



HAL
open science

**Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires et
developpement d'outils pour le contrôle de la fertilité de
différents mammifères ; Equus caballus, Bos taurus,
Arvicola terrestris Scherman**

Elise Grignard

► **To cite this version:**

Elise Grignard. Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires et developpement d'outils pour le contrôle de la fertilité de différents mammifères ; Equus caballus, Bos taurus, Arvicola terrestris Scherman. Biologie de la reproduction. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2005. Français. NNT : 2005CLF21591 . tel-00677284

HAL Id: tel-00677284

<https://theses.hal.science/tel-00677284v1>

Submitted on 7 Mar 2012

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 Blaise Pascal

N° D.U.

Université d'Auvergne

Année 2005

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

N° d'ordre

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Biologie de la Reproduction)

Soutenue le 07 Octobre 2005

Elise GRIGNARD

Analyse de protéines spermatiques post-testiculaires, et développement d'outils pour le contrôle de la fertilité de différents mammifères ; *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Arvicola terrestris* Scherman

Jury :

Mme Aïda Abou-Haila
M. Franck Boué (rapporteur)
M. Joël Drevet
Mme Catherine Finaz
M. Michel Pascal (rapporteur)
M. Patrick Vernet

Laboratoire Epididyme et Maturation des Gamètes
UMR-CNRS 6547 Université Blaise Pascal

J'exprime toute ma reconnaissance à M. Frank Boué, ainsi qu'à M. Michel Pascal pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Mme Aïda Abou-Haila et Mme Catherine Finaz pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je souhaite remercier le Conseil Régional d'Auvergne et le Conseil Général du Puy de Dôme, ainsi que le Ministère de l'Agriculture pour avoir soutenu financièrement ce projet.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements à la Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt (DRAF), et plus particulièrement le Service Régional de la Protection des Végétaux (SRPV : M. Didelot, M. Allèx) sans qui ce projet n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie le Parc Naturel Régional des Volcans d'Auvergne (Mme Pradel) coordonnant le programme régional de recherche et développement sur le campagnol terrestre, et le programme d'Impact du Campagnol TERrestre sur le Massif central (ICATERM), d'avoir bien voulu nous faire part de leurs connaissances et de leurs avancées dans la lutte contre le campagnol terrestre.

Je tiens enfin à remercier pour leur soutien financier autant que technique la Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles du Puy de Dôme (FREDON : M. J. Plane, Mme Martins, M. A. Plane), la Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Ennemis des Cultures de Haute-Loire (FDGDEC : M. Perret), et la Fédération Nationale des Groupements de Protection des Cultures (FNGPC : M. Landureau).

Je souhaite enfin remercier Christophe Chabalier de la Chambre d'Agriculture du Cantal sans qui je n'aurais jamais capturé de campagnols, ainsi que Priscilla Note de l'École Nationale des Ingénieurs des Travaux Agricoles (ENITA) pour ses précieux renseignements.

Je tiens à remercier Joël Drevet de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et de m'avoir permis de développer mon goût pour le travail de recherche.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire pour leur aide et leur soutien : Aurore, Eléonore, Fabrice, Françoise, Rémi, et Ting, ainsi que ceux qui sont partis sous d'autres cieux : Ayhan, Eric, Hanae, et Jean-Marie.

Je voudrais encore remercier Patrick Vernet pour son soutien et son aide en toutes circonstances, et tout au long des années. Sans aucun doute, je n'en serai pas là aujourd'hui sans lui.

Enfin, je souhaiterais dédier ce travail à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans mes choix.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
RESUME	4
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1 LA MATURATION EPIDIDYMAIRE	9
1.1 L'EPIDIDYME.....	9
1.1.1 Généralités sur l'épididyme	9
1.1.2 Différents types cellulaires de l'épithélium épидидymaire	10
1.1.2.1 Les cellules principales	10
1.1.2.2 Les cellules apicales	11
1.1.2.3 Les cellules claires	11
1.1.2.4 Les cellules en halo	11
1.1.2.5 Les cellules basales	12
1.2 LES MODIFICATIONS DU SPERMATOZOÏDE AU COURS DU TRANSIT EPIDIDYMAIRE.....	12
1.2.1 Les modifications lipidiques.....	12
1.2.2 Condensation de la chromatine.....	13
1.2.3 Régulation du volume du spermatozoïde et contrôle de l'osmolarité	14
1.2.4 Modifications de l'acrosome	17
1.2.5 Modifications des protéines et maturation épидидymaire	18
1.2.5.1 La sécrétion protéique épидидymaire	18
1.2.5.2 Modifications glucidiques des protéines	20
1.2.5.3 Quelques exemples de comportements de protéines au cours du transit épидидymaire	21
1.2.5.3.1 Déplacement d'une protéine dans la membrane plasmique ; PH-20	21
1.2.5.3.2 Acquisition de protéines au cours du transit épидидymaire ; P26h.....	22
1.2.5.3.3 Modification de la localisation d'une protéine associée à la régulation d'une fonction épидидymaire ; V-ATPase et maintien du pH intraluminal.....	23
1.2.5.3.4 Protéines intervenant dans la motilité spermatique	24
2 PROTECTION ANTIOXYDANTE DU SPERMATOZOÏDE	26
2.1 PROTECTION ANTI-OXYDANTE AU COURS DU TRANSIT EPIDIDYMAIRE.....	26
2.2 PROTECTION ANTIOXYDANTE ET CONSERVATION DU SPERME	30
2.2.1 Effets du stress oxydant sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryoconservés	30
2.2.2 Effets des antioxydants sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryoconservés	30
3 L'IMMUNOCONTRACEPTION	32
3.1 LES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS CONTRACEPTIFS	32
3.1.1 Les vaccins anti-hormones	32
❖ L'hCG	33
❖ Le GnRH.....	33
❖ La FSH	34
3.1.2 Les vaccins dirigés contre la zone pellucide	35
3.1.3 Protéines spermatiques et immunocontraception.....	37
❖ FA-1	37
❖ LDH-C4	37
❖ P26h	38
❖ DE	38
3.2 INDUCTION DE L'IMMUNOCONTRACEPTION	39

Sommaire

4	CONTEXTE DES ETUDES.....	43
4.1	LA CRYOCONSERVATION DU SPERME CHEZ DES ESPECES D'INTERET AGRONOMIQUE.....	43
4.2	IMMUNOCONTRACEPTION D'UN RONGEUR SAUVAGE; ARVICOLA TERRESTRIS SCHERMAN.....	43
4.2.1	<i>Le campagnol terrestre Arvicola terrestris Scherman</i>	43
4.2.1.1	Biologie du campagnol terrestre.....	43
4.2.1.2	Dégâts et incidences économiques du campagnol terrestre.....	44
4.2.1.3	Les moyens de lutte.....	45

MATERIEL ET METHODES.....47

1	ANIMAUX ET TISSUS	47
1.1	CHEVAL-TAUREAU	47
1.2	CAMPAGNOLS TERRESTRES.....	47
2	PRODUCTION D'ANTICORPS	47
2.1	ANTICORPS ANTI-GPX5 INTERSPECIFIQUES.....	47
2.2	ANTICORPS DIRIGES CONTRE LES PROTEINES SPERMATIQUES D'ARVICOLA TERRESTRIS SCHERMAN..	48
2.3	PRODUCTION D'ANTICORPS DANS LE TRACTUS GENITAL DE SOURIS	48
3	DEGLYCOSYLATIONS PROTEIQUES.....	49
3.1	O-DEGLYCOSYLATION	49
3.2	TRIPLE DEGLYCOSYLATION	49
4	ELECTROPHORESES PROTEIQUES	49
4.1	ELECTROPHORESE MONO-DIMENSIONNELLE.....	49
4.1.1	<i>A partir de protéines épидидymaires ou testiculaires</i>	49
4.1.2	<i>A partir de protéines spermatisques</i>	49
4.2	ELECTROPHORESE BI-DIMENSIONNELLE	50
5	WESTERN BLOT	51
6	MALDI-TOF.....	51
7	EXTRACTION D'ARN ET NORTHERN BLOT	52
8	RT-PCR, RACE.....	52
9	SOUS-CLONAGE ET SEQUENÇAGE	53
10	IMMUNOHISTOCHIMIE.....	53
11	IMMUNOFLUORESCENCE	54
12	TEST D'IMMUNISATION DES SOURIS.....	54

RESULTATS.....55

1	CARACTERISATION DE LA GLUTATHION PEROXYDASE 5 (GPX5) CHEZ DEUX ESPECES D'INTERET AGRONOMIQUE ; LE TAUREAU ET L'ETALON	55
1.1	GENERATION D'ANTICORPS ANTI-GPX5 INTERSPECIFIQUES	55
1.2	OBTENTION DES SEQUENCES ADN DE GPX5 SPECIFIQUES DE CES DEUX ESPECES	55
1.3	LOCALISATION TISSULAIRE.....	56
2	RECHERCHE D'ANTIGENES SPERMATIQUES POUR LA MISE AU POINT D'UN VACCIN CONTRACEPTIF POUR ARVICOLA TERRESTRIS SCHERMAN	58
2.1	OBTENTION DES ANIMAUX.....	58
2.2	ETUDE SANS A PRIORI	58
2.2.1	<i>Obtention d'anticorps dirigés contre des protéines spermatisques d'Arvicola terrestris</i>	59
2.2.2	<i>Recherche d'antigènes spermatisques</i>	60
2.2.2.1	<i>Identification des protéines</i>	60

Sommaire

2.2.2.2	Obtention des ADNc correspondant aux cibles choisies	63
2.3	ETUDE AVEC A PRIORI.....	64
2.3.1	Choix des cibles.....	64
2.3.2	Obtention des ADNc.....	64
2.3.3	Immunolocalisation de GPX5	64
2.4	PRODUCTION D'ANTICORPS DANS LE TRACTUS GENITAL DE SOURIS	65
DISCUSSION.....		68
1	ETUDE DE LA GLUTATHION PEROXYDASE 5 CHEZ LE TAUREAU ET L'ETALON	68
2	RECHERCHE D'ANTIGENES SPERMATIQUES POUR L'IMMUNOCONTRACEPTION DU CAMPAGNOL TERRESTRE <i>ARVICOLA TERRESTRIS</i> SCHERMAN.....	74
PERSPECTIVES.....		83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		84
ANNEXE.....		99

RESUME

Ce travail a consisté en l'étude de protéines de spermatozoïdes matures de différentes espèces, avec l'objectif de contrôler leur pouvoir fécondant.

Dans un premier temps une protéine antioxydante spécifique du tractus génital mâle, et acquise au cours de la maturation épидидymaire, la glutathion peroxydase 5 (GPX5), a été étudiée dans deux espèces d'intérêt agronomique : l'étalon et le taureau. Les semences de ces animaux sont fréquemment conservées pour des inséminations artificielles. Or lors de la conservation, les spermatozoïdes subissent entre autres un stress oxydant. L'ajout de cette protéine antioxydante dans le milieu de conservation pourrait limiter les dommages subis par les spermatozoïdes. Les séquences nucléiques spécifiques de cette protéine dans chaque espèce ont été obtenues. Les ARNm ont ensuite été localisés dans les canaux efférents et la tête épидидymaire équine, ainsi que dans la tête et le corps de l'épididyme bovin. Par ailleurs, la protéine bovine a été localisée dans la tête et le corps épидидymaire.

La seconde partie de ce travail a consisté à analyser des antigènes spermatiques spécifiques d'un rongeur fouisseur, le campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman dans le but de les utiliser pour une immunocontraception de cet animal nuisible. La détermination de protéines spermatiques susceptibles d'être immunogènes a été entreprise. Des peptides spécifiques de ces différentes protéines ont été sélectionnés. Par ailleurs, les voies d'immunisation de ce rongeur par les peptides choisis ont été étudiées. Les voies nasale et gastrique correspondent aux critères d'efficacité pour cibler la production d'anticorps au niveau du tractus génital, et de voies utilisables pour un rongeur fouisseur.

Mots clés : épидидyme, fertilité, immunocontraception, spectrométrie de masse

During this work, I studied proteins of matures spermatozoa from different species, with the aim to control their fertility.

In a first part, an antioxidant protein, specific of the male genital tract, and acquired during epididymal maturation, the glutathione peroxidase 5 (GPX5) was studied in two species of agricultural interest: stallion and bull. Semen of these animals are commonly preserved for artificial insemination procedures. During preservation, spermatozoa are submitted to various stresses (physical, mechanical, oxidative...) resulting in oxidative attacks of the sperm cells. The addition of the GPX5 antioxidant protein in media used for cryopreservation of semen could limit oxidative damages to spermatozoa. Specific nucleic sequences of this protein for each species were obtained. Messengers RNA were then localized in the efferent ducts and caput epididymis in the stallion, and in the caput and corpus of bovine epididymis. The bovine protein was localized in the caput and corpus epididymides.

The second part of this work consisted in the selection of specific sperm antigens of a fossorial rodent, the water vole *Arvicola terrestris* Scherman, to use them in an immunocontraceptive approach of this pest. The determination of sperm proteins epitopes was initiated. Specific peptides for these proteins were selected. In parallel, immunisation routes were studied. Our study shows that nasal and gastric routes allow the production of antibodies in the genital tract in mouse.

Key words: epididymis, fertility, immunocontraception, mass spectrometry

ABBREVIATIONS

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm: Acide RiboNucléique messenger
ATPase : Adénosine TriPhosphate Synthase
BHT : butylated hydroxytoluene
BSA : Bovine Serum Albumin
CD52: Cluster of Differentiation 52
CG: Chorionic Gonadotrophin
CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio]-1-propane sulfonate
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CRES : Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic
CTB : Cholera Toxin B sub-unit
DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole
DTT : DiThioTreitol
ECL : Enhanced ChemiLuminescence
EDTA : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
ENITA : Ecole nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles
EOR : Espèces Oxygénées Réactives
EST : Expressed Sequence Tag
FA-1: Fertilization Antigen 1
FNLON : Fédération Nationale de Lutte contre les Organismes Nuisibles
FREDON : Fédération REgionale de Défense contre les Organismes Nuisibles
FSH: Folliculo Stimulating Hormon
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormon
GPI: GlycosylPhosphatidyInositol
GPX : Glutathion Peroxydase
GSH : forme réduite du glutathion
GSSG : forme oxydée du glutathion
GST : Glutathion S-Transférase
hCG : human Chorionic Gonadotrophin
IEF : IsoElectroFocalisation
IgA : immunoglobuline de type A

Abréviations

IgG : immunoglobuline de type G

IL-12 : InterLeukine 12

ISCOM : ImmunoStimulating COMplex

KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin

KO : Knock Out

LDH: Lactate DésHydrogénase

LH: Luteinizing Hormon

m/v : masse/ volume

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight

MALT : Mucosae Associated Lymphoïd Tissue

mEP17:cf.yeung et al 2002

MVDP/AKR1-B7: Mouse Vas Deferens Protein/Aldo-Keto Reductase 1-B7)

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite)

PBS : Phosphate Buffer Salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGS : Prostaglandine D2 Synthase

pI : point isoélectrique

SB3-10 : N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SOD : SuperOxyde Dismutase

TBP : TriButyl Phosphate

TBS : Tris Buffer Salin

Tris : tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

TRITC : tetramethylrhodamine isothiocyanate

v/v : volume/ volume

VS : vésicules séminales

ZP: Zone Pellucide

INTRODUCTION

Introduction

Lorsque les spermatozoïdes sortent du testicule (organe où ils sont formés), ils ne sont pas matures, c'est-à-dire inaptes à la fécondation. Leur pouvoir fécondant est acquis durant leur transit dans l'épididyme, au cours d'un processus appelé maturation épидидymaire. Dans l'épididyme, les spermatozoïdes subissent un nombre important de modifications qui touchent aussi bien leur composition lipidique que glucidique, ou protéique. Ce sont ces modifications qui vont permettre au spermatozoïde d'acquies deux fonctions indispensables à son pouvoir fécondant : la motilité, et la capacité à reconnaître et à lier l'ovocyte.

Ces processus de maturation aboutissant à un spermatozoïde fécondant sont très complexes. Ils se déroulent progressivement tout au long du canal épидидymaire. Parmi les modifications de la composition lipidique, on peut observer des transitions de lipides d'un feuillet à l'autre de la membrane, ou des changements dans les rapports entre classes de lipides. Les résidus glucidiques sont aussi modifiés. En effet, les glycolipides et glycoprotéines de la membrane plasmique voient la composition de leurs extensions sucrées modifiée. Ces changements peuvent démasquer certains glucides, en éliminer, ou en ajouter. Les protéines elles aussi sont soumises à de nombreux changements au cours de la maturation spermatique épидидymaire. Certaines d'entre elles sont détachées du spermatozoïde, alors que d'autres sont ajoutées, d'autres encore sont clivées par des coupures protéolytiques spécifiques. Par ailleurs certaines protéines se déplacent dans la membrane plasmique, ou peuvent passer du cytoplasme à la membrane. D'un point de vue biochimique, ce sont principalement les modifications de composition protéique qui permettent de différencier un spermatozoïde mature d'un spermatozoïde immature.

Tous ces événements aboutissant à un spermatozoïde mature sont indispensables au phénomène de reproduction. Ainsi, un dysfonctionnement dans les processus de maturation peut être à l'origine d'une infertilité mâle. C'est pourquoi la connaissance précise des phénomènes qui se déroulent dans l'épididyme est importante pour comprendre certaines causes d'infertilité d'origine post-testiculaire. En effet, la compréhension de ces événements pourrait permettre d'intervenir sur la fertilité, pour la faciliter ou la contrôler.

Concernant la lutte contre l'infertilité humaine mâle d'origine post-testiculaire, deux solutions peuvent être envisagées : soit une action directe contrecarrant ces dysfonctionnements et permettant à un homme de redevenir fertile, soit une utilisation plus indirecte avec le développement d'outils améliorant les techniques de procréation médicalement assistée.

Parmi les techniques de l'aide médicale à la procréation se trouve la congélation du sperme. Cette technique est aussi très développée chez certains animaux d'intérêts agronomiques. Or

Introduction

si pour l'homme, les procédures de congélation et de réchauffement sont standardisées, elles le sont moins pour les animaux. Mais quelles que soient l'espèce et la procédure utilisée, le sperme congelé a un pouvoir fécondant plus faible que le sperme frais. C'est pourquoi, là encore, la connaissance des phénomènes de maturation du spermatozoïde peut être utile. En effet, tout au long de la maturation épидидymaire, le maintien de l'intégrité du spermatozoïde et sa protection sont primordiaux. Ces deux enjeux se retrouvent dans les techniques de cryoconservation, car ce sont les atteintes subies par les spermatozoïdes au cours de ces procédures qui diminuent leur pouvoir fécondant. Dans cette approche, les spermatozoïdes sont soumis à différents stress, dont le stress oxydant, qui attaquent entre autres les lipides membranaires. En effet, la membrane plasmique des spermatozoïdes est riche en acides gras polyinsaturés, ce qui les rend particulièrement sensibles aux attaques radicalaires. Le développement d'outils permettant de réduire ce stress oxydant au cours de la congélation et du réchauffement du sperme pourrait être utile à l'amélioration du taux de fertilité obtenu avec du sperme congelé.

