and analysis of acrosomal status." J Exp Zool 237(3): 375-82.

- Darios, F., E. Connell, et al. (2007). "Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis." J Physiol 585(Pt 3): 699-704.
- Darszon, A., J. J. Acevedo, et al. (2006). "Sperm channel diversity and functional multiplicity." Reproduction 131(6): 977-88.
- Darszon, A., C. Beltran, et al. (2001). "Ion transport in sperm signaling." Dev Biol 240(1): 1-14.
- Darszon, A., P. Labarca, et al. (1999). "Ion channels in sperm physiology." Physiol Rev 79(2): 481-510.
- Darszon, A., T. Nishigaki, et al. (2005). "Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology." Int Rev Cytol 243: 79-172.
- DasGupta, S., C. L. Mills, et al. (1993). "Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay." J Reprod Fertil 99(1): 135-43.
- Davidson, F. F. and E. A. Dennis (1990). "Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms." J Mol Evol 31(3): 228-38.
- Davies, J. N. and G. W. Zamponi (2008). "Old proteins, developing roles: The regulation of calcium channels by synaptic proteins." Channels (Austin) 2(2).
- Davletov, B., E. Connell, et al. (2007). "Regulation of SNARE fusion machinery by fatty acids." Cell Mol Life Sci 64(13): 1597-608.
- De Blas, G., M. Michaut, et al. (2002). "The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis." J Biol Chem 277(51): 49326-31.
- De Blas, G. A., C. M. Roggero, et al. (2005). "Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis." PLoS Biol 3(10): e323.
- De Vries, K. J., T. Wiedmer, et al. (2003). "Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells." Biol Reprod 68(6): 2122-34.
- Deng, X., Y. Wang, et al. (2009). "STIM and Orai: Dynamic Intermembrane Coupling to Control Cellular Calcium Signals." J Biol Chem 284(34): 22501-5.
- Dennis, E. A. (1997). "The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes." Trends Biochem Sci 22(1): 1-2.
- Dieterich, K., R. Soto Rifo, et al. (2007). "Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility." Nat Genet 39(5): 661-5.
- Diez-Sanchez, C., E. Ruiz-Pesini, et al. (2003). "Mitochondrial DNA content of human spermatozoa." Biol Reprod 68(1): 180-5.

- Diez-Sanchez, C., E. Ruiz-Pesini, et al. (2003). "Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins." FEBS Lett 553(1-2): 205-8.
- Dillman, J. F., 3rd and K. K. Pfister (1994). "Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles." J Cell Biol 127(6 Pt 1): 1671-81.
- Duman, J. G. and J. G. Forte (2003). "What is the role of SNARE proteins in membrane fusion?" Am J Physiol Cell Physiol 285(2): C237-49.
- Dzeja, C., V. Hagen, et al. (1999). "Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels." EMBO J 18(1): 131-44.

-E-

- Eddy, E. M. (2007). "The scaffold role of the fibrous sheath." Soc Reprod Fertil Suppl 65: 45-62.
- Eddy, E. M., D. A. O'Brien, et al. (1991). "Intermediate filament--like proteins in the fibrous sheath of the mouse sperm flagellum." Ann N Y Acad Sci 637: 224-39.
- Eddy, E. M., K. Toshimori, et al. (2003). "Fibrous sheath of mammalian spermatozoa." Microsc Res Tech 61(1): 103-15.
- Edwards, A. S. and J. D. Scott (2000). "A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond." Curr Opin Cell Biol 12(2): 217-21.
- Edwards, R. G. and C. E. Bishop (1997). "On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility." Mol Hum Reprod 3(7): 549-54.
- Erpenbach, K. H. (1991). "Systemic treatment with interferon-alpha 2B: an effective method to prevent sterility after bilateral mumps orchitis." J Urol 146(1): 54-6.
- Escalier, D. (2006). "Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies." Hum Reprod Update 12(4): 449-61.
- Escoffier, J., S. Boisseau, et al. (2007). "Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice." J Cell Physiol 212(3): 753-63.
- Espinosa, F., J. L. de la Vega-Beltran, et al. (1998). "Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction." FEBS Lett 426(1): 47-51.
- Espinosa, F., J. L. De la Vega, et al. (1998). "Mouse sperm patch-clamp recordings reveal single Cl⁻ channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction." FEBS Lett. 426(1): 47-51.

Espinosa, F., I. Lopez-Gonzalez, et al. (1999). "Anion channel blockers differentially affect T-type Ca^{2+} currents of mouse spermatogenic cells, $\alpha_1\text{E}$ currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction." Dev.Genet. 25(2): 103-114.

Esposito, G., B. S. Jaiswal, et al. (2004). "Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect." Proc Natl Acad Sci U S A 101(9): 2993-8.

- F -

Fasshauer, D. (2003). "Structural insights into the SNARE mechanism." Biochim Biophys Acta 1641(2-3): 87-97.

Fasshauer, D., W. Antonin, et al. (2002). "SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis." Nat Struct Biol 9(2): 144-51.

Felix, R. (2005). "Molecular physiology and pathology of Ca^{2+} -conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm." Reproduction 129(3): 251-62.

Felix, R., C. J. Serrano, et al. (2002). "Identification of distinct K^{+} channels in mouse spermatogenic cells and sperm." Zygote 10(2): 183-8.

Ferris, C. D., A. M. Cameron, et al. (1991). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589." Biochem Biophys Res Commun 175(1): 192-8.

Ferris, C. D., R. L. Huganir, et al. (1991). "Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A 88(6): 2232-5.

Ferris, C. D., R. L. Huganir, et al. (1990). "Calcium flux mediated by purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles is allosterically regulated by adenine nucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A 87(6): 2147-51.

Fielding, C. J. and P. E. Fielding (2000). "Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships." Biochim Biophys Acta 1529(1-3): 210-22.

Flesch, F. M., J. F. Brouwers, et al. (2001). "Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane." J Cell Sci 114(Pt 19): 3543-55.

Flesch, F. M., E. Wijnand, et al. (2001). "Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida." Mol Reprod Dev 60(1): 107-15.

- Florman, H. M. (1994). "Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis." Dev.Biol. 165(1): 152-164.
- Florman, H. M., M. E. Corron, et al. (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, H. M. and N. L. First (1988). "The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro." Dev.Biol. 128(2): 453-463.
- Florman, H. M. and P. M. Wassarman (1985). "O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity." Cell 41(1): 313-24.
- Fraser, L. R. (1987). "Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro." J Reprod Fertil 81(1): 77-89.
- Fry, M. R., S. S. Ghosh, et al. (1992). "Role of human sperm phospholipase A2 in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A2 activity on membrane perturbations and oocyte penetration." Biol Reprod 47(5): 751-9.
- Fujita, A., K. Nakamura, et al. (2000). "Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella." J Cell Sci 113 (Pt 1): 103-12.

- G -

- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2000). "The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane." Development 127(11): 2407-20.
- Gadella, B. M., P. S. Tsai, et al. (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." Int J Dev Biol 52(5-6): 473-80.
- Garbi, M., S. Rubinstein, et al. (2000). "Activation of protein kinase calpha in the lysophosphatidic acid-induced bovine sperm acrosome reaction and phospholipase D1 regulation." Biol Reprod 63(5): 1271-7.
- Garde, J. and E. R. Roldan (1996). "rab 3-peptide stimulates exocytosis of the ram sperm acrosome via interaction with cyclic AMP and phospholipase A2 metabolites." FEBS Lett 391(3): 263-8.
- Garde, J. and E. R. Roldan (2000). "Stimulation of Ca^{2+} -dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A2." J Reprod Fertil 118(1): 57-68.

- Gatti, J. L., J. C. Nicolle, et al. (1994). "Characterisation of boar sperm dynein heavy chains by UV-vanadate dependent photocleavage." Biol Cell 82(2-3): 203-10.
- Gibbons, I. R. (1996). "The role of dynein in microtubule-based motility." Cell Struct Funct 21(5): 331-42.
- Gong, X., D. H. Dubois, et al. (1995). "Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm." Science 269(5231): 1718-21.
- Gonzalez, L., Jr. and R. H. Scheller (1999). "Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex." Cell 96(6): 755-8.
- Goodwin, L. O., D. S. Karabinus, et al. (2000). "L-type voltage-dependent calcium channel alpha-1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa." Mol Hum Reprod 6(2): 127-36.
- Goodwin, L. O., N. B. Leeds, et al. (1999). "Identification of structural elements of the testis-specific voltage dependent calcium channel that potentially regulate its biophysical properties." Mol.Hum.Reprod. 5(4): 311-322.
- Goodwin, L. O., N. B. Leeds, et al. (1998). "Alternative splicing of exons in the alpha1 subunit of the rat testis L- type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites." Mol.Hum.Reprod. 4(3): 215-226.
- Goodwin, L. O., N. B. Leeds, et al. (1998). "Alternative splicing of exons in the alpha1 subunit of the rat testis L-type voltage-dependent calcium channel generates germ line-specific dihydropyridine binding sites." Mol Hum Reprod 4(3): 215-26.
- Goodwin, L. O., N. B. Leeds, et al. (1997). "Isolation and characterization of the primary structure of testis- specific L-type calcium channel: Implications for contraception." Mol.Hum.Reprod. 3(3): 255-268.
- Gordon, M. and R. J. Barnett (1967). "Fine structural cytochemical localizations of phosphatase activities of rat and guinea pig." Exp Cell Res 48(2): 395-412.
- Greve, J. M. and P. M. Wassarman (1985). "Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat." J Mol Biol 181(2): 253-64.
- Grimes, D. A. and L. M. Lopez (2007). ""Oligozoospermia," "azoospermia," and other semen-analysis terminology: the need for better science." Fertil Steril 88(6): 1491-4.
- Guiraud, A., M. de Lorgeril, et al. (2008). "Interactions of ethanol drinking with n-3 fatty acids in rats: potential consequences for the cardiovascular system." Br J Nutr 100(6): 1237-44.
- Gwatkin, R. B. and D. T. Williams (1977). "Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction." J Reprod Fertil 49(1): 55-9.

- Hanson, P. I., R. Roth, et al. (1997). "Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy." Cell 90(3): 523-35.
- Harbuz, R., R. Zouari, et al. (2009). "[Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction]." Gynecol Obstet Fertil 37(6): 546-51.
- Hardy, D. M. and D. L. Garbers (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): 26025-8.
- Harrison, R. A. and B. M. Gadella (2005). "Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation." Theriogenology 63(2): 342-51.
- Harrison, R. A., E. R. Roldan, et al. (1990). "Ram spermatozoa produce inositol 1,4,5-trisphosphate but not inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate during the Ca^{2+} /ionophore-induced acrosome reaction." Cell Signal 2(3): 277-84.
- He, X. B., Y. C. Yan, et al. (2003). "Cloning of rat sp56, the homologue of mouse sperm ZP3 receptor-sp56." Cell Res 13(2): 121-9.
- He, Z. Y., C. Brakebusch, et al. (2003). "None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion." Dev Biol 254(2): 226-37.
- Herlyn, H. and H. Zischler (2008). "The molecular evolution of sperm zonadhesin." Int J Dev Biol 52(5-6): 781-90.
- Hess, K. C., B. H. Jones, et al. (2005). "The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization." Dev Cell 9(2): 249-59.
- Heytens, E., J. Parrington, et al. (2009). "Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC{zeta}) in spermatozoa from infertile men." Hum Reprod.
- Hinsch, K. D., B. Habermann, et al. (1993). "ADP-ribosylation of Rho proteins inhibits sperm motility." FEBS Lett 334(1): 32-6.
- Ho, H. C., K. A. Granish, et al. (2002). "Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca^{2+} and not cAMP." Dev Biol 250(1): 208-17.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2001). "Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation." Reproduction 122(4): 519-26.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2003). "Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility." Biol Reprod 68(5): 1590-6.
- Hong, W. (2005). "SNAREs and traffic." Biochim Biophys Acta 1744(2): 120-44.