Dans une autre perspective, la connaissance des événements de la maturation épидидymaire peut être utilisée dans le contrôle de la fertilité de certaines espèces. Dans cet objectif, des vaccins contraceptifs ciblant des antigènes spermatiques ont été réalisés. Le développement de ces vaccins anti-spermatozoïdes provient de l'observation de la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes dans les sécrétions génitales d'hommes et de femmes infertiles.

Ce type de vaccin présente l'avantage de ne pas perturber les fonctions hormonales. Par ailleurs, le fait de cibler des protéines acquises, ou modifiées lors de la maturation épидидymaire évite de perturber la fonction testiculaire. Ces deux points sont importants pour la réversibilité des vaccins, ainsi que pour éviter de modifier le comportement des animaux ciblés par le vaccin.

Par ailleurs, le fait de travailler sur des antigènes spermatiques permet de cibler les mâles comme les femelles. En effet, le système immunitaire des femelles reconnaîtra ces protéines spermatiques comme étrangères. L'organisme mâle répondra de la même façon. En effet, il existe une barrière hémato-testiculaire/épидидymaire qui masque les spermatozoïdes (et leurs antigènes) vis-à-vis du système immunitaire.

Ces différents points de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes, et certaines applications qui en découlent seront abordés tout au long de ce manuscrit.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

1 La maturation épидидymaire

Les gamètes mâles (cellules hautement différenciées) sont formés dans le testicule à partir de cellules souches (spermatogonies). Cependant à leur sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas aptes à la fécondation. Ils n'ont pas la capacité de se déplacer, ni de reconnaître la zone pellucide ou de se lier à la membrane plasmique ovocytaire. Ces différentes fonctions sont progressivement acquises au cours du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme. Ce processus est appelé maturation épидидymaire.

1.1 L'épididyme

1.1.1 Généralités sur l'épididyme

L'épididyme est un long canal contourné (à titre d'exemple, 5m chez l'homme, 80m chez l'étalon) accolé à la face postérieure du testicule, reliant les canaux efférents au canal déférent (fig.1). Il est divisé en trois régions anatomiques et fonctionnelles (fig.2) : la tête (faisant suite aux canaux efférents), le corps, et la queue (précédant le canal déférent). Plus précisément, chez la souris, la tête de l'épididyme est constituée de cinq segments, qui diffèrent dans la hauteur de l'épithélium, la position du noyau dans les cellules, les caractéristiques cytologiques et histochimiques des cellules apicales et principales, ainsi que par la concentration de spermatozoïdes dans la lumière du canal (Abou-Haila and Fain-Maurel, 1984). Le corps et la queue peuvent être respectivement subdivisés en deux et trois segments (Johnston et al., 2005). L'étude transcriptionnelle globale de ces dix segments a permis de mettre en évidence qu'ils sont quasiment tous indépendants du point de vue de la synthèse de messagers. En effet, transcriptionnellement, l'épididyme peut être divisé en six segments, I, II, III, IV-VI, VII, VIII-X (Johnston et al., 2005).

L'épididyme joue plusieurs rôles essentiels pour la fertilité mâle. Il est impliqué dans le transport, la concentration, la maturation et le stockage des spermatozoïdes. Alors que la tête et le corps épидидymaires sont responsables de la maturation spermatique, la queue est plus impliquée dans le stockage assurant qu'un nombre suffisant de gamètes soit présent à chaque éjaculation. Chez l'homme, les spermatozoïdes éjaculés peuvent survivre 12 à 24h, alors qu'ils sont viables pendant 10 jours dans la queue épидидymaire.

Quand l'ADN commence à se condenser, dans les spermatides longues, la transcription diminue puis s'arrête (Dadoune et al., 2004). Ainsi, le spermatozoïde à lot chromosomique haploïde, et dont l'ADN est fortement condensé est une cellule transcriptionnellement silencieuse. Lors du transit épидидymaire, c'est donc l'environnement spécifique du spermatozoïde qui jouera un rôle essentiel dans le contrôle et l'induction des modifications spermatiques.

La composition du fluide épидидymaire entourant les spermatozoïdes est constamment et progressivement modifiée tout au long de l'organe. Il contient des composés à des concentrations inhabituelles, dont certains ne sont pas retrouvés dans d'autres fluides corporels (Dacheux and Dacheux, 2002). Cette spécificité est maintenue par des sécrétions et des réabsorptions actives dans les tubes séminifères et l'épididyme, mais aussi grâce à des échanges restreints avec le sang et par la présence d'une barrière hémato-testiculaire/épидидymaire. Cette barrière est formée par des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli dans le testicule (Pelletier and Byers, 1992), et entre les cellules épithéliales principales épидидymaires (Hoffer and Hinton, 1984). Elle isole ainsi les spermatozoïdes du milieu intérieur.

1.1.2 Différents types cellulaires de l'épithélium épидидymaire

Différents types cellulaires constituent l'épithélium épидидymaire. Certaines cellules sont retrouvées sur toute la longueur du canal, alors que d'autres sont plus spécifiques d'une région. Les types cellulaires retrouvés dans l'épithélium épидидymaire sont : les cellules principales, les cellules apicales, les cellules claires, les cellules en halo, et les cellules basales (fig.3).

1.1.2.1 Les cellules principales

Ce sont les cellules les plus représentées au niveau de l'épithélium épидидymaire. Ces cellules sont retrouvées dans la totalité du canal, mais présentent des différences de structure selon la région épидидymaire (Herms and Robaire, 2002). Ces cellules présentent un noyau basal, ainsi que des stéréocils qui diminuent en longueur entre la tête et la queue épидидymaire. De plus, la hauteur des cellules diminue, alors que leur largeur augmente, tout au long du canal.

Selon la région étudiée, les cellules principales représentent 65 à 80% des cellules épithéliales épидидymaires. Leur structure et leurs fonctions varient de façon très importante entre les différentes régions épидидymaires. Ce sont des cellules prismatiques, très actives quant au

transport et à la sécrétion de petites molécules organiques, à la synthèse et à la sécrétion de protéines, et à l'absorption du fluide et de particules (Robaire and Viger, 1995). Ces cellules ne se divisent pas chez l'adulte (Hermo and Robaire, 2002).

1.1.2.2 Les cellules apicales

Elles sont retrouvées principalement dans la tête épидидymaire. Ces cellules ont un noyau sphérique en position apicale, et n'entrent pas en contact avec la membrane basale. Leur cytoplasme est très riche en mitochondries (Martinez-Garcia et al., 1995). Elles sont capables d'endocytose (Hermo and Robaire, 2002), et interviendraient dans l'acidification du fluide épидидymaire (Martinez-Garcia et al., 1995).

1.1.2.3 Les cellules claires

Les cellules claires sont des cellules larges. Elles contiennent des vésicules de tailles diverses dans leur région apicale (dont des puits recouverts), des lysosomes dans leur région moyenne, et des gouttelettes lipidiques dans leur partie basale (Robaire and Viger, 1995). Cette distribution d'organites est cohérente avec une fonction d'élimination active de matériel depuis la lumière épидидymaire. En effet, elles présentent une forte capacité d'endocytose (Robaire and Viger, 1995). De plus à l'instar des cellules apicales, un rôle dans l'acidification du fluide épидидymaire a été proposé pour les cellules claires (Beaulieu et al., 2004; Hermo et al., 2000).

1.1.2.4 Les cellules en halo

Les cellules en halo sont de petites cellules présentes sur toute la longueur de l'épididyme, généralement situées à la base de l'épithélium (Hermo and Robaire, 2002). Chez un rat adulte jeune, les cellules en halo comprennent des lymphocytes T auxiliaires, des lymphocytes T cytotoxiques, et des monocytes/macrophages, mais pas de lymphocytes B. Avec l'âge il y a une augmentation, spécifique de la région épидидymaire, du nombre de chacun de ces types cellulaires, ainsi que l'apparition occasionnelle d'éosinophiles et de lymphocytes B (Hermo and Robaire, 2002). Ces cellules pourraient intervenir dans la réponse immune innée de ce tissu qui échappe à la réponse immune adaptative à cause de la barrière hémato-épидидymaire.

1.1.2.5 Les cellules basales

Les cellules basales sont de petites cellules allongées réparties tout autour de l'épididyme (Robaire and Viger, 1995). Elles sont présentes sur l'ensemble du canal épидидymaire. Elles ont une forme hémisphérique, adhèrent à la membrane basale et ne semblent pas avoir d'accès direct à la lumière du tube. En réalité ces cellules présentent des extensions jusqu'à la lumière. Ces cellules ne se divisent pas chez l'adulte, et ne sont pas des cellules souches (Hermo and Robaire, 2002). Elles possèdent des puits recouverts sur la face opposée à la membrane basale et le long des cellules principales, suggérant une endocytose médiée par des récepteurs.

Ces différents types cellulaires, en fonction de leur localisation et de leur(s) rôle(s) dans l'épididyme vont intervenir dans les modifications que le spermatozoïde subit lors de son trajet dans l'épididyme.

1.2 Les modifications du spermatozoïde au cours du transit épидидymaire

Pendant son trajet dans l'épididyme, le spermatozoïde subit de nombreuses modifications ; des changements de composition en lipides de la membrane plasmique, des réarrangements de ses domaines membranaires, l'ajout, l'élimination ou la modification biochimique de protéines.

Le spermatozoïde ne présentant pas d'activité de synthèse à cause de la condensation très importante de son noyau et de son état haploïde, les différentes modifications qu'il subit pendant son trajet épидидymaire sont essentiellement dues aux composants du fluide épидидymaire.

1.2.1 Les modifications lipidiques

La membrane spermatique présente quelques particularités concernant sa composition lipidique par rapport à la membrane plasmique d'autres cellules. En effet, elle est caractérisée par une plus forte quantité d'acides gras poly-insaturés, et un rapport cholestérol/phospholipides faible (0,21 pour le spermatozoïde de hamster, 0,8 à 1,3 pour la membrane érythrocytaire humaine) (Awano et al., 1993; Leterrier and Gary-Bobo, 1989).

Au cours du transit épидидymaire, cette composition lipidique est modifiée. En effet, la composition lipidique des spermatozoïdes de la queue épидидymaire est très différente de celle des spermatozoïdes testiculaires.

Lors de la maturation épидидymaire, la quantité de phospholipides diminue de 25% à 48% selon les espèces (Jones, 1998). C'est principalement la proportion des lipides contenus dans le feuillet interne de la membrane plasmique qui décroît. Cependant, les changements qui interviennent dans la composition de cette membrane varient d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez le verrat, peu de changements dans la composition de la membrane plasmique ont lieu au cours de la maturation épидидymaire (Jones, 2002).

La composition en stérols varie aussi au cours de la maturation épидидymaire. Là encore les variations sont modulées d'une espèce à l'autre. A titre d'exemple, chez le bélier et le rat, le contenu en cholestérol de la membrane diminue d'environ 50% au cours de la maturation, alors que chez le bouc on observe une augmentation de 66% du cholestérol (Jones, 2002).

D'une façon générale, chez la plupart des espèces, la diminution de la quantité de stérols est moins importante que celle des phospholipides, et on observe de ce fait que le rapport stérol/phospholipides augmente généralement au cours de la maturation du spermatozoïde.

Par ailleurs, on note globalement une diminution de la saturation des acides gras membranaires au cours du trajet dans l'épididyme.

Ces différents changements de composition lipidique aboutissent globalement à une augmentation de la fluidité de la membrane plasmique du spermatozoïde au cours de sa maturation épидидymaire.

1.2.2 Condensation de la chromatine

Le remodelage structurel de la chromatine spermatique pourrait intervenir dans la protection du génome nucléaire de ces cellules vis-à-vis de l'environnement auquel elles sont soumises pendant leur développement. Pendant la spermatogenèse, la chromatine des spermatozoïdes de mammifères subit une réorganisation où les histones et les protéines non-histones sont remplacées par des protamines. Dans les spermatozoïdes matures, ce remodelage maintient l'ADN dans un état très compacté et transcriptionnellement inactif, en attendant une éventuelle fécondation d'un ovocyte. Chez la plupart des mammifères euthériens (dont les embryons se développent entièrement dans le corps de leur mère, et sont alimentés pendant la grossesse

grâce au placenta), les protamines sont des protéines riches en cystéine qui se localisent dans le petit sillon de l'ADN, et se lient par des ponts disulfures durant le transit épидидymaire, pour conférer une stabilité à la structure. Le statut redox de l'épididyme intervient dans la formation des ponts disulfures pendant la maturation épидидymaire, par exemple avec la glutathion peroxydase 4 localisée sur les protamines (Godeas et al., 1997).

La plupart des métathériens (dont les fœtus sont mis au monde alors qu'ils ne sont pas à terme, et achèvent leur développement dans une poche ventrale), dont le wallaby de l'île d'Eugène (*Macropus eugenii*), n'ont pas de protéines riches en cystéine pour compacter leur ADN. Une étude a été effectuée sur trois espèces montrant un compactage de l'ADN croissant : le wallaby de l'île d'Eugène, l'homme et la souris. Des spermatozoïdes de ces trois espèces ont été soumis à un stress oxydant, et le taux de mutation de l'ADN génomique a été montré inversement proportionnel à la condensation de la chromatine (Bennetts and Aitken, 2005). Cette expérience montre l'importance de la compaction de l'ADN qui se déroule au cours de la maturation épидидymaire, pour la protection du génome spermatique. Par ailleurs, il existe des données cliniques liant les défauts de compaction de la chromatine avec des dommages de l'ADN et l'échec de développement embryonnaire suivant une procréation médicalement assistée (Bennetts and Aitken, 2005).

1.2.3 Régulation du volume du spermatozoïde et contrôle de l'osmolarité

Le spermatozoïde est une cellule ne possédant quasiment pas de cytoplasme. C'est pourquoi le contrôle de son volume est très important. De plus, cette régulation de volume est indispensable à l'acquisition de sa motilité.

La composition du fluide épидидymaire dépend de phénomènes de sécrétions et de réabsorptions tout au long de l'organe. Une des principales caractéristiques des sécrétions épидидymaires, est leur restriction spatiale. L'établissement d'une sécrétion épидидymaire régionalisée se fait progressivement durant le développement post-natal, avec la différenciation de l'organe.

Une autre particularité du fluide épидидymaire vient de la présence de composés à des concentrations inhabituelles, dont certains ne sont pas retrouvés dans d'autres fluides corporels. Ces sécrétions maintiennent les spermatozoïdes dans un environnement particulier quant au pH, la tension en oxygène, et le type de substrats énergétiques.

Etude Bibliographique

La plus grande partie du fluide testiculaire (99% chez le verrot, 95% chez le taureau, 50% chez le rat) est réabsorbée dans les premières régions épiddymaires (Dacheux and Dacheux, 2001). Une molécule dont la réabsorption est conséquente, est l'eau. La réabsorption de l'eau associée au mouvement des ions (réabsorption de Na^+ et Cl^- , sécrétion des ions K^+ et phosphates) aboutit à une diminution d'un facteur 10 du rapport Na^+/K^+ dans le fluide, entre la tête et la queue épiddymaire (Dacheux and Dacheux, 2001).

Une autre molécule importante du fluide épiddymaire est la carnitine, qui intervient dans le métabolisme des lipides. Elle est présente dans le fluide, et concentrée par transport actif à partir du sang. La concentration de carnitine dans le fluide augmente au cours du transit. Chez les mammifères, cette molécule est captée par les spermatozoïdes, transformée en acétylcarnitine (par la carnitine acétyltransférase) qui s'accumule au cours de la maturation et sera utilisée comme substrat énergétique pour la motilité (Dacheux and Dacheux, 2001).

Ces différentes sécrétions et réabsorptions font de l'épiddyme un milieu hypertonique par rapport au spermatozoïde. En effet, chez la souris, l'osmolarité du fluide épiddymaire est de 415mmol/kg, alors que l'osmolarité spermatique est d'environ 290mmol/kg (Cooper and Yeung, 2003). Il a d'ailleurs été montré des efflux d'eau depuis le spermatozoïde au cours du transit épiddymaire (Cooper and Yeung, 2003). Cet efflux d'eau entraîne une diminution du volume du spermatozoïde au cours de sa maturation, qui est principalement marquée par une réduction de la taille de la tête du spermatozoïde. La source d'électrolytes permettant au spermatozoïde d'éviter la déshydratation est le fluide épiddymaire, où sont accumulés les électrolytes produits par l'épithélium épiddymaire (Cooper and Yeung, 2003). Un des résultats de la maturation spermatique épiddymaire est l'acquisition par le spermatozoïde de la capacité à réguler son volume (Cooper and Yeung, 2003); cette capacité étant indispensable au pouvoir fécondant. En effet, il a été montré une relation directe entre le volume de la tête d'un spermatozoïde et sa motilité rectiligne. Ces résultats sont par ailleurs confirmés par différentes expériences de transgénèse, dans lesquelles la dédifférenciation de l'épithélium épiddymaire est associée à des spermatozoïdes ne régulant pas (ou mal) leur volume, et ne présentant pas une motilité rectiligne, n'étant par conséquent pas féconds (Sipila et al., 2002; Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996; Yeung et al., 2002; Yeung et al., 2000).

Des souris transgéniques (GPX5-Tag2) exprimant l'oncogène transformant T sous contrôle du promoteur de GPX5 présentent des spermatozoïdes angulés (fig.4, Sipila et al., 2002). Cette angulation du flagelle apparaît au cours de la maturation épiddymaire. Elle se met en place en

Etude Bibliographique

réponse à un gonflement osmotique, qui force le flagelle à se courber au niveau de la gouttelette cytoplasmique devenue plus volumineuse. Cette angulation pourrait être due à une diminution de l'osmolarité du fluide de la queue épидидymaire (Yeung et al., 2002). L'expression de l'antigène T dans ces souris induit un défaut de différenciation du segment initial de la tête de l'épididyme, qui est illustré par l'absence d'expression de certains gènes spécifiques de cette région (CRES, mEP17). L'absence des protéines codées par ces gènes pourrait affecter la maturation de certaines protéines épидидymaires (Sipila et al., 2002).

Un autre exemple est donné par le proto-oncogène *c-ros* qui code pour un récepteur nucléaire orphelin, possédant un domaine tyrosine kinase. Il est exprimé dans les structures épithéliales embryonnaires du rein, du poumon, de l'intestin et des canaux de Wolff. Ensuite, l'expression de *c-ros* dans ces tissus diminue, sauf dans la partie proximale de l'épididyme où cette expression est augmentée au cours du développement prépubertaire, qui coïncide avec la différenciation épithéliale. Les mâles invalidés pour le proto-oncogène *c-ros* sont infertiles (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996). La mutation affecte l'épithélium épидидymaire, et non les cellules germinales, aboutissant à l'absence de différenciation du segment initial de l'épididyme (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996). L'importance de la régulation de son volume par le spermatozoïde intervient aussi lors de son transit dans le tractus génital femelle. En effet, celui-ci est hypo-osmotique par rapport au fluide de la queue épидидymaire. L'osmolarité de l'utérus murin est de 327mmol/kg, alors que celle de l'épididyme est de 415mmol/kg, et chez l'humain l'osmolarité du sperme est de 342mmol/kg et respectivement 287 et 285 pour le mucus cervical et le fluide utérin (Cooper and Yeung, 2003). Ceci nécessite que le spermatozoïde soit capable de réguler son volume. Ce n'est pas le cas dans les KO *c-ros*, où les spermatozoïdes gonflent quand ils pénètrent dans les voies génitales femelles (Yeung et al., 2000). Cette augmentation de volume se traduit par une angulation du flagelle, et par conséquent un défaut dans la motilité des spermatozoïdes qui n'arrivent pas à franchir la jonction utéro-tubaire (Yeung et al., 2002; Yeung et al., 2000).