- I -

- Ignotz, G. G. and S. S. Suarez (2005). "Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembranated bovine sperm." Biol Reprod 73(3): 519-26.
- Inaba, K. (2003). "Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling." Zoolog Sci 20(9): 1043-56.
- Inaba, K. (2007). "Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects." Ann N Y Acad Sci 1101: 506-26.
- Inaba, K., O. Kagami, et al. (1999). "Tctex2-related outer arm dynein light chain is phosphorylated at activation of sperm motility." Biochem Biophys Res Commun 256(1): 177-83.
- Inoue, N., M. Ikawa, et al. (2005). "The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs." Nature 434(7030): 234-8.

- J -

- Jagannathan, S., S. J. Publicover, et al. (2002). "Voltage-operated calcium channels in male germ cells." Reproduction. 123(2): 203-215.
- Jagannathan, S., E. L. Punt, et al. (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): 8449-56.
- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs--engines for membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol 7(9): 631-43.
- Jameson, R. M. (1981). "Clinical aspects of infections associated with male infertility: a review." J R Soc Med 74(5): 371-3.
- Jiang, Q. X., E. C. Thrower, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at 2.4 Å resolution." EMBO J 21(14): 3575-81.
- Jimenez, I., H. Gonzalez-Marquez, et al. (2003). "Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa." Theriogenology 59(5-6): 1171-80.
- Joyce, C. L., N. A. Nuzzo, et al. (1987). "Evidence for a role of cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization." J Androl 8(2): 74-82.

Jun, K., E. S. Piedras-Renteria, et al. (1999). "Ablation of P/Q-type Ca^{2+} channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the $\alpha(1A)$ -subunit." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96(26): 15245-15250.

Jungnickel, M. K., H. Marrero, et al. (2001). "Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3." Nat Cell Biol 3(5): 499-502.

- K -

Kaupp, U. B., T. Niidome, et al. (1989). "Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel." Nature 342(6251): 762-6.

Kim, C., K. Jun, et al. (2001). "Altered nociceptive response in mice deficient in the $\alpha(1B)$ subunit of the voltage-dependent calcium channel." Mol.Cell Neurosci. 18(2): 235-245.

King, S. M. (2000). "AAA domains and organization of the dynein motor unit." J Cell Sci 113 (Pt 14): 2521-6.

King, S. M. and G. B. Witman (1994). "Multiple sites of phosphorylation within the α heavy chain of Chlamydomonas outer arm dynein." J Biol Chem 269(7): 5452-7.

Kini, R. M. and H. J. Evans (1989). "A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2." Toxicon 27(6): 613-35.

Kinloch, R. A., Y. Sakai, et al. (1995). "Mapping the mouse ZP3 combining site for sperm by exon swapping and site-directed mutagenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 92(1): 263-7.

Kirichok, Y., B. Navarro, et al. (2006). "Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel." Nature. 439(7077): 737-740.

Kiselyov, K., X. Xu, et al. (1998). "Functional interaction between InsP_3 receptors and store-operated Htrp_3 channels." Nature 396(6710): 478-82.

Kobori, H., S. Miyazaki, et al. (2000). "Characterization of intracellular Ca^{2+} increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa." Biol Reprod 63(1): 113-20.

Kon, T., M. Nishiura, et al. (2004). "Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein." Biochemistry 43(35): 11266-74.

Krasznai, Z., Z. T. Krasznai, et al. (2006). "Role of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation." Cell Motil Cytoskeleton 63(2): 66-76.

- L -

- Ladha, S. (1998). "Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon." J Membr Biol 165(1): 1-10.
- Lambeau, G. and M. H. Gelb (2008). "Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2." Annu Rev Biochem 77: 495-520.
- Lax, Y., S. Grossman, et al. (1990). "Role of lipoxygenase in the mechanism of acrosome reaction in mammalian spermatozoa." Biochim Biophys Acta 1043(1): 12-8.
- Lesage, F., J. Barhanin, et al. (2000). "Le transport du potassium : aspects moléculaires et pathologiques." medecine/ sciences 16: 663-673.
- Leyton, L. and P. Saling (1989). "95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding." Cell 57(7): 1123-30.
- Leyton, L. and P. Saling (1989). "Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction." J Cell Biol 108(6): 2163-8.
- Lievano, A., C. M. Santi, et al. (1996). "T-type Ca²⁺ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction." FEBS Lett. 388(2-3): 150-154.
- Lindemann, C. B. and K. S. Kanous (1989). "Regulation of mammalian sperm motility." Arch Androl 23(1): 1-22.
- Litscher, E. S., K. Juntunen, et al. (1995). "Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro." Biochemistry 34(14): 4662-9.
- Litscher, E. S. and P. M. Wassarman (1996). "Recombinant hamster sperm receptors that exhibit species-specific binding to sperm." Zygote 4(3): 229-36.
- Litvin, T. N., M. Kamenetsky, et al. (2003). "Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate." J Biol Chem 278(18): 15922-6.
- Liu, J., J. Xia, et al. (2007). "CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex." J Biol Chem 282(26): 18945-52.
- Llanos, M. N., P. Morales, et al. (1993). "Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro." J.Exp.Zool. 267(2): 209-216.
- Lobley, A., V. Pierron, et al. (2003). "Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis." Reprod.Biol.Endocrinol. 1:53.: 53.
- Lu, Q. X. and B. D. Shur (1997). "Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly." Development 124(20): 4121-4131.