Ces expériences mettent en lumière l'importance de l'intégrité de l'épithélium épидидymaire, et par conséquent l'intégrité de ses fonctions de sécrétion et réabsorption dans la régulation du volume spermatique.

Un autre effet visible de la modification du fluide épидидymaire et de l'importance de la régulation du volume spermatique est la disparition de la gouttelette cytoplasmique. La gouttelette est un résidu du cytoplasme de la cellule germinale, dont la plus grande partie est

phagocytée par les cellules de Sertoli au moment où la spermatide allongée quitte l'épithélium séminifère pour devenir un spermatozoïde testiculaire libre. Durant le transit de la tête au corps épидидymaire, la gouttelette glisse depuis la base de la tête du spermatozoïde jusqu'à l'extrémité de la pièce intermédiaire du flagelle, puis disparaît dans la queue épидидymaire ou pendant/après l'éjaculation selon les espèces (fig.5, Cooper and Yeung, 2003). Dans plusieurs espèces (taureau, verrat, souris), une persistance de la gouttelette cytoplasmique peut être associée à une infertilité mâle (Cooper, 2005).

La sécrétion (et la réabsorption) de petites molécules tout au long de l'épididyme est une fonction très importante de cet organe, qui nécessite donc une régulation très fine. Une conséquence majeure de ces phénomènes est l'acquisition par le spermatozoïde de la capacité à réguler son volume, au cours de sa maturation épидидymaire.

1.2.4 Modifications de l'acrosome

Le développement de l'acrosome se déroule pendant la spermiogenèse, mais des changements dans la forme de l'acrosome au cours du transit épидидymaire ont été observés chez plusieurs espèces (Scarlett et al., 2001).

Chez certains mammifères comme le hamster, le cochon d'inde, le chinchilla, le lapin, et certains primates, l'acrosome subit des changements ultrastructuraux pendant la maturation post-testiculaire.

Le remodelage de l'acrosome dans l'épididyme implique une réduction de sa taille, une altération de sa forme, et un changement dans le contenu acrosomique. Une comparaison entre des spermatozoïdes de tête et de queue épидидymaire de hamster montre une différence d'organisation du cytosquelette (Olson et al., 2003). Les spermatozoïdes de la queue épидидymaire possèdent un cytosquelette organisé, alors que les spermatozoïdes de la tête ne montrent pas une telle organisation.

Chez le cochon d'inde, l'axe longitudinal de l'acrosome est parallèle à celui du noyau dans la tête de l'épididyme, alors qu'il existe un angle de 40° entre l'acrosome et le noyau pour les spermatozoïdes de la queue épидидymaire (Olson, 2002). De plus, les spermatozoïdes de la tête épидидymaire présentent un acrosome dont les faces ventrale et dorsale sont grossièrement parallèles, alors que dans la queue de l'organe la forme de l'acrosome est modifiée avec un

renflement dorsal et une face antérieure fuselée (Olson, 2002). Ces modifications sont régulées par les androgènes.

Ces phénomènes de changements de forme de l'acrosome sont encore plus importants chez certains marsupiaux pour lesquels la formation de l'acrosome ne se termine qu'au cours de la maturation épидидymaire. Chez le wallaby de l'île d'Eugène (*Macropus eugenii*) et le phalanger renard (*Trichosurus vulpecula*), qui sont deux marsupiaux, quand le spermatozoïde est libéré dans la lumière du tube séminifère, son acrosome a la forme d'une cuillère s'étendant à la face dorsale de la tête spermatique (Lin and Rodger, 1999). Cette forme est très différente de celle observée sur un spermatozoïde éjaculé, où l'acrosome ressemble à un bouton compact positionné dans une dépression de la face dorsale du noyau (Lin and Rodger, 1999). Ce changement de forme débute quand le spermatozoïde entre dans la partie distale de la tête épидидymaire, et se termine quand le spermatozoïde pénètre dans la partie proximale de la queue épидидymaire (fig.6). Ce changement de forme est lié à la polymérisation/dépolymérisation de l'actine à l'intérieur de l'acrosome (Scarlett et al., 2001).

D'une façon générale, ces modifications structurelles pourraient refléter des modifications biochimiques nécessaires aux fonctions de l'acrosome.

1.2.5 Modifications des protéines et maturation épидидymaire

Les protéines peuvent intervenir de différentes façons dans la maturation spermatique. Elles peuvent modifier de façon directe ou indirecte la composition de la membrane plasmique, ou contribuer à la préservation de l'intégrité cellulaire.

1.2.5.1 La sécrétion protéique épидидymaire

La quasi-totalité des protéines d'origine testiculaire pénétrant dans l'épididyme sont réabsorbées dans les premières régions de l'organe. La plupart des protéines épидидymaires sont sécrétées dans la partie antérieure de l'épididyme (Syntin et al., 1996). Chez le verrat, l'activité sécrétrice de la région antérieure est six à huit fois plus importante que celle de la région caudale (Dacheux et al., 2003). La sécrétion protéique dans la tête, le corps et la queue représente 83%, 16%, et 1% respectivement de la totalité des sécrétions épидидymaires (Dacheux et al., 2003). Chez l'étalon, 73% des sécrétions épидидymaires totales ont lieu dans la lumière de la tête (Fouchecourt et al., 2000).

Etude Bibliographique

Selon les espèces, l'épithélium épидидymaire sécrète globalement les mêmes protéines. Cependant, d'une espèce à l'autre les proportions relatives de ces protéines varient (fig.7). De plus, quelques protéines seulement représentent, en masse, la majorité des sécrétions protéiques. Par exemple, sur les 250 protéines du fluide épидидymaire équin, 18 d'entre elles représentent plus de 92% de l'activité sécrétrice épидидymaire (dont lactoferrine 41%, clusterine 25%) (Fouchecourt et al., 2000). Chez le bélier et le verrat, 70% de l'activité de sécrétion de l'épидидyme est liée à quatre protéines : la clusterine, la lactoferrine, la GPX (glutathion peroxydase), et la PDGS (prostaglandin D2 synthase) (Dacheux et al., 2003). On note aussi que la région épидидymaire productrice de ces protéines peut être différente entre espèces.

La sécrétion séquentielle des différentes protéines tout au long de l'épидидyme est une des causes des changements de composition du fluide épидидymaire. Une autre raison est la réabsorption spécifique de certaines protéines dans l'organe. Certaines protéines sont réabsorbées aussitôt qu'elles sont sécrétées, comme la protéine train A chez le verrat, et certaines isoformes de la clusterine chez le cheval. Par contre, d'autres protéines restent présentes tout le long de l'organe, comme la PDGS chez plusieurs espèces (Dacheux et al., 2003).

Les protéines synthétisées dans l'épидидyme sont rarement spécifiques de cet organe. La spécificité épидидymaire est liée à un épissage particulier, ou à une sécrétion de protéines habituellement cellulaires (comme les enzymes lysosomales) (Dacheux and Dacheux, 2002). La principale caractéristique des protéines épидидymaires sécrétées est leur polymorphisme très important, à la fois pour leur poids moléculaire et leur point isoélectrique. Cette hétérogénéité moléculaire est liée à des modifications post-traductionnelles (principalement différents degrés de glycosylation) qui ont lieu dans les cellules sécrétrices et induisent la production d'isoformes d'une même protéine. Ces modifications post-traductionnelles sont aussi dépendantes de la région épидидymaire. Ainsi le nombre d'isoformes sécrétées pour une protéine donnée varie en fonction de la région épидидymaire. De plus, des modifications post-sécrétions peuvent avoir lieu comme des protéolyses et déglycosylations partielles.

La moitié des protéines épидидymaires est sous contrôle androgénique (positif ou négatif). Pour les autres, 43% sont modulés par des facteurs locaux, et 6% ne sont pas influencés quelles que soient les conditions physiologiques (Dacheux et al., 2005). Des facteurs du fluide testiculaire (dits lumicrines) sont impliqués dans le contrôle de la première partie de

l'épididyme. Les mécanismes moléculaires aboutissant à l'établissement de l'expression régionalisée des gènes dans l'épididyme sont principalement sous contrôle testiculaire (hormonal, et *via* des facteurs lumicrines).

Une autre particularité de la sécrétion protéique épидидymaire vient de la sécrétion de protéines ne possédant pas de signal peptidique. Ces protéines sont localisées dans des vésicules appelées épидидymosomes. Les épидидymosomes sont des vésicules multilamellaires libérées dans la lumière par un processus de sécrétion apocrine des cellules épithéliales épидидymaires (Hermo and Jacks, 2002; Rejraji et al., 2002; Saez et al., 2003) (fig.8). L'intérêt de ces vésicules, outre le fait qu'elles permettent la sécrétion de protéines ne possédant pas de signal peptidique, pourrait être de protéger les protéines d'une dégradation enzymatique (Rejraji et al., 2002). Elles peuvent interagir avec la surface spermatique durant le transit épидидymaire pour permettre le transfert de protéines vers le spermatozoïde (Frenette et al., 2002).

1.2.5.2 Modifications glucidiques des protéines

Les glycoprotéines sont des macromolécules de structure complexe composées d'un squelette peptidique sur lequel sont attachées de façon covalente une ou plusieurs chaînes glucidiques.

Deux types d'enzymes, des glycosidases qui clivent des résidus sucrés sur des glycoprotéines et des glycolipides, et des glycosyltransférases qui ajoutent des résidus sucrés sont présentes en grande concentration dans le fluide épидидymaire. Dans le fluide de la queue épидидymaire de rat, la plus grande partie (>80%) de l'activité glycosidase et glycosyltransférase est retrouvée sous forme soluble, et seulement un faible pourcentage de l'activité (<20%) est associée aux spermatozoïdes (Tulsiani, 2003).

Chez le rat, la quantité de fucosyltransférase et de sialyltransférase varie au cours du transit épидидymaire du spermatozoïde. La sialyltransférase montre une activité beaucoup plus forte sur les spermatozoïdes de la tête proximale épидидymaire, alors que la fucosyltransférase montre une activité plus importante sur les spermatozoïdes de la queue distale (Tulsiani, 2003). De la même façon chez la souris, une diminution de l'activité fucosyltransférase spermatique est montrée, alors qu'il n'y a aucun changement dans l'activité spermatique galactosyltransférase.

Des glycoprotéines possédant des oligosaccharides liés en N ou en O présentent des profils d'expression qui varient au cours du transit épидидymaire chez le singe rhésus (Srivastav, 2000). Au cours du transit épидидymaire chez le singe rhésus et le rat, on note une augmentation de la charge en acide sialique sur les protéines membranaires spermatiques (Srivastav, 2000). D'une façon générale, un spermatozoïde mature présente plus d'oligosaccharides à sa surface qu'un spermatozoïde immature ; ceci peut être dû à un ajout ou à un démasquage de sucres. L'ajout de sucres pourrait être dû au fait que les protéines spermatiques membranaires deviennent plus accessibles aux glycosyltransférases après qu'elles aient été maturées dans l'épididyme.

Cependant au cours de la maturation, certaines glycoprotéines ne sont plus détectées. Ceci pourrait être causé par un repliement des protéines, une élimination de sucres par des glycosidases, ou par l'élimination de glycoprotéines par des protéases (Srivastav, 2000).

1.2.5.3 Quelques exemples de comportements de protéines au cours du transit épидидymaire

1.2.5.3.1 Déplacement d'une protéine dans la membrane plasmique : PH-20

Parmi les changements observés lors de la maturation épидидymaire, certaines glycoprotéines membranaires subissent un clivage protéolytique suivi d'une migration de la protéine tronquée vers une nouvelle région membranaire, où elle exerce une nouvelle fonction. Un exemple de ce phénomène est la protéine PH-20.

PH-20 (aussi appelée SPAM1, Spam1, 2B1, selon les espèces) est une protéine spermatique de surface liée par une ancre GPI, possédant une activité hyaluronidase et une capacité à lier la zone pellucide ovocytaire. Le gène de PH-20 est exprimé dans le testicule, mais aussi dans les trois régions de l'épididyme de souris, de macaque, et de rat (Evans et al., 2003; Zhang et al., 2004). Le transcrit épидидymaire de PH-20 est trouvé chez des souris sauvages et mutantes ne présentant pas de cellules germinales, ainsi que dans des cultures de cellules épидидymaires, montrant que PH-20 n'est pas simplement transportée dans l'épididyme depuis le testicule (Evans et al., 2003; Zhang et al., 2004). L'expression de PH-20 se fait dans les cellules principales de l'épithélium épидидymaire. L'intensité d'expression de PH-20 est dépendante de la région épидидymaire, mais la relation intensité/région varie d'une espèce à l'autre (Zhang et al., 2004). D'autre part, l'activité hyaluronidase des spermatozoïdes ayant un acrosome intact augmente de 4,3 fois dans les spermatozoïdes de la queue épидидymaire,

comparée à ceux de la tête, chez la souris. Par ailleurs, chez le cheval, la protéine présente dans la tête épидидymaire semble correspondre à un précurseur inactif, puisque aucune activité enzymatique n'est détectable (Rutllant and Meyers, 2001).

Chez différentes espèces, la localisation de PH-20 sur le spermatozoïde a été étudiée, et un même comportement a été observé. Chez le cochon d'inde, PH-20 est localisée sur la totalité de la surface du spermatozoïde testiculaire, alors que dans la tête épидидymaire elle est située sur l'ensemble de la tête spermatique. Pendant la maturation épидидymaire, elle est redistribuée à la région postérieure de la tête spermatique (Toshimori, 1998). Chez la souris, la protéine PH-20 est uniformément distribuée sur la tête du spermatozoïde de la tête épидидymaire, alors qu'elle est localisée sur les régions antérieure et postérieure de la tête du spermatozoïde caudal (Toshimori, 2000). Chez le cheval, PH-20 est localisée sur la totalité de la tête des spermatozoïdes de la partie proximale de l'épididyme, mais sur la région post-acrosomique des spermatozoïdes de la queue et des spermatozoïdes éjaculés (fig.9) (Rutllant and Meyers, 2001). L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer cette différence de localisation est que les molécules de PH-20 de la partie antérieure de la tête spermatique migrent pour rejoindre celles de la région post-acrosomique pendant le transit épидидymaire. Cela implique un mouvement latéral de ces protéines dans la bicouche lipidique. Ce mouvement est un processus actif (Rutllant and Meyers, 2001).

Parallèlement à ce déplacement, une diminution du poids moléculaire de cette protéine est montrée chez toutes ces espèces. La réduction du poids moléculaire est due à une modification de la structure des chaînes oligosaccharidiques N-liées. Ces résultats suggèrent que l'activation de la PH-20 pendant la maturation épидидymaire est régulée par des déglycosylations. Cette modification des chaînes oligosaccharidiques peut être liée à la protection des protéines de surface de la dégradation, et au maintien de leur activité fonctionnelle (Rutllant and Meyers, 2001; Toshimori, 2000). De plus, chez le cochon d'inde, un traitement des spermatozoïdes à la trypsine permet d'induire le changement de localisation de PH-20, suggérant qu'un clivage protéique précède cette relocalisation (fig.10) (Cuasnicu, 2002).

1.2.5.3.2 Acquisition de protéines au cours du transit épидидymaire : P26h

La protéine P26h a été identifiée sur les spermatozoïdes de hamster, et plus précisément sur l'acrosome (Bérubé and Sullivan, 1994). Cette protéine est une carbonyle réductase, c'est-à-

dire une oxydoréductase dépendante du NADPH, qui catalyse la réduction de composés carbonylés en alcool correspondant (fig.11). Par ailleurs, cette protéine intervient dans la liaison spermatozoïde-zone pellucide. L'ARNm de P26h est retrouvé dans le testicule, mais aussi faiblement tout au long de l'épididyme, avec une expression plus importante dans le corps épидидymaire (Gaudreault et al., 1999). La présence de la protéine P26h en grande concentration dans la région proximale de l'épididyme suggère que cette protéine serait un produit de sécrétion des tubes séminifères (d'après la localisation de ses messagers) (Gaudreault et al., 1999). Sa concentration diminue ensuite tout au long de l'épididyme. En parallèle, P26h s'accumule sur le spermatozoïde durant la maturation épидидymaire (Gaudreault et al., 1999), où elle est liée à la membrane plasmique par une ancre GPI pendant le transit épидидymaire. Son transfert semble impliquer des épидидyosomes. En effet, dans le fluide épидидymaire, elle est présente sous forme soluble ou liée par un phosphatidylinositol à des épидидyosomes (Légaré et al., 1999). Au cours du transit épидидymaire, les épидидyosomes se rapprochent du spermatozoïde, et P26h est transférée au spermatozoïde (Frenette et al., 2002).

Un orthologue humain de cette protéine a été identifié ; P34H. Cette protéine apparaît sur l'acrosome des spermatozoïdes dans la tête épидидymaire, et est impliquée dans la liaison spermatozoïde-zone pellucide (Boué et al., 1996). Elle est absente des tubes séminifères et des canaux efférents, apparaît faiblement dans la tête épидидymaire et plus intensément dans le corps. Sa présence sur le spermatozoïde augmente au cours du transit épидидymaire (Boué et al., 1996), mais sa localisation reste la même : l'acrosome. Certains cas d'infertilité mâle humaine sont liés à l'absence de P34H (Boué and Sullivan, 1996).

1.2.5.3.3 Modification de la localisation d'une protéine associée à la régulation d'une fonction épидидymaire : V-ATPase et maintien du pH intraluminal

Dans différents types cellulaires, dont les cellules claires de l'épithélium épидидymaire, on trouve une ATPase vacuolaire à protons (V-ATPase) fortement exprimée, et localisée dans des vésicules intracellulaires ou au niveau de la membrane plasmique (Beaulieu et al., 2004). Les rôles de cette protéine varient selon le type cellulaire où elle est exprimée. En effet, la sécrétion active de protons *via* cette V-ATPase est responsable de la résorption de l'os par les ostéoclastes, de l'homéostasie acido-basique par les cellules du rein, et du maintien des spermatozoïdes dans un état quiescent pendant la maturation et le stockage épидидymaire (par les cellules claires).

La V-ATPase est une enzyme complexe, composée de plusieurs sous-unités. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules eucaryotes, où elle est localisée dans des organites intracellulaires acides tels que les lysosomes, l'appareil de Golgi, des vésicules de sécrétion, et les endosomes. Dans certaines cellules spécialisées comme les ostéoclastes, les cellules intercalaires du rein et les cellules claires épидидymaires, elle est aussi présente dans la membrane plasmique. Dans ces cellules, la V-ATPase est constamment recyclée entre les vésicules intra-cytoplasmiques et la membrane. Une augmentation de la sécrétion de protons correspond à une augmentation de la localisation de cette protéine à la surface cellulaire (Beaulieu et al., 2004).

L'épididyme maintient un pH luminal de 6,5-6,8 qui permet de garder les spermatozoïdes dans un état quiescent pendant la maturation et le stockage épидидymaire. Les cellules claires épидидymaires interviennent dans la régulation du pH.

Un pH luminal alcalin faciliterait la mobilisation de la V-ATPase à la membrane plasmique *via* soit : 1) une augmentation de l'exocytose de la V-ATPase ; 2) une diminution de l'endocytose de la V-ATPase ; ou 3) une combinaison des deux phénomènes (Beaulieu et al., 2004). Pour un pH luminal de 6,5 ces processus pourraient être inversés pour faciliter l'internalisation de la V-ATPase.

Ainsi, l'épididyme est capable de moduler la localisation d'une protéine pour que la maturation des spermatozoïdes s'effectue dans des conditions optimales (ici maintien du pH).

1.2.5.3.4 Protéines intervenant dans la motilité spermatique

Chez l'homme, le transport des spermatozoïdes dans l'épididyme dure deux à six jours. Il n'est pas dû à la motilité spermatique ; c'est un phénomène passif. En effet, tant que les spermatozoïdes se trouvent dans l'épididyme, ils ne présentent aucune motilité propre, ceci en dépit de l'acquisition au cours du transit épидидymaire d'une capacité à la motilité.

Dans l'épididyme, la progression des spermatozoïdes est initialement due aux sécrétions venant du testicule. Interviennent aussi les cils épithéliaux et la contraction des muscles lisses entourant le canal. L'amplitude des contractions des muscles lisses augmente de la tête vers la queue proximale, alors que leur fréquence décroît progressivement. L'immobilité des spermatozoïdes dans l'épididyme est due en partie à la présence d'une glycoprotéine formant un mucus qui englobe les spermatozoïdes. Cette protéine synthétisée par les cellules principales de la tête épидидymaire est appelée immobiline (Hermon and Robaire, 2002).

Etude Bibliographique

La capacité des spermatozoïdes à être motiles évolue au cours du transit épидидymaire. Incubés dans un milieu adéquat, les spermatozoïdes provenant de la tête épидидymaire ne sont pas motiles, ou présentent des mouvements non progressifs du flagelle, alors qu'une progression est observée pour les spermatozoïdes du corps ou de la queue épидидymaire.

Une des protéines intervenant dans l'acquisition de la motilité est la protéine Bin1b.

Bin1b est un peptide retrouvé exclusivement dans l'épididyme chez le rat, et ayant un homologue chez l'homme. C'est une β -défensine exprimée uniquement dans la partie médiane de la tête épидидymaire, et qui s'associe aux spermatozoïdes de l'ensemble de l'épididyme (Zhou et al., 2004). Sur les spermatozoïdes de la tête épидидymaire, Bin1b est localisée sur toute la tête, alors que sur les spermatozoïdes de la queue épидидymaire elle est localisée dans la région post-acrosomique (Zhou et al., 2004).

Bin1b est impliquée dans l'induction de la motilité spermatique (Zhou et al., 2004). Les défensines sont des molécules polaires qui s'insèrent dans les membranes phospholipidiques dans lesquelles elles forment des pores. La liaison de Bin1b au spermatozoïde semble activer des canaux calciques, ce qui permet l'augmentation du taux intracellulaire de calcium, et initie la motilité des spermatozoïdes immatures (Zhou et al., 2004). La différence d'action de Bin1b sur le spermatozoïde immature ou mature pourrait être due à sa différence de localisation (Zhou et al., 2004).

Comme nous venons de le voir, la maturation épидидymaire est un ensemble de phénomènes complexes qui concourent à développer et à accentuer le potentiel fécondant du spermatozoïde testiculaire. A la fin des processus de maturation, par le jeu de sécrétions, de réabsorptions et de modifications protéiques, l'environnement direct du spermatozoïde, sa surface et même la structure de son noyau se trouvent modifiés. Le spermatozoïde est alors apte à lier et à féconder l'ovocyte.

Comprendre les mécanismes de la maturation post-testiculaire des gamètes mâles, outre l'augmentation des connaissances fondamentales, peut être important dans différents domaines appliqués. En effet, ces connaissances pourraient permettre de comprendre les

pathologies de l'infertilité mâle idiopathique (en particulier non dues à des dysfonctionnements de la spermatogenèse). La connaissance des phénomènes précis de maturation ainsi que des molécules impliquées dans ces étapes constitue le point de départ du développement de nouvelles technologies d'intervention humaine sur le spermatozoïde. Dans les parties suivantes de cette étude bibliographique, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux techniques de cryoconservation des gamètes, ainsi qu'à l'immunocontraception. Ces deux techniques constituent en effet les deux volets abordés au cours de ce travail de thèse. Dans un premier temps, nous aborderons les aspects de la maturation qui permettent d'envisager une amélioration des phases de cryoconservation des gamètes mâles, et enfin dans une dernière partie nous nous intéresserons aux connaissances actuelles en immunocontraception avec un développement des différentes approches utilisées et leurs limites.

Un des domaines pouvant bénéficier de l'accumulation des connaissances concernant la maturation épидидymaire est donc la cryoconservation du sperme. En effet, un des problèmes majeur rencontré au cours de la conservation du sperme est la dégradation des spermatozoïdes au moment du réchauffement. Ceci est dû aux stressés occasionnés, parmi lesquels un stress oxydant. C'est pourquoi l'étude des systèmes antioxydants présents pendant la maturation spermatique épидидymaire est intéressante, dans un objectif d'amélioration de la cryoconservation.

2 Protection antioxydante du spermatozoïde

Nous allons dans un premier temps faire le point des antioxydants intervenant au cours de la maturation épидидymaire, avant de relier ces systèmes antioxydants aux techniques de conservation du sperme.

2.1 Protection anti-oxydante au cours du transit épидидymaire

La membrane des spermatozoïdes est particulièrement riche en acides gras polyinsaturés, ce qui les rend spécialement sensibles aux espèces oxygénées réactives (EOR) (peroxyde d'hydrogène, anion superoxyde, radical hydroxyl), dérivées du métabolisme de l'oxygène. En plus d'une action sur les lipides, les EOR peuvent aussi endommager les protéines et l'ADN. Ces molécules peuvent entraîner une peroxydation lipidique de la membrane plasmique spermatique, des dommages à la structure de l'axonème, des problèmes dans le déroulement

de la capacitation ou de la réaction acrosomique, une perte de motilité, pouvant aboutir à une infertilité (Tramer et al., 1998).

Cependant le spermatozoïde lui-même, en conditions physiologiques produit des EOR. Cette production pourrait être corrélée à la persistance d'un excès de cytoplasme résiduel dans les dernières étapes de la spermiogenèse (Aitken, 2002). Il a été proposé que les EOR spermatiques auraient deux sources principales : une NADPH oxydase de la membrane plasmique du spermatozoïde, et la chaîne respiratoire mitochondriale (Vernet et al., 2001). A l'heure actuelle l'existence de la NADPH oxydase membranaire n'a pas pu être confirmée (Baker et al., 2004). Par ailleurs, une NADPH oxydase (NOX5) a été mise en évidence dans le testicule (Krause, 2004). Les ARNm de cette enzyme sont plus précisément exprimés dans les spermatocytes au début de la spermatogenèse, ce qui n'exclut pas une fonction de la protéine dans les spermatozoïdes matures (Krause, 2004). Les EOR produites par cette enzyme pourraient intervenir dans la régulation de facteurs de transcription, et pourraient avoir un rôle dans l'apoptose des cellules germinales précocement dans la spermatogenèse (Krause, 2004).

Par ailleurs, la production d'EOR en faible quantité est nécessaire à différentes fonctions spermatiques comme l'activation de la motilité, la capacitation, la réaction acrosomique et l'hyperactivation.

La quantité d'EOR dans le milieu environnant les spermatozoïdes doit donc être contrôlée de façon stricte, principalement dans l'épididyme où ils peuvent séjourner de plusieurs jours à plusieurs semaines. Cette régulation est assurée par des antioxydants non enzymatiques et enzymatiques retrouvés dans cet organe. Ces différentes molécules vont protéger les spermatozoïdes durant leur passage (et leur maturation) dans l'épididyme.

Les spermatozoïdes possèdent de fortes concentrations de groupements thiols libres, et de petites quantités d'acides urique et ascorbique, de glutathion réduit et de vitamine E, qui sont toutes des molécules antioxydantes. La vitamine E est retrouvée en plus grande quantité sur les spermatozoïdes de la tête que sur ceux de la queue épидидymaire, indiquant une disparition de cette molécule au fur et à mesure de la maturation spermatique chez le rat (Tramer et al., 1998).

Etude Bibliographique

Parmi les enzymes antioxydantes présentes dans l'épididyme et/ou sur le spermatozoïde, on trouve : les superoxydes dismutases, la catalase, des glutathion peroxydases, et l'indolamine dioxygénase.

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (molécule relativement inerte, à demi-vie courte, ne pouvant pas traverser les membranes) en peroxyde d'hydrogène (molécule très réactive, capable de traverser les membranes) (fig.12). Il existe différentes formes de SOD : la Cu-Zn-SOD cytosolique, la Cu-Zn-SOD sécrétée qui se lie aux spermatozoïdes, et la Mn-SOD localisée dans les mitochondries.

L'ARNm de la Cu-Zn SOD est fortement exprimé dans la queue de l'épididyme de rat (Perry et al., 1993). L'activité de l'enzyme est très forte dans le fluide de la queue épидидymaire chez le rat (Perry et al., 1993). Elle est par ailleurs deux à trois fois plus importante sur les spermatozoïdes de la tête que ceux de la queue épидидymaire, chez le rat (Tramer et al., 1998).

La catalase métabolise l' H_2O_2 quand celui-ci est à des concentrations relativement élevées ($>10^{-6}\text{M}$) (fig.13). Elle n'est pas retrouvée chez toutes les espèces, au niveau spermatique. En effet, elle est présente sur les spermatozoïdes humains et de rat, à un niveau très faible, cependant elle est absente des spermatozoïdes de lapin, souris et taureau malgré un niveau élevé dans le sperme (Vernet et al., 2004). Sa faible représentation, et sa faible affinité pour le peroxyde d'hydrogène font de la catalase une enzyme peu importante dans l'épididyme pour le contrôle du stress oxydant.

Les glutathion peroxydases (GPX) forment une famille de cinq enzymes chez les mammifères, nommées GXP1 à GPX5. Une protéine localisée dans l'œil a été proposée comme étant une sixième GPX (Singh and Shichi, 1998). Cependant sur la base de sa séquence primaire, elle apparaît plus proche d'une peroxyredoxine que d'une GPX.

Ces enzymes métabolisent le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les peroxydes hydrophiles de petite taille, et des hydroperoxydes plus complexes en utilisant le glutathion réduit comme donneur d'électrons (Tulsiani, 2003; Yamamoto, 1993) (fig.14). Ces enzymes sont actives vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène à des concentrations beaucoup plus faibles que la catalase, mais sont saturées pour des concentrations proches de 10^{-6}M .

Quatre membres de la famille des GPX sont retrouvés sur le spermatozoïde, dans les cellules épithéliales, ou dans le fluide épидидymaire (GPX1, GPX3, GPX4, GPX5).

GPX1 est présente dans le testicule, la prostate, les vésicules séminales, le canal déférent, et l'épididyme (Dufaure et al., 1996). GPX3 est retrouvée dans l'épididyme où elle présente un

comportement particulier. En effet, chez la souris, la protéine est sécrétée dans la tête épидидymaire, alors qu'elle reste cytoplasmique dans la queue, avec un taux d'ARNm plus élevé dans la région caudale (Schwaab et al., 1998). GPX4 est trouvée dans le testicule, mais aussi sur la tête et la pièce intermédiaire du spermatozoïde épидидymaire, ainsi que dans le noyau spermatique, où elle pourrait contribuer à la condensation de la chromatine durant le trajet épидидymaire (Pfeifer et al., 2001). Elle interviendrait aussi dans l'architecture correcte de la pièce intermédiaire (Ursini et al., 1999). L'expression de GPX4 varie peu dans les régions proximales de l'épididyme, mais augmente dans la queue. Chez la souris, l'expression de l'ARNm de GPX5 est limitée aux cellules principales de la tête épидидymaire, et est sous contrôle androgénique (Ghyselinck, 1993). Chez le rat elle est exprimée fortement dans le segment initial, puis décroît tout au long de l'épididyme (Jervis and Robaire, 2001). La protéine est sécrétée dans la lumière épидидymaire, et s'associe à la membrane plasmique des spermatozoïdes de souris et de rats (Perry et al., 1992; Rejraji et al., 2002; Vernet et al., 1997). GPX5 présente la particularité de ne pas posséder de sélénocystéine dans son site actif (par opposition aux autres GPX de mammifères). Par ailleurs, contrairement aux autres membres de la famille des GPX, la distribution de GPX5 est restreinte à l'épididyme et à la membrane plasmique des spermatozoïdes.

L'indolamine dioxygénase catalyse l'oxygénation du L-tryptophane par l'anion superoxyde pour produire un produit moins dangereux pour la cellule, les cynurénines qui peuvent être rapidement et facilement éliminées de la cellule (fig.15). Pour être active, cette enzyme doit donc se trouver dans un environnement riche en tryptophane. Or les concentrations de tryptophane sont beaucoup plus importantes dans la tête et la queue épидидymaire que dans le sérum. De plus, l'épididyme est un des principaux sites de l'organisme produisant l'indolamine dioxygénase (Baban et al., 2004). Cette enzyme semble donc être importante pour la protection des spermatozoïdes dans l'épididyme.

La composition particulière de la membrane plasmique spermatique induit une sensibilité accrue de cette cellule au stress oxydant. Associée à cette sensibilité, la production d'EOR par le spermatozoïde lui-même, nécessite une régulation très fine du statut oxydant de l'épididyme, expliquant la richesse particulière de cet organe en systèmes antioxydants enzymatiques ou non. Or la plupart des systèmes de protection disparaissent ou sont éliminés lors des phases de cryoconservation des gamètes. Cela entraîne des conséquences graves pour le spermatozoïde. C'est ce que nous allons voir maintenant.

2.2 Protection antioxydante et conservation du sperme

Ces dernières années, la cryoconservation du sperme s'est beaucoup développée, et ceci avec différents objectifs. En effet, cette technique est utilisée aussi bien en reproduction humaine, que dans la préservation des espèces en danger, et chez les animaux d'intérêt agronomique pour l'amélioration des espèces. Durant les différentes étapes du processus de cryoconservation, le spermatozoïde est soumis à divers stress dont un stress oxydant.

2.2.1 Effets du stress oxydant sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryoconservés

La cryoconservation du sperme induit un stress oxydant à la fois par une production accrue d'EOR, mais aussi par dégradation des antioxydants (notamment les enzymes) (Baumber et al., 2003; Mazzilli et al., 1995). Par exemple, chez le taureau, la congélation réduit le taux de deux antioxydants spermatiques que sont la superoxyde dismutase et le glutathion (Bilodeau et al., 2000).

Ce stress entraîne une altération de la membrane plasmique par lipoperoxydation, ainsi qu'une fragmentation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN augmente avec le nombre de cycles de congélation/décongélation (Linfors and Meyers, 2002). C'est l' H_2O_2 , plus que l'anion superoxyde, qui est responsable de cette fragmentation. Par ailleurs, la catalase et le glutathion réduit permettent de limiter ces effets (Baumber et al., 2003).

D'un point de vue fonctionnel chez l'étalon, le stress oxydant subit pendant la cryoconservation induit une perte de motilité spermatique (Ball et al., 2001).

L'élimination du plasma séminal préalable à la congélation diminue la capacité du sperme à éliminer les EOR (Ball et al., 2001). C'est pourquoi une grande variété d'antioxydants a été utilisée de façon empirique dans les milieux de congélation des gamètes pour tenter de limiter les dommages du stress oxydant lié à la congélation du sperme.

2.2.2 Effets des antioxydants sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryoconservés

L'inconvénient majeur de l'ajout d'antioxydants non enzymatiques, c'est qu'ils ne sont pas régénérés après avoir été oxydés. Cependant différents essais ont été menés sur leur capacité à diminuer les dommages subis par le spermatozoïde.

Etude Bibliographique

Le pyruvate est un antioxydant qui réagit avec l'H₂O₂ pour donner par décarboxylation oxydative non enzymatique de l'eau et du CO₂. Il permet de limiter la perte de motilité spermatique bovine dans le milieu de conservation (Bilodeau et al., 2002).

La vitamine E ajoutée au moment du refroidissement du sperme permet d'augmenter le pourcentage de spermatozoïdes motiles après congélation, chez le verrat (Pena et al., 2003).

Par ailleurs, en présence du système xanthine-xanthine oxydase (fig.16), le glutathion a un effet protecteur sur la motilité des spermatozoïdes équins (Baumber et al., 2000).

D'autres études ont été effectuées sur des enzymes antioxydantes présentes dans le sperme. La SOD et la catalase ont été ajoutées au milieu de conservation pour limiter les effets délétères des EOR. Chez le taureau, l'ajout à la fois de SOD et de catalase dans le milieu de congélation est moins efficace pour lutter contre la perte de motilité du spermatozoïde que l'ajout de catalase seule, en présence d'anion superoxyde. Ceci peut être expliqué par le fait que la SOD convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène plus rapidement que la catalase ne peut le dégrader (Bilodeau et al., 2002).

La protection des spermatozoïdes contre le stress oxydant peut difficilement être permise par l'ajout d'antioxydants non enzymatiques dans le milieu de conservation, à cause de l'absence de régénération de ces molécules. L'autre voie d'approche consiste donc à utiliser des enzymes. Là encore, la connaissance des phénomènes qui se déroulent au cours de la maturation épидидymaire est intéressante. En effet, l'utilisation d'une enzyme antioxydante présente dans le sperme ou sur le spermatozoïde mature limiterait les risques de perturbation du spermatozoïde ou du phénomène de fécondation.

Si l'aide médicale à la procréation (et en particulier la cryoconservation du sperme) peut bénéficier de l'avancée des connaissances concernant la maturation épидидymaire, le contrôle de la fertilité le pourrait aussi. Différentes techniques impliquant des protéines spermatiques acquises au cours de la maturation épидидymaire peuvent être utilisées dans un but de contrôle de la fertilité ; comme par exemple l'action sur des protéines intervenant dans la composition

de canaux ioniques (perturbant par exemple l'ouverture des canaux), ou le développement de vaccins contraceptifs. Des protéines acquises au cours de la maturation épидидymaire utilisées pour un vaccin contraceptif présentent l'avantage de ne pas perturber la fonction testiculaire. Chez l'homme, la présence naturelle d'anticorps anti-spermatozoïdes (AAS) dans les voies génitales mâles ou femelles est une cause d'infertilité. Ces AAS sont retrouvés chez 10% des hommes infertiles (contre 1% des hommes fertiles) et moins de 5% des femmes infertiles (Gehlbach and Haas, 2004).

Cette constatation a été à l'origine d'études visant à mettre au point des vaccins contraceptifs dirigés contre des protéines spermatiques ou ovocytaires.

3 L'immunocontraception

L'immunocontraception vise à faire produire à un organisme (mâle ou femelle) des anticorps dirigés contre des protéines intervenant dans une des étapes de la reproduction. Ces anticorps peuvent agir sur la production des gamètes, la fécondation, l'implantation, ou le maintien de l'embryon. Leur effet doit par ailleurs être réversible après l'arrêt des immunisations.