Lucas, P., K. Ukhanov, et al. (2003). "A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction." Neuron 40(3): 551-561.

Lui, C. W. and S. Meizel (1979). "Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction." J Exp Zool 207(2): 173-85.

- M -

Mack, S. R., J. Everingham, et al. (1986). "Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa." J Exp Zool 240(1): 127-36.

Malany, S., H. Osaka, et al. (2000). "Orientation of alpha-neurotoxin at the subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor." Biochemistry 39(50): 15388-98.

Manjunath, P. and I. Therien (2002). "Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation." J Reprod Immunol 53(1-2): 109-19.

Marin-Briggiler, C. I., F. Gonzalez-Echeverria, et al. (2003). "Calcium requirements for human sperm function in vitro." Fertil Steril 79(6): 1396-403.

Marin-Briggiler, C. I., K. N. Jha, et al. (2005). "Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation." J Cell Sci 118(Pt 9): 2013-22.

Marsh, N. A. (2001). "Diagnostic uses of snake venom." Haemostasis 31(3-6): 211-7.

Martinez, P. and A. Morros (1996). "Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation." Front Biosci 1: d103-17.

Masuda, S., M. Murakami, et al. (2004). "Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs." Biochim.Biophys.Acta. 1686(1-2): 61-76.

Matsumoto, M., A. Hirose, et al. (2008). "Review of testicular toxicity of dinitrophenolic compounds, 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol, 4,6-dinitro-o-cresol and 2,4-dinitrophenol." Reprod Toxicol 26(3-4): 185-90.

Matzuk, M. M. and D. J. Lamb (2008). "The biology of infertility: research advances and clinical challenges." Nat Med 14(11): 1197-213.

McCleskey, E. W. (1994). "Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms." Curr Opin Neurobiol 4(3): 304-12.

McLachlan, R. I., C. Mallidis, et al. (1998). "Genetic disorders and spermatogenesis." Reprod Fertil Dev 10(1): 97-104.

- McLaughlin, E. A., J. Frayne, et al. (2001). "Do fertilin beta and cyritestin play a major role in mammalian sperm--oolemma interactions? A critical re-evaluation of the use of peptide mimics in identifying specific oocyte recognition proteins." Mol Hum Reprod 7(4): 313-7.
- McNew, J. A., M. Sogaard, et al. (1997). "Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport." J Biol Chem 272(28): 17776-83.
- Meizel, S. (1997). "Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction." Biol Reprod 56(3): 569-74.
- Meizel, S. and K. O. Turner (1983). "Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids." FEBS Lett. 161(2): 315-318.
- Meizel, S. and K. O. Turner (1984). "The effects of products and inhibitors of arachidonic acid metabolism on the hamster sperm acrosome reaction." J Exp Zool 231(2): 283-8.
- Miki, K., W. D. Willis, et al. (2002). "Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility." Dev Biol 248(2): 331-42.
- Milisav, I. (1998). "Dynein and dynein-related genes." Cell Motil Cytoskeleton 39(4): 261-72.
- Miller, B. J., E. Georges-Labouesse, et al. (2000). "Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent." J Cell Biol 149(6): 1289-96.
- Miyado, K., E. Mekada, et al. (2000). "[A crucial role of tetraspanin, CD9 in fertilization]." Tanpakushitsu Kakusan Koso 45(10): 1728-34.
- Miyado, K., G. Yamada, et al. (2000). "Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization." Science 287(5451): 321-4.
- Moreau, R., P. G. Frank, et al. (1999). "Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux." Biochim Biophys Acta 1438(1): 38-46.
- Mori, C., N. Nakamura, et al. (1998). "Mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase (mHk1-s) transcripts are expressed by alternative splicing from the mHk1 gene and the HK1-S protein is localized mainly in the sperm tail." Mol Reprod Dev 49(4): 374-85.
- Moura, A. A., D. A. Chapman, et al. (2007). "A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls." Anim Reprod.Sci. 98(3-4): 169-188.
- Mrsny, R. J. and S. Meizel (1981). "Potassium ion influx and Na⁺,K⁺-ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction." J Cell Biol 91(1): 77-82.
- Mrsny, R. J. and S. Meizel (1985). "Inhibition of hamster sperm Na⁺, K⁺-ATPase activity by taurine and hypotaurine." Life Sci 36(3): 271-5.

- Mrsny, R. J., J. E. Siiteri, et al. (1984). "Hamster sperm Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase: increased activity during capacitation in vitro and its relationship to cyclic nucleotides." Biol Reprod 30(3): 573-84.
- Muller, C. A., I. B. Autenrieth, et al. (2005). "Innate defenses of the intestinal epithelial barrier." Cell Mol.Life Sci. 62(12): 1297-1307.
- Munoz-Garay, C., J. L. De La Vega-Beltran, et al. (2001). "Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation." Dev.Biol. 234(1): 261-274.
- Murray, R. K., P. Mayes, et al. (1999). "Rodwell WR (eds)." Haper's Biochemistry , 24th ed, london.