Les vaccins contraceptifs peuvent avoir trois types de cible : des hormones intervenant dans le processus de reproduction, des protéines de la zone pellucide, et des protéines spermatiques. Si possible, ces cibles doivent être spécifiques de la reproduction pour ne pas perturber d'autre(s) fonction(s) métabolique(s). Par ailleurs, ces vaccins doivent induire une réponse humorale, et non une réponse cellulaire cytotoxique pour ne pas induire de réactions de toxicité auto-immune à long terme.

3.1 Les différents types de vaccins contraceptifs

Des essais d'immunocontraception ont été réalisés avec différentes cibles impliquées dans la reproduction (hormones, protéines ovocytaires et spermatiques), et chez différentes espèces (de l'homme à l'animal de laboratoire, en passant par des espèces sauvages).

3.1.1 Les vaccins anti-hormones

Différentes hormones ont été étudiées comme cibles potentielles pour une immunocontraception : l'hCG (human Chorionic Gonadotrophin), le GnRH (Gonadotrophin

Releasing Hormone), la FSH (Folliculo Stimulating Hormone), et la LH (Luteinizing Hormone).

❖ **L'hCG**

L'hCG est synthétisée et sécrétée uniquement au cours de la grossesse (à l'exception de certains cancers), c'est pourquoi cette hormone est une cible intéressante pour une immunocontraception. Elle est synthétisée par l'embryon préimplantatoire, et est indispensable à l'établissement et au maintien de la grossesse. Plus précisément, elle est sécrétée par le trophoblaste du blastocyste et passe dans la circulation maternelle jusqu'à l'ovaire où elle stimule la production de progestérone par le corps jaune (fig.17).

Un vaccin générant des anticorps anti-hCG empêcherait l'implantation et le début de la gestation (Talwar, 1997). Par ailleurs ce type de vaccin ne devrait pas interférer avec les fonctions physiologiques d'ovulation et de sécrétion d'autres hormones sexuelles (Talwar, 1997).

Différents essais ont été effectués chez l'humain pour des vaccins contraceptifs (contragestifs) avec cette hormone, en utilisant la sous-unité β entière, ou une partie de son extrémité C-terminale. La sous-unité dans son entier a permis de produire une grande quantité d'anticorps, cependant une partie de la séquence est commune avec une autre hormone (β -hLH). Les essais concernant une partie de l'extrémité C-terminale sont spécifiques de la β -hCG, mais entraînent une faible production d'anticorps (Talwar, 1997). Dans tous les cas le titre d'anticorps diminue jusqu'à devenir nul après l'arrêt des traitements, avec des grossesses normales et la naissance d'enfants en bonne santé. La durée moyenne de protection après chaque rappel est d'environ trois mois (six semaines à six mois selon les individus) (Talwar, 1997). De plus, la présence d'anticorps reconnaissant l'hLH n'induit aucune perturbation de l'ovulation ou des menstruations (Talwar, 1997).

❖ **Le GnRH**

Le GnRH est une hormone contrôlant la sécrétion des gonadotropines FSH et LH (par l'hypophyse) qui interviennent dans la formation des gamètes et la sécrétion des stéroïdes sexuels. Par ailleurs, cette hormone est retrouvée chez le mâle et la femelle, et présente une forte homologie de séquences chez tous les mammifères (fig.18).

Des rats mâles immunisés contre le GnRH présentent une atrophie de la prostate avec une diminution du taux de testostérone proche de celui observé lors d'une castration (Talwar, 1997). L'effet est réversible après l'arrêt des injections, avec un retour de la fertilité et du taux de testostérone chez le rat et le cerf (Miller et al., 2000; Talwar, 1997). Cependant, il semble difficile d'envisager une immunocontraception anti-GnRH chez l'humain à cause des effets physiologiques induits par un blocage de cette hormone.

Les anticorps anti-GnRH bloquent la synthèse des hormones gonadotropes FSH et LH, et par conséquent entraînent une défaillance de la fertilité chez le mâle comme chez la femelle. De plus, la neutralisation du GnRH réduit la libido et peut provoquer une ostéoporose chez la femme, ou une perte de poids chez l'homme (Abdennebi-Najar, 2003; Miller et al., 2000). Chez le cerf de Virginie, les mâles immunisés contre le GnRH montrent aussi une perte de libido, et sont ignorés par les mâles dominants (Miller et al., 2000). Ces effets secondaires résultent de la diminution du niveau de stéroïdes sexuels. Une supplémentation en stéroïdes s'avérerait nécessaire afin de maintenir une libido et une sexualité normales chez l'homme, ce qui peut rendre l'application de la méthode extrêmement lourde.

❖ **La FSH**

La FSH stimule les cellules de Sertoli et les cellules folliculaires, qui sont nécessaires à la maturation des gamètes mâles et femelles respectivement. Du fait de ce rôle clé la FSH pourrait représenter une cible pour la contraception dans les deux sexes. L'inactivation par immunisation contre la sous-unité β de la FSH purifiée à partir d'hypophyse ovine, ou contre un domaine de son récepteur, entraîne une inhibition de la production de spermatozoïdes chez le singe. L'avantage d'une telle méthode réside dans le fait que la neutralisation de cette hormone n'a pas d'effet sur les stéroïdes sexuels, donc ne nécessite pas de compensation androgénique, et n'affecte pas la libido chez le primate (Abdennebi-Najar, 2003). Chez l'homme, ce vaccin ne semble pas inhiber la spermatogenèse (Abdennebi-Najar, 2003).

Les vaccins anti-hormones semblent efficaces dans le blocage réversible de la reproduction. Toutefois, les vaccins dirigés contre l'hCG ne sont utilisables que chez la femme, et les vaccins anti-GnRH présentent des effets secondaires importants. Les hormones sexuelles présentant une importante homologie de séquence entre espèces, des vaccins dirigés contre

ces cibles ne peuvent pas être utilisés dans la nature pour immuniser des animaux sauvages, sous peine de toucher aussi la faune non cible.

3.1.2 Les vaccins dirigés contre la zone pellucide

La zone pellucide (ZP) est une structure acellulaire entourant l'ovocyte. Elle possède différents rôles. Le premier est de permettre l'adhérence des spermatozoïdes à ses récepteurs (fig.19). Après la fécondation, la ZP protège et isole l'œuf pendant son trajet jusqu'à l'implantation utérine. La ZP disparaît juste avant l'implantation par action de protéases d'origine trophoblastique ou endométriale, par augmentation de la taille du blastocyste, et par les mouvements de l'embryon (Rouquette, 1990).

La zone pellucide est par ailleurs le site où se déroulent la reconnaissance gamétique et la réaction acrosomique. La glycoprotéine ZP3 (dont la séquence est très conservée entre espèces) est un constituant de la zone pellucide, responsable de ces deux événements. Elle pourrait donc être une cible intéressante pour une immunocontraception. Des essais ont été effectués dans de nombreuses espèces, entraînant dans tous les cas une immunité de longue durée, comme chez la souris (Millar et al., 1989). L'immunisation de chevaux sauvages avec une ZP3 porcine (pZP) a eu une efficacité contraceptive de plus de 90%, sans effet sur l'organisation sociale ou le comportement des animaux (Kirkpatrick et al., 1990; Kirkpatrick et al., 1995). La fertilité de ces animaux a été restaurée après quatre années de traitement. De plus, des juments ont été immunisées contre une ZP3 porcine durant le troisième trimestre de leur gestation et les pouliches résultant de ces gestations (ayant été en contact avec des anticorps anti-pZP *in utero*) ont à leur tour pu développer des gestations. Par ailleurs, chez le cheval les anticorps anti-pZP ne croisent pas avec le cœur, le rein, le poumon, le foie, ou les parties somatiques du testicule ou de l'ovaire, et des anticorps anti-pZP de lapin ne reconnaissent pas la LH, la FSH ni la CG équine (Kirkpatrick et al., 1997). Les anticorps anti ZP3 porcine ne croisent pas non plus avec d'autres tissus chez la chienne (Barber and Fayrer-Hosken, 2000). Ces résultats indiquent que cette vaccination n'a probablement pas d'effet systémique (Barber and Fayrer-Hosken, 2000).

Cependant, dans certaines espèces comme la souris, les anticorps anti-pZP passent dans le placenta et le colostrum, induisant une stérilité des femelles nouveau-nés (Barber and Fayrer-Hosken, 2000).

Etude Bibliographique

Néanmoins selon les espèces, l'antigène utilisé et la durée de traitement, des problèmes sont apparus.

Tout d'abord, chez la souris le peptide utilisé a conduit à l'apparition d'une pathologie auto-immune ovarienne (Rhim et al., 1992). L'immunisation de chiennes avec une ZP3 porcine (pZP) induit des perturbations à long terme des cycles oestriques ainsi qu'un profil des hormones stéroïdes aberrant (Barber and Fayrer-Hosken, 2000). Chez le cerf de Virginie les femelles immunisées contre la pZP s'accouplent beaucoup plus tardivement (après la fin de la saison) certainement à une période où le taux d'anticorps diminue. Cependant les ovaires des biches immunisées ne montrent pas de maladie auto-immune (Kirkpatrick et al., 1997). Chez la jument, une immunisation à long terme induit une diminution de la production d'oestrogènes ovariens et du taux d'ovulation des juments (Kirkpatrick et al., 1997), ainsi qu'un taux d'oestrogènes urinaires élevé comme en oestrus, alors que la phase oestrale n'est jamais suivie par une phase lutéale (Barber and Fayrer-Hosken, 2000). Enfin, chez le ouistiti, l'infertilité induite par l'immunisation est associée à une perte de la fonction ovarienne caractérisée par une perte des follicules primordiaux. Cette pathologie apparaît après plus d'un an de traitement (Aitken et al., 1996). Une immunisation de babouins avec la ZP3 porcine induit une forte diminution du nombre de follicules à antrum, ainsi qu'une chute des taux d'oestrogènes sanguins (Barber and Fayrer-Hosken, 2000).

En résumé, la pathologie ovarienne induite par une immunisation à long terme contre ZP3 est caractérisée par une perte prématurée de la fonction ovarienne associée à la mort des follicules primordiaux. Par la suite, l'ovaire ne revient pas à un état physiologique (Paterson et al., 2002). Cette pathologie n'est pas évitée par l'utilisation d'antigènes déglycosylés chez le babouin ou le ouistiti, suggérant une implication de la partie peptidique de l'antigène (Paterson et al., 2002). Par ailleurs, plus le titre d'anticorps est élevé, plus la pathologie ovarienne apparaît précocement (Paterson et al., 2002). Ces pathologies auto-immunes peuvent être associées à une infiltration leucocytaire dans l'ovaire.

En conclusion, les pathologies induites par des vaccinations à long terme ne font pas des vaccins dirigés contre la zone pellucide un bon modèle pour une immuncontraception réversible. De plus ils ne peuvent être administrés qu'à des femelles.

3.1.3 Protéines spermatiques et immunocontraception

Les protéines de la membrane spermatique offrent la possibilité théorique de pouvoir immuniser les mâles comme les femelles. En effet, les protéines spermatiques vont être reconnues comme étrangères vis-à-vis du système immunitaire femelle, mais également vis-à-vis du système immunitaire mâle en raison de l'existence de la barrière hémato/testiculaire-épididymaire (Cyr et al., 2002). De plus, le risque de pathologie auto-immune chez la femelle est faible, puisque l'antigène n'est produit que chez le mâle. Cependant le spermatozoïde ne peut pas être utilisé dans son entier pour une immunocontraception, car il possède des antigènes communs avec les cellules somatiques.

Un certain nombre de protéines spermatiques ont déjà été utilisées pour des vaccinations contraceptives chez l'animal ou l'homme. Ces différentes études sont résumées dans le tableau 1. Parmi ces différents essais, certains sont présentés plus en détail ci-dessous.

❖ FA-1

La protéine FA-1 (fertilization antigen 1) est une glycoprotéine qui existe sous forme de dimère (51 ± 2 kDa) ou de monomère (23kDa), localisée sur la membrane plasmique des cellules germinales mâles (Kadam et al., 1995). Elle se développe dans les derniers stades de la spermatogenèse, et est donc cachée du système immunitaire par la barrière hémato-testiculaire. Elle est impliquée dans la capacitation, et la réaction acrosomique. De plus elle possède des résidus phosphotyrosine capables d'auto-phosphorylation (Kadam et al., 1995), et se lie à la protéine ZP3 (Zhu and Naz, 1997).

Injectée à des souris (mâles et femelles), elle réduit leur fertilité de 70%, de même que chez la lapine, sans perturber la motilité spermatique (Naz, 1999; Naz and Zhu, 1998). En fait, les anticorps anti-FA-1 bloquent la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide chez l'homme, confirmant l'implication de cette protéine dans la reconnaissance et la liaison à la zone pellucide (Kadam et al., 1995).

Après diminution du titre d'anticorps suite à l'arrêt des immunisations, la fertilité des animaux revient à un niveau habituel, avec des portées en bonne santé.

❖ LDH-C4

La lactate déshydrogénase C4 (LDH-C4), est une isozyme de la LDH, trouvée exclusivement dans les gamètes mâles (Goldberg, 1990). Elle présente une affinité plus importante pour le lactate (substrat énergétique préféré des spermatides rondes) que les isoformes somatiques (Hogrefe et al., 1987). L'immunisation de femelles lapins, babouins, souris, avec la LDH-C4

réduit leur fertilité (Goldberg, 1990). L'immunisation de babouins mâles avec un épitope de LDH-C4 activant les lymphocytes B ne provoque pas de pathologie auto-immune du testicule ; et les spermatozoïdes de ces animaux montrent une capacité plus faible à se lier à la zone pellucide (Goldberg et al., 2001).

❖ **P26h**

Des hamsters mâles immunisés avec la protéine épидидymaire P26h montrent une réduction de leur fertilité de 20 à 25% (Gaudreault et al., 2002) due à l'inhibition de la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide par les anticorps produits (Bérubé and Sullivan, 1994). La présence de ces anticorps anti-P26h dans le tractus génital mâle de hamsters ne perturbe pas la spermatogenèse ni la motilité spermatique. Par ailleurs, ces anticorps ne réagissent pas avec d'autres tissus ou organes que l'épididyme (Bérubé and Sullivan, 1994), et aucune différence anatomique n'existe entre les testicules et les épидидymes de hamsters immunisés contre P26h et ceux d'animaux contrôles (Bérubé and Sullivan, 1994). La présence d'anticorps anti-P26h n'induit aucune pathologie des tissus du système reproducteur, ni aucune altération des spermatozoïdes épидидymaires (Gaudreault et al., 2002). Par ailleurs aucune réponse des cellules T cytotoxiques n'a été détectée (Gaudreault et al., 2002).

❖ **DE**

La glycoprotéine DE est synthétisée par l'épithélium des segments proximaux de l'épididyme de façon androgéno-dépendante, et sa sécrétion lui permet de s'associer au spermatozoïde au cours du transit épидидymaire (Perez Martinez et al., 1995). Elle appartient à la famille des CRISP (Cysteine Rich Secretory Protein) (Cohen et al., 2000). Cette protéine intervient dans la fusion des membranes plasmiques spermatiques et ovocytaires. Des immunisations de rat contre cette protéine épидидymaire entraîne une infertilité des mâles comme des femelles (Perez Martinez et al., 1995) en diminuant la capacité des spermatozoïdes à pénétrer l'ovocyte sans perturber leur capacité à se lier à l'ovocyte (Ellerman et al., 1998).

Les anticorps dirigés contre DE ne présentent pas de réaction croisée avec d'autres organes du tractus génital (Perez Martinez et al., 1995). D'autre part, la présence d'anticorps anti-DE dans l'épididyme ne perturbe pas la synthèse, la sécrétion, ou l'association au spermatozoïde de cette protéine (Ellerman et al., 1998). De plus, ces anticorps ne perturbent pas la motilité, la viabilité, la capacité à réaliser la capacitation ou la réaction acrosomique *in vitro* (Ellerman

et al., 1998). Par ailleurs, après six mois de traitements, les rats ne présentent pas d'altérations testiculaire, épидидymaire, ou du canal déférent (Perez Martinez et al., 1995).

DE présente les caractéristiques d'une bonne cible immunocontraceptive. En effet, elle est spécifiquement épидидymaire, elle est localisée à la surface du spermatozoïde avant et après la capacitation, elle participe à un événement important de la fécondation, et elle induit une réponse immunitaire réversible quand elle est injectée à des mâles comme à des femelles (Perez Martinez et al., 1995).

En résumé, les vaccins contraceptifs utilisant des antigènes spermatiques permettent d'immuniser des mâles et des femelles. De plus, si l'on cible des protéines acquises en dehors du testicule, il ne peut y avoir de perturbation de la fonction testiculaire (spermatogenèse, fonction endocrine). Dans les essais ci-dessus, les vaccins n'ont pas conduits à l'apparition de pathologies particulières et/ou d'effet secondaire détectable.

3.2 Induction de l'immunocontraception

L'existence d'une barrière hémato-épидидymaire permet d'isoler les spermatozoïdes (et les protéines de sa surface) du système immunitaire. Ceci est indispensable du fait de l'apparition de ces protéines après la mise en place du système immunitaire. Cette barrière hémato-épидидymaire (comme hémato-testiculaire) est constituée par la présence de jonctions serrées, soit entre les cellules principales épидидymaires à leur pôle apical, soit entre les cellules de Sertoli. Les caractéristiques des complexes jonctionnels apicaux entre les cellules principales de rat adulte varient entre les différentes régions épидидymaires. Dans le segment initial, le complexe jonctionnel est composé d'une jonction serrée étendue contenant peu de desmosomes, alors que dans les autres régions de l'épididyme, la surface de la jonction serrée est moindre, avec plus de desmosomes (Cyr et al., 2002). Ces jonctions serrées servent aussi à maintenir une frontière entre les membranes apicale et basolatérale, pour garder une polarité cellulaire.

Par ailleurs, le tractus génital (mâle et femelle) est tapissé de muqueuses présentant des tissus lymphoïdes associés (MALT : Mucosae Associated Lymphoid Tissue). En effet, des

monocytes, des macrophages, des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes T sont présents dans l'épithélium de l'épididyme de mammifère, ainsi que dans les glandes urétrales, la prostate, et les vésicules séminales chez l'homme et la souris (Fujihashi et al., 2001; Serre and Robaire, 2002; Wu et al., 2000). Ces différents types cellulaires sont aussi retrouvés dans le vagin, l'utérus et les trompes de Fallope. Dans ces MALT existe un type cellulaire particulier appelé cellules M. Ces cellules M captent par endocytose ou phagocytose les antigènes présents dans la lumière. Ces antigènes sont transportés à travers les cellules M par transcytose et libérés directement près des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et des lymphocytes du système immunitaire muqueux. En effet, au niveau de leur surface basale, la membrane des cellules M, fortement repliée, entoure des lymphocytes et des CPA.

La meilleure voie d'immunisation pour induire une réponse au niveau du tractus génital consiste donc à administrer le vaccin au niveau d'une muqueuse. En effet, une vaccination muqueuse induit une production locale d'anticorps et une mémoire immunologique importantes pour la défense dans le tractus génital. Plus précisément, les meilleures voies d'immunisation sont nasale ou orale (Bergquist et al., 1997; Mestecky and Russell, 2000). En effet, une immunisation intranasale induit une réponse vaginale plus forte qu'une immunisation vaginale. Après une immunisation intranasale des cellules productrices d'IgA et d'IgG apparaissent dans le tissu vaginal, signifiant que la majorité des IgA sont produites localement et ne proviennent pas du sérum. Les IgG viennent probablement à la fois de ces cellules et du sérum (Mestecky and Russell, 2000). Chez la souris mâle, des IgA sont retrouvées dans le fluide prostatique (Hickey et al., 2004).