- N -

- Nakamura, K., A. Fujita, et al. (1999). "Rhopilin, a small GTPase Rho-binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of the sperm tail." FEBS Lett 445(1): 9-13.
- Nargeot, j. and P. Charnet (1994). "Diversité moléculaire des canaux calciques : du gène à la fonction." Medecine science 10: 1293-1308.
- Narisawa, S., N. B. Hecht, et al. (2002). "Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy." Mol Cell Biol 22(15): 5554-62.
- Navarro, B., Y. Kirichok, et al. (2008). "Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa." Int J Dev Biol 52(5-6): 607-13.
- Navarro, B., Y. Kirichok, et al. (2007). "KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential." Proc Natl Acad Sci U S A 104(18): 7688-92.
- Nishimura, H., C. Cho, et al. (2001). "Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta." Dev Biol 233(1): 204-13.
- Nolan, J. P. and R. H. Hammerstedt (1997). "Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm." FASEB J 11(8): 670-82.
- Novick, P. and P. Brennwald (1993). "Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic." Cell 75(4): 597-601.

- O -

- O'Toole, C. M., C. Arnoult, et al. (2000). "Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction." Mol Biol Cell 11(5): 1571-84.

- Ohzu, E. and R. Yanagimachi (1982). "Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin." J Exp Zool 224(2): 259-63.
- Okabe, M., T. Adachi, et al. (1987). "Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro." J Reprod Immunol 11(2): 91-100.
- Oko, R. (1988). "Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa." Biol Reprod 39(1): 169-82.
- Ondetti, M. A., N. J. Williams, et al. (1971). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis." Biochemistry 10(22): 4033-9.
- Ono, K., R. Yanagimachi, et al. (1982). " Phospholipase A of guinea pig spermatozoa: Preliminary characterization and possible involvement in the acrosome reaction.." Development Growth and Differentiation 24: 304-310.
- Oyler, G. A., G. A. Higgins, et al. (1989). "The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations." J Cell Biol 109(6 Pt 1): 3039-52.

- P -

- Paduch, D. A., A. Bolyakov, et al. (2009). "Reproduction in men with Klinefelter syndrome: the past, the present, and the future." Semin Reprod Med 27(2): 137-48.
- Park, J. Y., H. J. Ahn, et al. (2003). "Molecular identification of Ca²⁺ channels in human sperm." Exp Mol Med 35(4): 285-92.
- Parks, J. E., J. W. Arion, et al. (1987). "Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa." Biol Reprod 37(5): 1249-58.
- Parks, J. E. and R. H. Hammerstedt (1985). "Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane." Biol Reprod 32(3): 653-68.
- Parrington, J., K. T. Jones, et al. (1999). "The soluble sperm factor that causes Ca²⁺ release from sea-urchin (*Lytechinus pictus*) egg homogenates also triggers Ca²⁺ oscillations after injection into mouse eggs." Biochem.J. 341(Pt 1): 1-4.
- Parrington, J., M. L. Jones, et al. (2002). "Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca²⁺ release in eggs." Reproduction 123(1): 31-9.
- Parrington, J., K. Swann, et al. (1996). "Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein." Nature 379(6563): 364-368.

- Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, et al. (1988). "Capacitation of bovine sperm by heparin." Biol Reprod 38(5): 1171-80.
- Patterson, R. L., D. Boehning, et al. (2004). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators." Annu Rev Biochem 73: 437-65.
- Perez-Reyes, E. (1998). "Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels." J Bioenerg Biomembr 30(4): 313-8.
- Pfeffer, S. R. (1999). "Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs." Nat Cell Biol 1(1): E17-22.
- Pinto, F. M., C. G. Ravina, et al. (2009). "Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channels in human sperm." Reprod Biol Endocrinol 7(1): 71.
- Pollard, H. B., A. L. Burns, et al. (1988). "A molecular basis for synexin-driven, calcium-dependent membrane fusion." J Exp Biol 139: 267-86.
- Poongothai, J., T. S. Gopenath, et al. (2009). "Genetics of human male infertility." Singapore Med J 50(4): 336-47.
- Potier, M., J. C. Gonzalez, et al. (2009). "Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration." FASEB J 23(8): 2425-37.
- Potier, M. and M. Trebak (2008). "New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway." Pflugers Arch 457(2): 405-15.
- Pruzanski, W., F. C. de Beer, et al. (1995). "Serum amyloid A protein enhances the activity of secretory non-pancreatic phospholipase A2." Biochem.J. 309(Pt 2): 461-464.

- Q -

- Qi, H., M. M. Moran, et al. (2007). "All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility." Proc Natl Acad Sci U S A 104(4): 1219-23.
- Quill, T. A., D. Ren, et al. (2001). "A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa." Proc Natl Acad Sci U S A 98(22): 12527-31.

- R -

- Randriamampita, C. and R. Y. Tsien (1993). "Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx." Nature 364(6440): 809-14.