Un autre point important de l'immunisation muqueuse est le choix de l'adjuvant. Un adjuvant pour une immunisation muqueuse doit dans un premier temps résister à l'environnement muqueux qui contient des enzymes protéolytiques, et doit être capable de conduire l'antigène à travers la couche de mucus jusqu'au site contenant les CPA, pour induire une réponse immunitaire plutôt qu'à une tolérance.

Seuls certains adjuvants sont efficaces dans l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse, dont la toxine cholérique, certaines séquences d'ADN, et les complexes immuno-stimulants (ISCOM) (Grdic et al., 1999).

- La sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) est un immunogène muqueux. Elle peut être utilisée comme adjuvant (ajoutée à la préparation vaccinale), ou comme protéine porteuse. Le couplage d'un antigène à la CTB augmente la production d'IgA

sécrétoire dans la plupart des sécrétions, ainsi que la production d'IgG circulantes (Mestecky et al., 1997). Cette protéine favoriserait la capture de l'antigène par les cellules M (Mestecky et al., 1997). Par ailleurs, la sous-unité B de la toxine cholérique induit une réponse immunitaire innée (Grdic et al., 1999).

Chez la femme, une vaccination intranasale induit une réponse vaginale une semaine après l'administration en utilisant la sous-unité B de la toxine cholérique comme adjuvant. Cette réponse persiste six mois après l'immunisation (Bergquist et al., 1997). Une immunisation intranasale de souris utilisant la CTB comme protéine de couplage induit des taux élevés d'IgA et d'IgG dans le fluide vaginal, des IgA dans la salive, des IgA et IgG dans le sérum, ainsi qu'au niveau prostatique (Hickey et al., 2004; Russell, 2002).

- Les complexes immuno-stimulants (ISCOM) ont une structure de type cage de 40nm, icosaédrique, composée de saponine et de cholestérol (fig.20). L'assemblage de la structure et l'incorporation de l'antigène sont facilités par l'addition de phospholipides. Ces particules peuvent intégrer des antigènes hydrophobes, mais aussi des molécules non amphipathiques (en modifiant leur structure). On peut aussi lier une extension de type acide gras à l'antigène pour l'ancrer dans l'ISCOM, ou attacher de façon covalente l'antigène à l'ISCOM (Hu et al., 2001).

L'un des avantages de l'ISCOM est qu'il nécessite moins d'antigène que les autres adjuvants pour une réponse immunitaire équivalente.

Les ISCOM sont probablement intégrés dans la cellule par des mécanismes non spécifiques tels que la phagocytose. Ils induisent une réponse immunitaire innée, et la production d'IL-12 qui contrecarre le phénomène de tolérance orale (Grdic et al., 1999).

- Un autre type d'adjuvant pour l'immunisation muqueuse est une séquence ADN CpG non méthylée sous forme de didéoxynucléotides (Gallichan et al., 2001). Cet ADN protège les cellules B de l'apoptose et les pousse à produire des Ig et des cytokines (Gallichan et al., 2001). Ces séquences ADN utilisées comme adjuvant pour une immunisation intranasale induisent une forte réponse systémique et muqueuse dont une forte réponse cellulaire et humorale dans le tractus génital de souris femelles (Gallichan et al., 2001).

Etude Bibliographique

- Pour l'immunisation orale, on peut aussi utiliser des capsules de gélatine recouvertes de substances qui se solubilisent à pH acide (gastrique) (Mestecky et al., 1997).

Deux voies d'immunisations sont donc particulièrement efficaces pour produire des anticorps au niveau du tractus génital ; les voies orale et nasale. Par ailleurs différents adjuvants peuvent être utilisés pour stimuler la réponse immunitaire, et favoriser une réponse innée.

Nous avons vu que l'augmentation des connaissances sur la maturation épидидymaire pouvait bénéficier à plusieurs domaines appliqués, dont la cryoconservation du sperme, et l'immunocontraception.

La maturation épидидymaire induit, entre autres modifications, l'acquisition ou la modification de protéines à la surface du spermatozoïde. Nous nous sommes intéressés aux protéines de spermatozoïdes matures (de la queue épидидymaire) de différentes espèces, pour des études à visées appliquées.

Une des protéines que nous avons étudiée est la protéine GPX5 (modèle d'étude du laboratoire). Cette enzyme antioxydante est exprimée uniquement dans l'épididyme, et elle est aussi localisée à la surface du spermatozoïde de souris (Jimenez et al., 1990; Jimenez et al., 1992; Vernet et al., 1997). Sa fonction antioxydante pourrait en faire une cible intéressante dans la lutte contre les dommages provoqués par le stress oxydant lors de la cryoconservation du sperme. C'est dans cette optique que nous avons étudié cette protéine chez deux espèces pour lesquelles la cryoconservation est très employée. Par ailleurs, sa restriction d'expression épидидymaire, son expression majoritaire et sa localisation à la membrane du spermatozoïde pourrait la classer dans les antigènes spermatiques intéressants pour une immunocontraception. C'est pourquoi nous avons étudié cette protéine chez un rongeur nuisible très présent dans la région, en vue de la mise au point d'un vaccin contraceptif. D'autres protéines déjà utilisées dans cet objectif d'immunocontraception chez d'autres espèces ont aussi été étudiées. De plus, nous avons utilisé en parallèle une approche sans *a priori* pour tenter de trouver d'autres antigènes spermatiques susceptibles d'être des cibles pour une immunocontraception.

4 Contexte des études

La première partie de ce travail a concerné l'étude de la protéine GPX5 chez deux espèces d'intérêt agronomique, dans le but d'améliorer la cryoconservation du sperme de ces espèces.

La deuxième partie de l'étude a été consacrée à la mise au point d'un vaccin contraceptif visant à limiter les pullulations d'un rongeur sauvage nuisible.

4.1 La cryoconservation du sperme chez des espèces d'intérêt agronomique

Chez les espèces d'intérêt agronomique, la sélection des reproducteurs et par voie de conséquence la conservation du sperme est très développée. C'est le cas notamment pour les taureaux et les étalons. Le sperme peut être gardé quelques jours à 4°C, ou congelé. Quel que soit la méthode utilisée, le sperme est soumis à un stress oxydant.

A l'heure actuelle, aucune méthode de conservation n'est totalement efficace, et nécessite une quantité de spermatozoïdes beaucoup plus importante que lors d'insémination avec du sperme frais. Par ailleurs, il n'y a pas de milieu de conservation consensuel (pour une même espèce). De plus, le sperme de certains individus ne peut pas être conservé, sous peine de perdre son pouvoir fécondant (Holt, 2000; Thurston et al., 2002).

Toutes ces observations nous ont amené à nous intéresser à une protéine anti-oxydante susceptible d'être présente dans le sperme de ces animaux, GPX5, dans le but d'utiliser cette enzyme dans les milieux de conservation du sperme. En effet, l'objectif est de pouvoir ajouter cette protéine propre à l'espèce dans le milieu de conservation en remplacement, ou en complément, des agents exogènes utilisés aujourd'hui.

4.2 Immunocontraception d'un rongeur sauvage; *Arvicola terrestris* Scherman

4.2.1 Le campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman

4.2.1.1 Biologie du campagnol terrestre

Le campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman (ou rat taupier, Mammalia, Rodentia, famille des Muridae, sous-famille des Arvicolinae) est un rongeur fouisseur vivant dans les régions de moyenne montagne (400-1500m). Un animal adulte pèse environ 100g, mesure 20cm (15cm pour le corps, 5cm pour la queue), et possède un pelage allant du brun au noir

(fig.21). Ces animaux n'hibernent pas, et leur période de reproduction s'étend globalement de mars à novembre. Les portées sont en moyenne de quatre petits avec une gestation de 21 jours, sans anoestrus de lactation. Les petits sont fertiles dès l'âge de 6 semaines. Ces animaux vivent en couple avec les petits d'une à deux générations (Airoldi, 1979).

Le campagnol terrestre creuse ses galeries à l'aide de ses incisives (Sellami, 1983). La terre est excavée sous forme de tumuli assez semblables à des taupinières (fig.22). D'ailleurs, à faible densité le campagnol colonise le réseau de taupe.

Ces animaux sont à la fois diurnes et nocturnes. Le rythme circadien, de caractère polyphasique, comprend six phases d'activité et de repos sur 24 heures (Airoldi, 1979).

Les pullulations de ce rongeur nuisible présentent des variations cycliques d'environ 6 ans, avec des densités passant de 50-100 animaux par hectare à plus de 1000 individus/ha (fig.23) (Pascal and Boujard, 1987). A l'heure actuelle, les causes de ces pullulations comme celles des chutes de populations demeurent inconnues.

4.2.1.2 Dégâts et incidences économiques du campagnol terrestre

Le campagnol terrestre consomme les parties souterraines ou aériennes de différents végétaux, ce qui diminue la quantité d'aliment immédiatement disponible pour les animaux dans les pâtures, et réduit la quantité de foin produite et utilisée pendant l'hiver. L'incidence du campagnol terrestre s'effectue à plusieurs niveaux :

- destruction des prairies naturelles ; la présence de tumuli de terre empêche l'herbe de repousser. Lorsque les pullulations perdurent, les prairies peuvent nécessiter d'être replantées, voire labourées avant d'être replantées. Cette intervention fait passer des prairies naturelles en prairies artificielles.
- lait impropre à la consommation ; les tumuli de terre conduisent à la présence de terre dans le fourrage. Si cette terre ne rend pas les vaches malades, elle entraîne la présence de spores butyriques dans le lait, qui le rend impropre à la consommation.
- pertes économiques directes. La présence de terre entraîne une usure accélérée du matériel, ainsi que des pertes de temps induites par les travaux supplémentaires pour remettre les parcelles en état. Par ailleurs, la diminution de production de fourrage nécessite des achats pour compenser cette perte de volume. Au plan quantitatif, des pullulations d'intensité moyenne intervenant durant des années climatiques favorables ont un impact modéré sur les récoltes (diminution de 15%

des récoltes), comparable à celui induit par des conditions climatiques défavorables. Des pullulations de durée et d'amplitude plus élevées et intervenant durant des périodes climatiques défavorables, ont un impact plus important, estimé à une perte d'environ la moitié des récoltes (Quéré, 1999).

- transmission d'un pathogène. Ces animaux sont porteurs d'une maladie appelée échinococcose alvéolaire (Bonnin et al., 1986). Elle est provoquée chez l'homme par le développement de la larve du ténia échinocoque. Cette larve se développe habituellement dans le foie qu'elle détruit, en plusieurs années. En absence de diagnostic, l'évolution de la maladie est comparable à celle d'un cancer : les organes voisins du foie sont progressivement infiltrés, et des métastases parasitaires peuvent emboliser le système vasculaire et se développer à distance au niveau des poumons, du système nerveux central, des muscles, des os.

4.2.1.3 Les moyens de lutte

A l'heure actuelle seuls deux moyens de lutte sont disponibles ; le piégeage, et l'empoisonnement.

Le piégeage est une technique efficace, mais très coûteuse en temps. L'empoisonnement utilise un anticoagulant chimique de la classe des coumarines, la bromadiolone (fig.24 a). Cette molécule est déposée sur des appâts (blé, carotte) enfouis dans des galeries artificielles (fig.24 b). Cependant, ces dernières années, la carotte a été abandonnée au profit du blé qui se conserve mieux. Ce produit n'étant pas spécifique d'*Arvicola terrestris*, de nombreux cas d'empoisonnement d'animaux ayant un régime alimentaire proche ou de prédateurs du campagnol ont été rapportés (des cas d'intoxications ont pu être montré par exemple sur des sangliers, chats, chiens, renards, hermines, oiseaux de proie) (Berny et al., 2002; Berny et al., 1997).

Le paysage et les pratiques agricoles actuels favorisant les pullulations de campagnols, des méthodes alternatives de lutte sont mises en place. En Auvergne, elles consistent à favoriser l'habitat des prédateurs du campagnol en replantant des haies, et à labourer les parcelles infestées. Parallèlement la région Auvergne a mis l'accent sur le développement de nouvelles stratégies de lutte biologique.

En nous basant sur des études précédentes d'immunisation d'animaux sauvages, nous avons envisagé de mettre au point une immunocontraception ciblant ce rongeur.

Etude Bibliographique

L'immunocontraception dirigée contre *Arvicola terrestris* Scherman nécessite de cibler à la fois les mâles et les femelles, et de produire des anticorps au niveau du tractus génital. Nous avons donc travaillé sur des antigènes spermatiques qui nous permettraient d'immuniser les deux sexes, et d'avoir une plus grande spécificité d'espèce.

MATERIEL ET METHODES

1 Animaux et tissus

1.1 Cheval-Taureau

Les épидidymes et testicules bovins ont été obtenus à l'abattoir de Clermont-Ferrand, alors que les tissus équinés sont le produit de castrations effectuées par le Dr Chambéry (Clermont-Ferrand).

1.2 Campagnols terrestres

Les campagnols terrestres ont été capturés sur les départements du Puy de Dôme, du Cantal et de la Haute-Loire, entre les mois de février et de novembre. Les sites de piégeages sont choisis en se référant aux cartes de densité de populations du site CampaNET (www.neotic-services.com/campanet, réseau d'observation des campagnols, Service Régional de la Protection des Végétaux 63, fig.25).

La présence de campagnol est détectée par l'existence de tumuli de terre, et les galeries sont repérées à l'aide d'un sondeur (tige métallique munie d'une poignée, fig.26). L'entrée de la galerie est dégagée, et un piège est posé dans l'ouverture. L'entrée de la galerie est ensuite recouverte par une motte de terre pour limiter la luminosité et les courants d'air. Le piège (piège campagnol, Besançon Techniques Services, Besançon France) consiste en une boîte rectangulaire métallique de 25cm de long, 8cm de hauteur et de largeur. Quand l'animal pénètre dans le piège, il marche sur une trappe qui déclenche la fermeture du piège. Les animaux sont ensuite transférés dans une enceinte où l'on a préalablement placé un coton imbibé d'halothane (Belamont, Boulogne Billancourt, France), afin de les anesthésier. Ils sont alors sexés et pesés. Les animaux dont le poids est supérieur à 65g sont considérés comme adultes (Morel, 1981). Ces animaux étant classés comme nuisibles, ceux qui ne sont pas gardés sont sacrifiés sur place par dislocation cervicale. Pour les prélèvements d'organes, les animaux sont sacrifiés par inhalation de CO₂ suivie d'une dislocation cervicale.

2 Production d'anticorps

2.1 Anticorps anti-GPX5 interspécifiques

Des lapines ont été injectées, par voie sous-cutanée, avec un peptide spécifique de la protéine GPX5 et commun à toutes les espèces pour lesquelles cette protéine avait été séquencée à ce

jour (fig.27). Ce peptide (NH₂-VHDIRWNFEKFLV-COOH, Eurogentec, Belgique) a été couplé à son extrémité N-terminale à la protéine KLH (Eurogentec). La première injection a été effectuée avec 100µg de peptide couplé, dilué dans 500µL de NaCl 0,9% (m/v), associé à un volume égal d'adjuvant complet de Freund (Sigma Chemical Corp., St Louis, MO, USA). Les deux rappels ont été effectués à quatre semaines d'intervalles en utilisant de l'adjuvant incomplet de Freund.

Les sérums obtenus ont été purifiés par épuisement des anticorps non spécifiques contre la KLH par chromatographie d'affinité sur une colonne d'ACA Ultrogel (BioSeptra). Les anticorps dirigés contre GPX5 ont été élués par une solution de PBS 1X (NaCl 137mM ; KCl 2,6mM ; Na₂HPO₄ 10mM ; KH₂PO₄ 1,7mM ; pH 7,4).

2.2 Anticorps dirigés contre les protéines spermatiques d'Arvicola terrestris Scherman

Des queues épидидymaires ont été prélevées après euthanasie des animaux, et dilacérées dans du PBS 1X. Les spermatozoïdes sont soumis à deux centrifugations dans du PBS pendant 1min à 100g, et enfin centrifugés 5min à 1000g, avant d'être repris dans un mélange PBS/adjuvant (v/v).

Des lapines ont été immunisées par voie sous-cutanée avec des spermatozoïdes entiers (50.10⁷ spermatozoïdes/animal/injection). Deux rappels ont été effectués à trois semaines d'intervalle. L'adjuvant a été utilisé comme décrit ci-dessus.

2.3 Production d'anticorps dans le tractus génital de souris

Des souris ont été immunisées par voies gastrique et orale afin de produire des anticorps au niveau de leur tractus génital. Le peptide, spécifique de GPX5, utilisé (NH₂-TPRPEKMKMDCYKDV-COOH) était couplé à la BSA. Les immunisations ont été effectuées sur des souris préalablement anesthésiées à l'avertine (Sigma), par injection intrapéritonéale. Pour les immunisations par voie nasale, chaque animal a reçu 20µg de peptide couplé ou de BSA (contrôle), dilué dans du NaCl 0,15M, avec 2,5µg de sous unité B de toxine cholérique comme adjuvant (réparti dans les deux narines par l'intermédiaire d'une pipette munie d'un cône à bout plat). Pour les immunisations par voie gastrique, les animaux ont été gavés avec 20µg de peptide couplé ou de BSA, dilué dans du Na₂CO₃ 3% (m/v) associé à 5µg de toxine cholérique.

Trois immunisations ont été effectuées à 12 jours d'intervalles, et les animaux ont été sacrifiés une semaine après la dernière injection. Avant de récupérer différentes sécrétions du tractus génital, les animaux ont été exsanguinés par perfusion avec une solution de PBS 1X ; héparine 0,1% (v/v) (Sanofi-Synthélabo, Paris, France), afin d'éviter les contaminations sanguines des sécrétions.

3 Déglycosylations protéiques

3.1 O-déglycosylation

Quinze microgrammes de protéines, dosées selon la méthode de Bradford (1976), sont incubés avec 1U de O-glycosidase en présence du tampon spécifique (Sigma). La déglycosylation se déroule sur la nuit à 35°C.

3.2 Triple déglycosylation

Quinze microgrammes de protéines sont déglycosylées (O-glycanase, N-glycanase, sialidase A) en conditions dénaturantes, avec le kit « enzymatic deglycosylation kit » (PROzyme, Europa Bioproducts LTD, United Kingdom) selon les recommandations du fabricant.

4 Electrophorèses protéiques

4.1 Electrophorèse mono-dimensionnelle

4.1.1 A partir de protéines épидидymaires ou testiculaires

Les tissus sont homogénéisés au broyeur électrique (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) dans une solution de Tris 50mM ; EDTA 1mM (TE). Quinze microgrammes de protéines sont dénaturées 5min à 100°C avant d'être séparées sur un gel à 12% d'acrylamide (Vernet et al., 1997). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Whatman) (Vernet et al., 1997).

4.1.2 A partir de protéines spermatiques

Les queues épидидymaires sont dilacérées dans une solution de TE, puis centrifugées 1min à 100g afin d'éliminer les débris tissulaires. Le surnageant est récupéré et centrifugé 5min à 500g. Le surnageant contient les protéines du fluide épидидymaire. Le culot est repris dans

100µL de TE, et soumis à deux nouvelles centrifugations (800g, 5min) pour laver les spermatozoïdes.

Les spermatozoïdes sont ensuite soniqués à 50% de cycle actif (Vibra Cell, Bioblock Scientific) 3 fois 30 secondes à 4°C, puis centrifugés 10min à 10000g et 4°C. Le surnageant contient les protéines solubles et faiblement liées à la membrane. Le culot est traité 1h au Triton X-100 (Sigma) 1% (v/v) à 4°C, et centrifugé. Le surnageant obtenu contient les protéines fortement ancrées dans les membranes.

4.2 Electrophorèse bi-dimensionnelle

Les électrophorèses bidimensionnelles ont été réalisées sur des protéines membranaires spermatiques. Pour cela, deux méthodes d'extraction des protéines membranaires ont été utilisées.

La première méthode (méthode A) nécessite de soniquer (comme précédemment décrit) les spermatozoïdes, puis de soumettre le culot à des solutions de plus en plus stringentes (solution I : urée 8M ; CHAPS 4% (m/v) ; DTT 100mM ; Tris 40mM pH9,5, ampholytes 0,5% (v/v), solution II : urée 5M ; thiourée 2M ; CHAPS 2% (m/v) ; SB3-10 2% (m/v) ; TBP 2mM ; Tris 40mM pH9,5, ampholytes 0,5% (v/v), solution III : SDS 1% (m/v) ; Tris-HCL 0,375M pH8,8 ; DTT 50mM ; glycérol 25% (v/v)) (Molloy et al., 1998).

La deuxième méthode (méthode B) consiste à extraire les protéines du culot issu de la sonication par un kit commercial (ReadyPrep Protein Extraction Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Par la suite, un kit de dessalage et de concentration de protéines (ReadyPrep 2D Cleanup Kit, Bio-Rad) peut-être utilisé, afin d'optimiser la composition de l'échantillon avant l'isoélectrofocalisation (IEF).

L'IEF est réalisée avec des bandelettes de 17cm (Bio-Rad), pH 3-10. Dans un premier temps, les bandelettes sont réhydratées de façon passive, avec 250µg de protéines, pendant 6 à 8h, à température ambiante, dans une solution d'urée 8M ; CHAPS 4% (m/v) ; DTT 20mM ; Biolytes 0,3% (v/v) ; bleu de bromophénol, avec un appareil PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad). Les conditions de focalisation utilisées sont : 250V rapide pendant 15min, 10000V linéaire durant 5h, 10000V rapide jusqu'à 60000Vh.

Matériel et Méthodes

Les bandelettes sont ensuite ré-équilibrées 15min dans une solution d'urée 6M ; SDS 2% (m/v) ; Tris-HCl 0,375M pH8,8 ; glycérol 20% (v/v) ; DTT 130mM, puis dans une solution où le DTT est remplacé par de l'iodoacétamide à 135mM.

La deuxième dimension est réalisée sur un gel à 12% d'acrylamide (dans le Protean XL Cell, Bio-Rad). La migration est réalisée à 70mA et 350V.

Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie colloïdal (Bio-Rad) suivant les recommandations du fabricant, où transférés sur membrane de nitrocellulose.

5 Western blot

Les membranes sont lavées trois fois 5min au TBS 1X (NaCl 0,2M ; Tris HCl pH 7,4 50mM), puis saturées 1h dans une solution TBS 1X ; Tween 0,2% (v/v) ; Régilait 10% (m/v). La membrane est rincée dans du TBS avant d'être incubée avec les anticorps (1/1000) dirigés contre les protéines spermatiques de campagnol, avec les anticorps anti-GPX5 (1/100), ou avec les anticorps anti-GPX5 ayant préalablement adsorbé leur peptide spécifique par une incubation de 5mg de peptide toute la nuit à 4°C avec 1mg d'anticorps. Les membranes sont à nouveau lavées trois fois, saturées 30min, puis incubées avec l'anticorps secondaire (anti-IgG) couplé à la peroxydase, dilué au 20000^{ème} (Amersham Biosciences, UK) .La détection est réalisée avec le système ECL (Amersham).

6 MALDI-TOF

Un spectromètre de masse est essentiellement constitué de trois composants : une source d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur (fig.28). La source d'ionisation convertit la molécule à analyser en ions en phase gazeuse. Ces ions une fois créés sont séparés dans l'analyseur de masse en fonction de leur rapport masse (m) sur charge (z). Les résultats de spectrométrie de masse sont traduits sous forme de spectres montrant l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z.

Les échantillons analysés par MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry) sont mélangés avec une matrice. L'échantillon est alors placé dans la source d'ionisation. Un laser vient frapper l'échantillon qui subit une désorption. L'énergie du laser entraîne le passage sous forme gazeuse de l'échantillon. Les ions produits sont accélérés dans l'analyseur de masse (fig.29). Les ions passent ensuite dans

un analyseur à temps de vol ; plus la masse de l'ion est importante, plus son temps de vol est long pour atteindre le détecteur.

L'hydrolyse d'une protéine par une protéase produit différents peptides qui correspondent à l'empreinte unique de cette protéine. En général les peptides possèdent une seule charge, et donnent donc un seul pic dans le spectre m/z. Cette méthode est utilisée pour analyser l'ensemble des peptides générés par la digestion tryptique d'une protéine sur gel (fig.30).

Cette méthode est la méthode de choix pour l'identification de protéines, car elle est simple et sensible (femtomole).

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées dans la plateforme protéomique à l'INRA de Theix, par M. CHAMBON. Les résultats ont été analysés avec les logiciels ProFound Mapping et Mascot (Perkins et al., 1999).

7 Extraction d'ARN et Northern blot

Les organes (canaux efférents, épидидymes, testicules) ont été homogénéisés avec un Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) dans du Trizol Reagent (Invitrogen). Les extractions d'ARN ont été effectuées selon les recommandations du fabricant, et repris dans de l'eau. La concentration et la pureté des échantillons ont été testées par spectrophotométrie à 260 et 280nm. La migration et le transfert des ARN ont été effectués selon un protocole standard (Sambrook et al., 1989). L'hybridation a été réalisée comme décrit par Schwaab et al. (1995). La standardisation des dépôts a été vérifiée en utilisant une sonde ARNr 18S.

8 RT-PCR, RACE

Cinq microgrammes d'ARN totaux ont été rétro-transcrits à l'aide d'une amorce oligo(dT)₁₇ à 42°C pendant 1h par l'ImProm II Reverse Transcriptase (RTase) (Promega, Charbonnières, France). Les ADNc ont ensuite été amplifiés avec des oligonucléotides dégénérés.

La séquence des oligonucléotides permettant d'amplifier GPX5 a été déduite d'un alignement de l'ensemble des séquences protéiques disponibles. Quant aux autres amorces, leur séquence a été déterminée grâce au logiciel CODEHOP (Rose et al., 1998). Les séquences de ces différents oligonucléotides sont résumées dans le tableau 2.

Les PCR ont été réalisées avec 20pmol de chaque amorce, et 0,5U de Taq DNA polymérase (Bioline, Abcys, Paris, France). Les amplifications de GPX5 ont été réalisées comme décrites

par Dufaure et al. (1996). Les autres amplifications ont été faites dans des conditions de touchdown PCR (Don et al., 1991), adaptées à l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés.

Pour l'obtention des extrémités 5' et 3' des séquences GPX5 bovines et équines, la technique de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) a été utilisée, par l'intermédiaire du kit Smart Race cDNA amplification (Clontech), selon les instructions du fabricant. Les séquences des oligonucléotides spécifiques de chaque espèce sont résumées dans le tableau 3.

9 Sous-clonage et séquençage

Les produits amplifiés ont été sous-clonés dans des vecteurs TOPO TA (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon les recommandations du fabricant. Les fragments sous-clonés ont été séquencés (MWG, Courtaboeuf, France).

10 Immunohistochimie

Les épидидymes équins et bovins ont été disséqués selon leurs différentes régions (Nicander, 1957) (fig.31), alors que les épидидymes de campagnol ont été gardés dans leur intégrité (fig.32). De même, les testicules équins et bovins ont été fragmentés, contrairement à ceux de campagnols.

Les tissus (125mm³) ont été fixés dans une solution de Carnoy (EtOH 75% (v/v) ; acide acétique 25%(v/v)) pendant 1h, puis déshydratés 4 fois 15min dans de l'éthanol, puis dans 3 bains de butanol. Les tissus ont ensuite été inclus dans de la paraffine (Paraplast, SIGMA, St Quentin Fallavier, France). Les tissus ont été coupés en sections de 5µm, étalés sur des lames, puis chauffés à 60°C toute la nuit, avant d'être déparaffinés par 2 bains de 5min d'Histo-Clear (National Diagnostics, USA). Ces coupes sont ensuite réhydratées par des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes.

La détection des antigènes est réalisée à l'aide du kit Vector vectastain ABC (ABCYS) selon les recommandations du fabricant. Les peroxydases endogènes sont bloquées préalablement à la saturation des coupes, qui sont ensuite mises en présence de l'anticorps primaire. L'anticorps anti-GPX5 (ou l'anticorps ayant adsorbé son peptide spécifique) est dilué au 1/40, et incubé toute la nuit à 4°C avec les lames de tissus bovins et équins, les anticorps dirigés contre les spermatozoïdes de campagnol sont incubés au 1/20 pendant 1h à température ambiante. Les lames sont alors lavées, puis mises en présence de l'anticorps secondaire (couplé à une peroxydase). La révélation fait apparaître une coloration brune des tissus.

11 Immunofluorescence

Pour la détection d'antigènes spermatiques, des queues épидидymaires de campagnol ont été dilacérées dans une solution de fixation (PBS 1X ; formaldéhyde 2% (v/v)), et incubées 10min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 10000g, 10min, puis les spermatozoïdes sont lavés avec du PBS, puis étalés sur lames.

Les lames sont lavées 3 fois 5min dans du PBS. Les spermatozoïdes sont alors saturés 2h dans une solution PBS 1X ; BSA 2% (m/v). Ensuite ils sont incubés avec l'anticorps primaire (dirigé contre des antigènes spermatiques d'*Arvicola terrestris* (1/50), 1h à température ambiante, ou dirigé contre GPX5 pur toute la nuit à 4°C) dilué dans une solution PBS 1X ; BSA 1% (m/v) ; Tween 0,1% (v/v). Les lames sont lavées 3 fois avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire (anti IgG-TRITC au 1/100, Tebu, Le. Perray, France) dilué dans du PBS 1X, pendant 1h. Les lames sont lavées, puis montées avec un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield Hard set with DAPI, Vector, Burlingame CA, USA) et observées à l'aide d'un microscope Zeiss Axioplan 2 imaging microscope (Zeiss).

12 Test d'immunisation des souris

Les sécrétions génitales des souris immunisées par voies orale ou nasale ont été testées par slot blot (Slot Blot, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California, USA). Les sécrétions sont mises en présence de 1µg, 3µg ou 5µg du peptide seul, du peptide couplé, ou de 5µg BSA. Les sécrétions génitales sont utilisées comme anticorps primaires et les IgA sont recherchées par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Tebu, Le. Perray, France). La détection est réalisée avec le système ECL (Amersham Biosciences, UK).

RESULTATS

1 Caractérisation de la glutathion peroxydase 5 (GPX5) chez deux espèces d'intérêt agronomique ; le taureau et l'étalon

1.1 Génération d'anticorps anti-GPX5 interspécifiques

Afin d'étudier la protéine GPX5 chez l'étalon et le taureau, nous avons besoin d'anticorps capables de reconnaître cette protéine chez ces deux espèces. Pour cela, nous avons effectué un alignement de l'ensemble des séquences protéiques connues de GPX5, et nous avons recherché une séquence qui soit totalement conservée chez toutes ces espèces (chien, porc, homme, macaque, souris, rat). Nous avons sélectionné un peptide de treize acides aminés (NH₂-VHDIRWNFEKFLV-COOH). Nous avons, par ailleurs, vérifié que cette séquence n'était retrouvée dans aucune autre protéine (Altschul et al., 1990). Le peptide a été couplé à une protéine porteuse (KLH), et des lapins ont été immunisés.

Pour optimiser la spécificité des sérums obtenus, nous les avons purifiés contre la protéine de couplage (KLH).

Un western blot a été effectué à partir de protéines épидидymaires équinés et bovines. Pour confirmer la spécificité de la détection, nous avons en parallèle réalisé la même expérience en utilisant des antisérums ayant préalablement été épuisés contre leur peptide spécifique (contrôle).

Un sérum présenté fig.33 reconnaît spécifiquement une protéine de 23kDa chez le taureau. Cette protéine est localisée dans la tête épидидymaire, mais n'est pas détectée dans le corps ou la queue de l'organe. Aucune protéine équine n'est détectée par ce sérum. Les anticorps étant dirigés contre un peptide de synthèse, la présence d'oligosaccharide(s), ou de phosphorylation(s) (modifications post-traductionnelles) pourrait empêcher la reconnaissance ou la liaison de l'anticorps sur son épitope. Afin de vérifier que l'absence de détection de la protéine équine n'était pas due à la présence de sucres, nous avons soumis les protéines épидидymaires équinés à une O-déglycosylation, ou à une triple déglycosylation (O-, N-, acide sialique), avant le western blot. Là encore, aucune bande n'a été détectée par le sérum.

1.2 Obtention des séquences ADN de GPX5 spécifiques de ces deux espèces

Afin d'obtenir les séquences nucléiques de GPX5 spécifique de chaque espèce, nous avons

Résultats

dans un premier temps utilisé des oligonucléotides dégénérés afin d'amplifier la séquence interne de l'ADNc chez ces deux espèces. Par la suite, nous avons recherché les extrémités de ces séquences ADN par la technique de RACE (Apte and Siebert, 1993; Frohman et al., 1988). L'ADNc de GPX5 bovin a pu être obtenu dans son intégralité (fig.34, numéro d'accèsion : DQ058076). On peut noter que les positions -1, -2, et -3 entourant le codon initiateur sont conservées par rapport à la séquence de Kozack (1986). La taille de la séquence protéique bovine conceptuelle déduite de l'ADNc est compatible avec la taille de 23kDa de la protéine révélée en western blot (fig.33). Par contre, seules la région interne et l'extrémité 3' de l'ADN équin ont été obtenues (numéro d'accèsion : DQ058077).

L'alignement des séquences protéiques GPX5 équine et bovine déduites de la traduction conceptuelle des ADNc, avec les séquences disponibles à l'heure actuelle est illustré sur la figure 35. La séquence bovine (numéro d'accèsion : AAY58231) montre 87% d'identité avec la séquence porcine, et 78% avec la séquence de chien. Quant à la séquence équine partielle (numéro d'accèsion : AAY58232), elle présente 88% et 86% d'identité avec les séquences porcine et canine, respectivement. De plus, la séquence nucléique bovine présente 75 à 89% d'identité avec la séquence porcine et 74 à 83% d'identité avec le macaque. La séquence équine partielle présente 87% d'identité avec la séquence humaine, et 75 à 85% avec la séquence de singe.

La séquence du peptide ayant été utilisé pour produire les anticorps interspécifiques dirigés contre GPX5 est retrouvée totalement identique chez le cheval, alors qu'un acide aminé diffère pour le taureau (His remplacée par Arg) (fig.35). Cette différence de séquence n'interfère donc pas avec la reconnaissance de la protéine bovine en western blot. De plus, l'absence de détection de la protéine GPX5 chez le cheval, en western blot, ne peut pas être expliquée par une différence de séquence.

Comme pour la souris, espèce dans laquelle GPX5 est sécrétée, la séquence peptidique bovine possède un signal peptidique potentiel (fig.34) détecté par le logiciel SignalIP 3.0 (Bendtsen et al., 2004).

1.3 Localisation tissulaire

Un northern blot a été effectué avec des ARN totaux extraits de testicule, des trois régions de

Résultats

l'épididyme, et des canaux efférents. La sonde nucléique utilisée correspond à la séquence interne (obtenue grâce aux oligonucléotides dégénérés), pour chaque espèce (fig.35). L'homogénéité des dépôts a été visualisée par rapport à des hybridations réalisées avec une sonde d'ARN ribosomique 18S (fig.36). Les résultats montrent que chez l'étalon, l'ARNm de GPX5 est principalement exprimé dans les canaux efférents. Il est fortement exprimé dans le premier segment de la tête épидидymaire, et faiblement dans le reste de cette région. Le profil d'expression bovin est différent. En effet, l'expression majoritaire est retrouvée dans le segment II de la tête épидидymaire. L'intensité d'expression est moins forte dans les deux autres segments de la tête, et le corps. Cependant, il faut noter que le niveau d'accumulation du messenger de GPX5 est beaucoup plus faible chez le cheval que chez le bovin (temps d'exposition beaucoup plus élevé, pour une sonde similaire en taille, séquence et activité spécifique).

La localisation tissulaire de la protéine a ensuite été étudiée chez le taureau, par immunohistochimie (fig.37). La spécificité de la détection est assurée par un contrôle utilisant des anticorps ayant au préalable adsorbé leur peptide spécifique. En accord avec les résultats précédents, la protéine n'est pas détectée dans le testicule, ni les canaux efférents. Elle est très présente dans le cytoplasme des cellules épithéliales épидидymaires dans le segment II de la tête épидидymaire, et plus faiblement dans le segment III et le corps.

Dans le segment II de la tête épидидymaire, un marquage est aussi détecté dans la lumière du canal, associé aux spermatozoïdes, suggérant une sécrétion de la protéine dans le fluide épидидymaire, ce qui pouvait être supposé par la présence d'un peptide signal dans la séquence protéique.

Le marquage visible sur la couche musculaire entourant l'épithélium est aussi présent sur le contrôle négatif révélant une certaine aspécificité du signal.

Le gène GPX5 s'exprime dans l'épididyme équin et bovin. Contrairement à la souris où l'ARNm est retrouvé uniquement dans la tête de l'épididyme, le messenger est localisé dans toute la tête et le corps de l'épididyme bovin, et dans les canaux efférents et la tête épидидymaire équine. L'expression est donc moins restreinte chez ces deux espèces. D'autre part, la protéine est retrouvée principalement dans l'épithélium de la tête épидидymaire chez le taureau, et associée aux spermatozoïdes du segment II de la tête.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de la protéine GPX5 chez le cheval, probablement à cause d'un niveau d'expression trop faible pour la sensibilité de détection de la technique utilisée. Cette hypothèse est en accord avec la faible accumulation de l'ARNm de GPX5 observée chez l'étalon

Etant donnée sa localisation à la surface du spermatozoïde de souris (Jimenez et al., 1992; Vernet et al., 1997), la protéine GPX5 a aussi été étudiée dans une autre espèce de rongeur, *Arvicola terrestris* Scherman, comme antigène potentiel pour le développement d'une stratégie immunocontraceptive. D'autres protéines spermatiques ont aussi été étudiées en parallèle chez cette espèce, avec le même objectif.