- Rejraji, D., F. Saez, et al. (2009). "Évolution de la composante lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes durant la maturation épидидymaire." andrologia 19: 17-28.
- Ren, D., B. Navarro, et al. (2001). "A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility." Nature 413(6856): 603-9.
- Reynolds, I. J., J. A. Wagner, et al. (1986). "Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by omega-conotoxin fraction GVIA." Proc Natl Acad Sci U S A 83(22): 8804-7.
- Riffo, M. and A. Nieto (1999). "Lysophosphatidylcholine induces changes in physicochemical, morphological, and functional properties of mouse zona pellucida: a possible role of phospholipase A2 in sperm-zona pellucida interaction." Mol Reprod Dev 53(1): 68-76.
- Riffo, M. S. and M. Parraga (1996). "Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine." J Exp Zool 275(6): 459-68.
- Riffo, M. S. and M. Parraga (1997). "Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine." J Exp Zool 279(1): 81-8.
- Ritta, M. N., J. C. Calamera, et al. (1998). "Occurrence of GABA and GABA receptors in human spermatozoa." Mol Hum Reprod 4(8): 769-73.
- Roldan, E. R. and C. Frago (1993). "Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa." J.Biol.Chem. 268(19): 13962-13970.
- Roldan, E. R. and T. Murase (1994). "Polyphosphoinositide-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome. Effect is not mediated by protein kinase C." J Biol Chem 269(38): 23583-9.
- Roldan, E. R. and Q. X. Shi (2007). "Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis." Front Biosci. 12: 89-104.
- Rotem, R., N. Zamir, et al. (1998). "Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis of human spermatozoa." Am J Physiol 274(2 Pt 1): E218-23.
- Roudebush, W. E. (2001). "Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function." Asian J Androl 3(2): 81-5.
- Rubinstein, E., A. Ziyat, et al. (2006). "The molecular players of sperm-egg fusion in mammals." Semin Cell Dev Biol 17(2): 254-63.

- S -

- Sakata, Y., H. Saegusa, et al. (2001). "Analysis of Ca(2+) currents in spermatocytes from mice lacking Ca(v)2.3 (alpha(1E)) Ca(2+) channel." Biochem.Biophys.Res.Comm. 288(4): 1032-1036.
- Salicioni, A. M., M. D. Platt, et al. (2007). "Signalling pathways involved in sperm capacitation." Soc.Reprod.Fertil.Suppl. 65:245-59.: 245-259.
- Santi, C. M., A. Darszon, et al. (1996). "A dihydropyridine-sensitive T-type Ca2+ current is the main Ca2+ current carrier in mouse primary spermatocytes." Am.J.Physiol. 271(5 Pt 1): C1583-C1593.
- Saunders, C. M., M. G. Larman, et al. (2002). "PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development." Development 129(15): 3533-44.
- Schaloske, R. H. and E. A. Dennis (2006). "The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system." Biochim Biophys Acta 1761(11): 1246-59.
- Schreiber, M., A. Wei, et al. (1998). "Slo3, a novel pH-sensitive K+ channel from mammalian spermatocytes." J Biol Chem 273(6): 3509-16.
- Schroeder, F., J. R. Jefferson, et al. (1991). "Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools." Proc Soc Exp Biol Med 196(3): 235-52.
- Schuh, K., E. J. Cartwright, et al. (2004). "Plasma membrane Ca2+ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility." J.Biol.Chem. 279(27): 28220-28226.
- Serrano, C. J., C. L. Trevino, et al. (1999). "Voltage-dependent Ca(2+) channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm." FEBS Lett. 462(1-2): 171-176.
- Shao, X., H. A. Tarnasky, et al. (1997). "Interactional cloning of the 84-kDa major outer dense fiber protein Odf84. Leucine zippers mediate associations of Odf84 and Odf27." J Biol Chem 272(10): 6105-13.
- Sharpe, R. M. and S. Franks (2002). "Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue." Nat Cell Biol 4 Suppl: s33-40.
- Sharpe, R. M. and N. E. Skakkebaek (1993). "Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?" Lancet 341(8857): 1392-5.
- Shefi, S., K. Kaplan, et al. (2009). "Analysis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermic and virtually azoospermic men with known testicular pathology." Reprod Biomed Online 18(4): 460-4.
- Shefi, S., J. Levron, et al. (2009). "Male infertility associated with adult dominant polycystic kidney disease: a case series." Arch Gynecol Obstet 280(3): 457-60.

- Sherins, R. J. (1995). "Are semen quality and male fertility changing?" N Engl J Med 332(5): 327-8.
- Shi, Q. X., Y. Y. Yuan, et al. (1997). "gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa." Mol Hum Reprod 3(8): 677-83.
- Shiba, K., T. Marian, et al. (2006). "Na⁺/Ca²⁺ exchanger modulates the flagellar wave pattern for the regulation of motility activation and chemotaxis in the ascidian spermatozoa." Cell Motil Cytoskeleton 63(10): 623-32.
- Shur, B. D. (1991). "Cell surface beta 1,4 galactosyltransferase: twenty years later." Glycobiology 1(6): 563-75.
- Si, Y. and P. Olds-Clarke (2000). "Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation." Biol Reprod 62(5): 1231-9.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol 1(1): 31-9.
- Simons, K. and W. L. Vaz (2004). "Model systems, lipid rafts, and cell membranes." Annu Rev Biophys Biomol Struct 33: 269-95.
- Sinclair, M. L., X. Y. Wang, et al. (2000). "Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells." Mol Reprod Dev 56(1): 6-11.
- Singh, K., S. K. Singh, et al. (2005). "Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population." Int J Androl 28(2): 115-9.
- Singleton, C. L. and G. J. Killian (1983). "A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro." J Androl 4(2): 150-6.
- Smith, S. C. and G. C. England (2001). "Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis." J Reprod Fertil Suppl 57: 151-9.
- Sokol, R. Z., P. Kraft, et al. (2006). "Exposure to environmental ozone alters semen quality." Environ Health Perspect 114(3): 360-5.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, et al. (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature 362(6418): 318-24.
- Stambouliau, S., D. Kim, et al. (2004). "Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells." J Cell Physiol 200(1): 116-24.

- Stambouliau, S., M. D. Waard, et al. (2002). "Functional Interaction between Mouse Spermatogenic LVA and Thapsigargin-Modulated Calcium Channels." Dev.Biol. 252(1): 72-83.
- Stein, K. K., J. C. Go, et al. (2006). "Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions." Proteomics 6(12): 3533-43.
- Stein, K. K., P. Primakoff, et al. (2004). "Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane." J Cell Sci 117(Pt 26): 6269-74.
- Stojanoff, A., H. Bourne, et al. (1988). "Phospholipid composition of isolated guinea pig sperm outer acrosomal membrane and plasma membrane during capacitation in vitro." Gamete Res 21(3): 297-311.
- Suarez, S. S. (1987). "Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ." Biol Reprod 36(1): 203-10.
- Suarez, S. S. and R. A. Osman (1987). "Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract." Biol Reprod 36(5): 1191-8.
- Suarez, S. S., L. Vincenti, et al. (1987). "Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible." J Exp Zool 244(2): 331-6.
- Sudhof, T. C. and J. E. Rothman (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins." Science 323(5913): 474-7.
- Sutton, K. A., M. K. Jungnickel, et al. (2004). "Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm." Dev.Biol. 274(2): 426-435.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, et al. (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." Nature 395(6700): 347-53.

- T -

- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev 81(1): 153-208.
- Tash, J. S. and A. R. Means (1987). "Ca²⁺ regulation of sperm axonemal motility." Methods Enzymol 139: 808-23.
- Thaler, C. D. and R. A. Cardullo (1996). "The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event." J Biol Chem 271(38): 23289-97.
- Therien, I., D. Bousquet, et al. (2001). "Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation." Biol Reprod 65(1): 41-51.
- Tomes, C. N. (2007). "Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis." Soc Reprod Fertil Suppl 65: 275-91.

- Tomes, C. N., C. R. McMaster, et al. (1996). "Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation." Mol Reprod Dev 43(2): 196-204.
- Tomes, C. N., M. Michaut, et al. (2002). "SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction." Dev Biol 243(2): 326-38.
- Travis, A. J. and G. S. Kopf (2002). "The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa." J Clin Invest 110(6): 731-6.
- Trevino, C. L., R. Felix, et al. (2004). "Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm." FEBS Lett. 563(1-3): 87-92.
- Trevino, C. L., C. M. Santi, et al. (1998). "Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications." Zygote. 6(2): 159-172.
- Trimble, W. S., D. M. Cowan, et al. (1988). "VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein." Proc Natl Acad Sci U S A 85(12): 4538-42.
- Tsai, J. Y. and L. M. Silver (1996). "Sperm-egg binding protein or proto-oncogene?" Science 271(5254): 1432-4; author reply 1434-5.
- Tsien, R. W., P. T. Ellinor, et al. (1991). "Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels." Trends Pharmacol Sci 12(9): 349-54.
- Tulsiani, D. R., M. D. Skudlarek, et al. (1989). "Novel alpha-D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm-egg interactions." J Cell Biol 109(3): 1257-67.
- Turner, R. M. (2003). "Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?" J Androl 24(6): 790-803.
- Turner, R. M. (2006). "Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation." Reprod Fertil Dev 18(1-2): 25-38.
- Upreti, G. C., E. L. Hall, et al. (1999). "Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen." Anim Reprod.Sci. 56(2): 107-121.

- V -

- Vadnais, M. L., H. L. Galantino-Homer, et al. (2007). "Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation." Arch Androl 53(3): 109-23.

- Vadnais, M. L., R. N. Kirkwood, et al. (2005). "Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining." Anim Reprod Sci 90(3-4): 347-54.
- Vadnais, M. L., R. N. Kirkwood, et al. (2005). "Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay." Anim Reprod Sci 87(1-2): 121-32.
- Valentin, E., F. Ghomashchi, et al. (1999). "On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes." J.Biol.Chem. 274(44): 31195-31202.
- Valentin, E. and G. Lambeau (2000). "What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)?" Biochimie. 82(9-10): 815-831.
- van Gestel, R. A., I. A. Brewis, et al. (2005). "Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells." Mol Hum Reprod 11(8): 583-90.
- Vaughan, K. T., A. Mikami, et al. (1996). "Multiple mouse chromosomal loci for dynein-based motility." Genomics 36(1): 29-38.
- Vazquez, J. M. and E. R. Roldan (1997). "Diacylglycerol species as messengers and substrates for phosphatidylcholine re-synthesis during Ca²⁺-dependent exocytosis in boar spermatozoa." Mol Reprod Dev 48(1): 95-105.
- Visconti, P. E. (2009). "Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design." Proc Natl Acad Sci U S A 106(3): 667-8.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, et al. (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." Development 121(4): 1129-37.
- Visconti, P. E., H. Galantino-Homer, et al. (1999). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation." J Biol Chem 274(5): 3235-42.
- Visconti, P. E., L. R. Johnson, et al. (1997). "Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation." Dev Biol 192(2): 351-63.
- Visconti, P. E., G. D. Moore, et al. (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway." Development 121(4): 1139-50.
- Visconti, P. E., J. P. Muschietti, et al. (1990). "Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa." Biochim Biophys Acta 1054(2): 231-6.

Visconti, P. E., X. Ning, et al. (1999). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation." Dev Biol 214(2): 429-43.

Visconti, P. E., V. A. Westbrook, et al. (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." J Reprod Immunol 53(1-2): 133-50.

- W -

Walch-Solimena, C., J. Blasi, et al. (1995). "The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling." J Cell Biol 128(4): 637-45.

Walensky, L. D. and S. H. Snyder (1995). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm." J.Cell Biol. 130(4): 857-869.

Wang, H., J. Liu, et al. (2009). "A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein." Biol Reprod 81(3): 539-44.

Wang, X. F., C. X. Zhou, et al. (2003). "Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm." Nat Cell Biol 5(10): 902-6.

Wassarman, P. M. (1990). "Profile of a mammalian sperm receptor." Development 108(1): 1-17.

Wassarman, P. M. (1999). "Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion." Cell 96(2): 175-83.

Wassarman, P. M. (1999). "The Parkes Lecture. Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization." J Reprod Fertil 116(2): 211-6.

Wassarman, P. M. and E. S. Litscher (2008). "Mammalian fertilization is dependent on multiple membrane fusion events." Methods Mol Biol 475: 99-113.

Wassarman, P. M. and S. Mortillo (1991). "Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida." Int Rev Cytol 130: 85-110.

Waters, M. G. and F. M. Hughson (2000). "Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways." Traffic 1(8): 588-97.

Weimbs, T., S. H. Low, et al. (2003). "SNAREs and epithelial cells." Methods 30(3): 191-7.

Wennemuth, G., R. E. Westenbroek, et al. (2000). "CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm." J.Biol.Chem. 275(28): 21210-21217.

- Westenbroek, R. E. and D. F. Babcock (1999). "Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel $\alpha 1$ subunits in sperm." Dev.Biol. 207(2): 457-469.
- Whiteheart, S. W., I. C. Griff, et al. (1993). "SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform." Nature 362(6418): 353-5.
- Wiesner, B., J. Weiner, et al. (1998). "Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm." J Cell Biol 142(2): 473-84.
- Wistrom, C. A. and S. Meizel (1993). "Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction." Dev Biol 159(2): 679-90.
- Wu, C., T. Stojanov, et al. (2001). "Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa." J.Biol.Chem. 276(29): 26962-26968.
- Wu, J. Y., T. J. Ribar, et al. (2000). "Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4." Nat Genet 25(4): 448-52.

- X -

- Xia, J., D. Reigada, et al. (2007). "CATSPER channel-mediated Ca^{2+} entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation." Biol Reprod 77(3): 551-9.

- Y -

- Yamamoto, R., H. A. Yanagisawa, et al. (2006). "A novel subunit of axonemal dynein conserved among lower and higher eukaryotes." FEBS Lett 580(27): 6357-60.
- Yanagimachi, R. (1994). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity." Zygote 2(4): 371-2.
- Yang, P., D. R. Diener, et al. (2001). "Localization of calmodulin and dynein light chain LC8 in flagellar radial spokes." J Cell Biol 153(6): 1315-26.
- Yao, Y., A. V. Ferrer-Montiel, et al. (1999). "Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger." Cell 98(4): 475-85.
- Yeung, C. H., J. P. Barfield, et al. (2005). "Chloride channels in physiological volume regulation of human spermatozoa." Biol Reprod 73(5): 1057-63.
- Yoon, S. Y., T. Jellerette, et al. (2008). "Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development." J Clin Invest 118(11): 3671-81.

- Z -

- Zeng, Y., E. N. Clark, et al. (1995). "Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion." Dev.Biol. 171(2): 554-563.
- Zeng, Y., J. A. Oberdorf, et al. (1996). "pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-), and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation." Dev Biol 173(2): 510-20.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol 2(2): 107-17.
- Zhao, C., J. T. Slevin, et al. (2007). "Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs." FEBS Lett 581(11): 2140-9.

***Des sPLA2 de venins de serpents à leurs homologues de Mammifères:
Rôles de ces enzymes dans la fécondation.***

La baisse de la fertilité masculine mondiale ces dernières décennies est devenue préoccupante. Ainsi, un homme sur quinze est subfertile. Si les causes de la baisse de la fertilité semblent être essentiellement liées à l'environnement et au mode de vie, il est essentiel de comprendre tous les mécanismes qui régulent le pouvoir fécondant du spermatozoïde afin d'optimiser les techniques de procréation médicalement assistée. Le développement de nouveaux axes de recherche, expérimentaux et théoriques, pour identifier les mécanismes sous-jacents de l'infertilité masculine est indispensable. C'est dans ce contexte, de développement de nouvelles stratégies expérimentales que se situe ce travail de thèse. La stratégie que j'ai employée ici est la recherche de nouveaux outils pharmacologiques à partir de venin d'animaux par des tests d'activités biologiques. Cette recherche nous a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de régulation de la physiologie spermatique : la voie des phospholipases A2 secrétées. Ainsi, nous avons montré pour la première fois que les phospholipases A₂ secrétées, régulent 4 étapes clé de la fécondation : la capacitation, la mobilité spermatique, la réaction acrosomique et l'interaction gamétique.

Mots clefs : Spermatozoïde - réaction acrosomique - mobilité spermatique - fécondation *in vitro* - phospholipases A2 – fertilité – capacitation

From SPLA2 of snake venoms to their mammal homologues: Roles of these enzymes in mouse fertilization

The fall of the world male fertility these last decades became alarming. Thus, a man on fifteen is subfertile. If the causes of the fall of fertility seem to be mainly related on the environment and the lifestyle, it is essential to understand all the mechanisms which control the fertilizing ability of spermatozoon in order to optimize the techniques of procreation medically assisted. The development of new research orientations, experimental and theoretical, to identify the subjacent mechanisms of male infertility is essential. In this context, development of new experimental strategies that is situated this work of thesis. The strategy that I employed here is research new pharmacological tools starting from venom of animals by tests of biological activities. This research allowed us to discover a new regulatory pathway of sperm physiology involving secreted phospholipases A2. Thus, we showed for the first time that secreted phospholipases A2 regulate four key events of sperm physiology: Capacitation Acrosome reaction, sperm motility and gamete interaction.

Key words : Spermatozoa - acrosome reaction- sperm motility - *in vitro* fertilization- phospholipase A₂- fertility - capacitation