2 Recherche d'antigènes spermatiques pour la mise au point d'un vaccin contraceptif pour *Arvicola terrestris* Scherman

2.1 Obtention des animaux

Les animaux ont été piégés entre novembre 2001 et juin 2005, en dehors des saisons hivernales. Les sites de piégeage ont été choisis en fonction des densités d'animaux dans les parcelles, grâce aux cartes du réseau campaNET, et aux observations d'organismes travaillant sur ce rongeur : la FREDON du Puy de Dôme, l'ENITA de Clermont-Ferrand, et la Chambre d'Agriculture du Cantal. Les statistiques des captures sont illustrées fig.38, en fonction de la période et du site de piégeage. Les résultats des piégeages dépendent principalement de la densité d'animaux sur la parcelle choisie. Un autre facteur entre en jeu, la météorologie. En effet, pendant l'hiver, même s'ils n'hibernent pas, les campagnols ont une activité réduite. C'est pourquoi les premiers piégeages du printemps sont très dépendants des conditions météorologiques : plus le printemps « tarde », plus les piégeages sont difficiles, car les animaux sont peu actifs. Ils restent donc dans certaines galeries sans explorer la totalité de leur territoire, et la probabilité qu'ils soient dans la galerie où le piège est posé est faible. Globalement, quelle que soit la saison la majorité des animaux capturés est adulte (>65g), et le *sex ratio* est en faveur des mâles (tableau 4).

2.2 Etude sans a priori

La première partie de ce projet a été menée « sans a priori ». C'est-à-dire que nous avons produit des anticorps dirigés contre des spermatozoïdes entiers d'*A. terrestris*, puis nous avons cherché à identifier les antigènes reconnus.

2.2.1 Obtention d'anticorps dirigés contre des protéines spermatiques d'*Arvicola terrestris*

Le spermatozoïde de campagnol mesure 100µm de long, avec une pièce intermédiaire de 20µm, et une tête de 5µm de large et 10µm de long. La tête est recouverte d'un acrosome falciforme, et une partie de la population des spermatozoïdes de la queue épидидymaire présente une gouttelette cytoplasmique. Globalement, la morphologie du spermatozoïde de campagnol est proche de celle du spermatozoïde murin (fig.39).

Des lapines ont été immunisées avec des spermatozoïdes entiers provenant de la queue épидидymaire de campagnols, afin d'obtenir un sérum polyclonal dirigé contre les spermatozoïdes d'*Arvicola terrestris* Scherman. Les sérums produits ont été testés afin de vérifier la spécificité des anticorps produits vis-à-vis des protéines d'*A. terrestris*. Pour cela, un western blot a été réalisé avec des protéines spermatiques de campagnol, et des protéines épидидymaires de campagnol et de souris (fig.40). Cette analyse montre que les sérums obtenus réagissent avec des protéines spermatiques (solubles et membranaires) de campagnol (pistes 1 et 2). Quelques protéines d'origine épидидymaire (piste 3) sont aussi détectées par ce sérum. Il est à noter que les protéines mises en évidence dans l'extrait épидидymaire de campagnol sont moins nombreuses que celles des fractions spermatiques. De plus, les masses moléculaires des protéines épидидymaires reconnues sont identiques à celles des protéines spermatiques (65kDa et 30kDa), ce qui pourrait suggérer une parenté (voire une identité) entre ces différentes populations protéiques. Le sérum testé montre d'autre part des phénomènes de réactions croisées avec les protéines épидидymaires d'un autre rongeur : la souris (piste 4).

Ces anticorps ont aussi été incubés avec des spermatozoïdes de campagnols, puis observés en présence de DAPI (fig.41). Le DAPI permet de mettre en évidence les noyaux des spermatozoïdes observés (fig.41a,d). Les protéines reconnues par le sérum sont principalement localisées sur l'acrosome et le flagelle (fig.41b). Un marquage faible est aussi présent sur la pièce intermédiaire. L'utilisation d'un sérum préimmun comme contrôle négatif nous a permis de vérifier la spécificité des marquages obtenus (fig.41e). La superposition des images en DAPI et en TRITC permet de voir que l'ensemble des spermatozoïdes présents est marqué par le sérum (c), mais pas dans les conditions contrôle (f). Ces cibles semblent intéressantes, puisque leur localisation permet de supposer que ces antigènes pourraient intervenir dans la capacitation, la réaction acrosomique, la reconnaissance de l'ovocyte (pour les antigènes acrosomiques), ou dans la motilité (pour les antigènes du flagelle).

A ce stade de l'étude, nous possédions des anticorps polyclonaux capables de reconnaître des antigènes spermatiques de campagnol. Cet outil nous a permis d'effectuer l'étape suivante de ce travail, c'est-à-dire l'identification des antigènes reconnus.

2.2.2 Recherche d'antigènes spermatiques

2.2.2.1 Identification des protéines

Partant de l'hypothèse que les antigènes reconnus par le sérum constituaient de par leur localisation cellulaire des molécules potentiellement importantes dans la fonction spermatique, nous avons entrepris dans un premier temps de les caractériser. Pour cela, les protéines spermatiques d'*A. terrestris* ont été soumises à une analyse électrophorétique bidimensionnelle (fig.42). Deux méthodes d'extraction ont été utilisées (A et B). La comparaison des deux techniques permet de mettre en évidence un meilleur rendement pour la méthode d'extraction B. En effet, on peut observer sur les gels colorés au bleu de Coomassie colloïdal que le nombre de protéines extraites par la méthode B (kit commercial, fig.42d) est plus important que pour la première technique (a, b). Par ailleurs, en dehors du nombre de protéines, on peut aussi noter que la répartition des spots est différente. La gamme de pI et de poids moléculaires couverte par les protéines extraites par la méthode B est beaucoup plus importante. De plus, l'analyse immunologique des protéines extraites montre aussi un plus grand nombre de spots reconnus dans la méthode B (fig.42e), avec là encore une meilleure répartition des protéines qu'avec la méthode d'extraction A (fig.42c).

Les protéines révélées au bleu de Coomassie et détectées par les anticorps ont été prélevées et analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les résultats des analyses sont résumés dans le tableau 5.

Les protéines susceptibles d'être de bonnes cibles pour le développement d'une approche immunocontraceptive doivent répondre à certains critères :

- être facilement accessible aux anticorps (sur la membrane plasmique, dans le fluide épидидymaire)
- intervenir dans une fonction importante pour la reproduction, et/ou la survie du spermatozoïde
- être spécifique du spermatozoïde

Parmi les protéines reconnues par les anticorps, nous avons sélectionné cinq d'entre elles, susceptibles d'être de bons candidats : la dihydrolipoamide déshydrogénase, la GAPDH2

Résultats

(glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, type 2), la GPX4 (GPX spécifique des hydroperoxydes de phospholipides), la GST μ (glutathion S-transférase μ), et le spot 12 qui correspond à une protéine non identifiée, issue d'une banque d'ADNc testiculaire.

Résultats

Tableau 5 : résultats des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF

n° spot	Probabilité	Protéine	Localisation sur le spermatozoïde	Fonction(s)	Spécificité/spermatozoïde	Références
1	9.9e-001	Dihydrolipoamide déshydrogénase	matrice acrosomique, pièce principale du flagelle	hyperactivation du spermatozoïde, réaction acrosomique	Non	(Mitra et al., 2005; Mitra, 2004)
2, 3, 23, 24	1.0e+000	GAPDH2	gaine fibreuse	production d'énergie	Oui	(Mori et al., 1992; Welch et al., 1992; Westhoff and Kamp, 1997)
4, 5, 11	1.0e+000	F1 ATPase	sans membrane plasmique: acrosome, tête spermatique, flagelle	production d'énergie	Non	(Fujinoki et al., 2003)
7	9.9e-001	Homeotic gene regulator			Non	(Randazzo et al., 1994)
8	1.0e+000	Voltage-Dependent Anion Channel 2 (VDAC2)	fibres denses, mitochondries	mort cellulaire	Non	(Bathori et al., 1999; Hinsch et al., 2001; Hinsch et al., 2004; Rostovtseva and Colombini, 1996; Shinohara et al., 2000)
9, 10, 20	1.0e+000	Cenexine	centriole mature	structure	Non	(Lange and Gull, 1995)
12	1.0e+000	Murine EST	inconnue		Clone de tissu testiculaire	
14	1.0e+000	Hémoglobine			Non	
15, 16	1.0e+000	GPX4	mitochondries de la pièce intermédiaire	détoxication, structure	Non	(Nayernia et al., 2004; Pfeifer et al., 2001; Ursini et al., 1999)
17, 18	1.0e+000	GST μ	membrane plasmique	détoxication, liaison spermatozoïde/ovocyte, réaction acrosomique	Non	(Gopalakrishnan et al., 1998; Hemachand et al., 2002)
19	1.0e+000	Actine	tête, flagelle	structure	Non	(Paranko et al., 1994)
21, 22	1.0e+000	Outer Dense Fiber Protein	fibres denses	inconnue	Oui	(Brohmann et al., 1997)
25	1.0e+000	Malate déshydrogenase	matrice mitochondriale	production d'énergie	Non	(Kohsaka et al., 1992)

2.2.2.2 Obtention des ADNc correspondant aux cibles choisies

Parmi les protéines reconnues par les anticorps, susceptibles d'être de bonnes cibles pour un vaccin contraceptif, nous avons dans un premier temps travaillé sur quatre d'entre elles : GAPDH₂, GPX4, GST μ , spot 12.

Pour chacune d'elles, nous avons aligné l'ensemble des séquences protéiques connues, avec les séquences partielles d'*Arvicola terrestris* (obtenues après l'analyse par spectrométrie de masse). Nous avons ensuite utilisé le logiciel CODEHOP pour sélectionner des oligonucléotides dégénérés que nous avons utilisés dans une technique de PCR utilisant des températures d'amorçage décroissantes (touchdown PCR). Des ADNc ont été amplifiés pour ces quatre cibles (fig.43). Pour GAPDH₂, GPX4 et GST μ des ADNc ont été amplifiés à la fois dans le testicule et l'épididyme, alors que l'ADNc codant le spot 12 n'est présent que dans le testicule. Ces ADN ont été clonés et séquencés. Les séquences protéiques déduites ont été alignées avec celles (présentes dans les banques de données) des animaux susceptibles de partager le même habitat que le campagnol, ou d'être en contact avec ce rongeur (fig.44). A partir de ces alignements, des régions hydrophiles et immunogènes ont été recherchées avec le logiciel NPS@ (Combet et al., 2000), afin de sélectionner des peptides susceptibles d'être les cibles d'un vaccin contraceptif. Ces peptides doivent de plus présenter des séquences divergentes par rapport aux autres espèces comparées afin d'être les plus spécifiques possible d'*A. terrestris*. Les peptides sélectionnés sont présentés dans le tableau n°6.

Afin d'augmenter les cibles potentielles de ce vaccin contraceptif, nous avons développé en parallèle une approche qualifiée « d'*a priori* », et avons travaillé sur des protéines spermatiques ayant déjà été utilisées dans ce type d'études.

2.3 Etude avec a priori

2.3.1 Choix des cibles

Pour cette partie de l'étude, nous avons choisi de travailler sur des antigènes déjà utilisés dans d'autres espèces pour des essais d'immunocontraception: SP-10 (Sehgal et al., 1996), et P26h (Bérubé and Sullivan, 1994; Gaudreault et al., 2002). Nous avons de plus étudié la protéine modèle du laboratoire, GPX5, qui répond aux critères de spécificité tissulaire et de présence sur le spermatozoïde de souris (Drevet, 2000).

2.3.2 Obtention des ADNc

Pour GPX5, nous avons utilisé les mêmes oligonucléotides dégénérés que pour l'étude sur le cheval et le taureau (fig.45). Un fragment d'ADN d'environ 300pb a pu être amplifié à partir d'ARN d'épididyme de campagnol.

Pour les amplifications de P26h et SP-10, nous avons, comme précédemment, utilisé la technique de touchdown PCR. Des fragments d'ADN de la taille attendue ont été amplifiés dans le testicule et l'épididyme de campagnol, pour ces deux cibles (fig.45).

Comme précédemment, les ADNc ont été clonés et séquencés, et la recherche de peptides spécifiques et immunogènes a été entreprise (fig.46). Les peptides susceptibles d'être utilisés pour une immunocontraception d'*Arvicola terrestris* sont présentés dans le tableau n°7. Le séquençage de l'ADNc codant pour P26h devra à nouveau être réalisé, car entre les deux clones étudiés à l'heure actuelle, certaines divergences ont été notées (qui sont représentées par des X dans la séquence).

2.3.3 Immunolocalisation de GPX5

Pour l'étude de GPX5, nous possédons un outil supplémentaire : les anticorps interspécifiques (décrits précédemment).

Nous avons dans un premier temps étudié la localisation de la protéine sur des coupes épидидymaires (fig.47). L'observation macroscopique de l'épididyme de campagnol montre une tête plate, entourée d'un tissu adipeux très vascularisé, donnant à l'ensemble une couleur uniforme. D'un point de vue histologique, le diamètre de la lumière du canal augmente tout au long de l'organe (de 50µm dans la tête, à 250µm dans la queue). L'épithélium pseudostratifié garde une hauteur relativement constante. La couche de muscle lisse entourant les canaux de la queue épидидymaire est plus épaisse que dans le reste de l'organe. Par ailleurs la lumière du canal est remplie de spermatozoïdes dans toutes les régions de l'épididyme.

Résultats

La protéine GPX5 est retrouvée dans le cytoplasme des cellules épithéliales de façon uniforme, dans les trois régions de l'épididyme, ce qui est très différent de la localisation observée chez la souris, où la protéine est présente uniquement dans l'épithélium de la tête épидидymaire (Vernet et al., 1997).

Nous avons ensuite recherché la protéine GPX5 à la surface du spermatozoïde, par immunofluorescence (fig.48). Contrairement à ce qui a pu être observé chez la souris et le rat (Jimenez et al., 1992; Perry et al., 1992; Vernet et al., 1997), GPX5 n'a pas pu être mise en évidence à la surface du spermatozoïde de campagnol par cette technique.

L'objectif final de ce travail est de faire produire à des campagnols terrestres (mâles et femelles) des anticorps anti-spermatozoïdes dans leurs tractus génitaux respectifs. Pour cela, nous devons déterminer une voie d'immunisation permettant cette production d'anticorps. Par ailleurs cette voie d'immunisation doit être compatible avec la taille de l'animal ciblé, et son mode de vie souterrain. Nous avons donc testé des immunisations nasales et gastriques sur des souris (plus faciles à manipuler que des campagnols).

2.4 Production d'anticorps dans le tractus génital de souris

Des essais de production d'anticorps dans le tractus génital de souris mâles et femelles ont été réalisés, afin de tester l'efficacité de différentes voies d'immunisation. Nous avons testé les voies d'immunisation qui pourraient être employées pour une vaccination d'un rongeur fouisseur. Pour cela, des souris ont été immunisées par voie nasale ou gastrique, contre un peptide (correspondant aux 15 premiers acides aminés de la GPX5 murine) couplé à la BSA, ou contre de la BSA seule. La présence d'IgA dans les sécrétions génitales (vagin et cornes utérines pour les femelles, tête et queue épидидymaire, prostate et vésicules séminales pour les mâles) a été recherchée par slot blot. Chaque test a été réalisé sur trois animaux, et la totalité des sécrétions obtenues a été utilisée pour les détections.

Chez les femelles (fig.49), l'immunisation par voie nasale a permis de produire des IgA spécifiques dans les sécrétions vaginales et dans les sécrétions utérines. Les IgA présentes

Résultats

dans les sécrétions vaginales des animaux immunisés contre la BSA ne reconnaissent pas le peptide, ni le peptide couplé, mais reconnaissent la BSA. Pour les animaux immunisés contre le peptide couplé, les IgA vaginales détectent le peptide couplé ainsi que la BSA. Quant aux IgA présentes dans les cornes utérines, elles reconnaissent le peptide couplé et la protéine porteuse quel que soit l'antigène utilisé pour l'immunisation.

Les femelles immunisées par voie gastrique contre la BSA produisent des IgA qui reconnaissent la BSA mais pas le peptide couplé, alors que des IgA présentes dans les cornes utérines reconnaissent ces deux cibles. De plus, les anticorps présents dans les sécrétions utérines après immunisation gastrique reconnaissent des quantités plus faibles de peptide couplé. L'immunisation par voie gastrique avec le peptide couplé provoque la production d'IgA spécifiques dans les sécrétions vaginales (détection de la BSA), et utérines (détection peptide couplé et BSA). On note que la détection des antigènes est plus importante avec les sécrétions utérines, par cette voie d'immunisation. La détection la plus forte correspond à la reconnaissance du peptide couplé par les IgA utérines après immunisation gastrique par le peptide couplé.

Cette étude confirme que les deux voies d'immunisation nasale et gastrique sont efficaces dans la production d'anticorps au niveau du tractus génital femelle chez un rongeur, et pourrait donc être utilisées pour une immunocontraception du campagnol terrestre. La voie gastrique semble permettre une production d'IgA plus importante.

Chez les mâles immunisés, nous avons recherché la présence d'IgA spécifiques dans une partie des voies génitales (la tête et la queue épидидymaire), et dans deux glandes annexes (les vésicules séminales (VS) et la prostate) (fig.50).

Les animaux immunisés par voie nasale contre la BSA ne produisent pas d'IgA spécifiques dans la queue épидидymaire, ou à des niveaux trop faibles pour être détectées par la technique utilisée. Cette deuxième explication semble être la plus appropriée à la vue de la détection de la BSA par des anticorps présents dans la tête épидидymaire. Cependant cette détection est très faible, et les anticorps ne reconnaissent pas le peptide couplé. Concernant les glandes annexes, dans les VS des IgA reconnaissent la BSA et le peptide couplé, alors que dans la prostate, les anticorps ne reconnaissent que la BSA. Pour les animaux immunisés par voie nasale contre le peptide couplé, les résultats sont proches de ceux observés précédemment. Les antigènes ne sont pas détectés par les sécrétions épидидymaires, la BSA est reconnue par les IgA prostatiques et des VS. De plus, les anticorps des VS reconnaissent le peptide couplé,

Résultats

et ceci de façon très intense. Il semblerait donc que le site majeur (parmi ceux étudiés) de production d'IgA spécifiques après immunisation par voie nasale soit les vésicules séminales. Pour l'immunisation gastrique les résultats sont semblables à ceux décrits pour l'immunisation nasale. Toutefois, la production d'IgA semble moins importante.

L'absence de détection du peptide couplé pourrait être due à un problème de titre d'anticorps. Les IgA détectées dans les cornes utérines reconnaissent le peptide couplé et la BSA. Cette détection du peptide couplé pourrait être due à des anticorps anti-BSA ou à des anticorps reconnaissant le couplage.

Ces résultats montrent donc qu'il est possible de produire des IgA spécifiques dans l'épididyme en dépit de la présence de la barrière hémato-épididymaire, en utilisant une immunisation par voie muqueuse. Par ailleurs, les glandes annexes du tractus génital mâle que sont la prostate et les VS répondent aussi à ce type d'immunisation.

Dans la recherche d'antigènes pour la mise au point d'un vaccin contraceptif visant à limiter les pullulations du campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman, nous avons utilisé deux approches. Nous avons sélectionné cinq protéines cibles « sans *a priori* », parmi lesquelles nous avons pu obtenir la séquence partielle, spécifique du campagnol, de quatre d'entre elles. Pour les protéines sélectionnées « avec *a priori* », nous avons obtenu trois séquences spécifiques. Nous avons de plus pu mettre en évidence que les voies d'immunisation nasale et gastrique étaient efficaces dans la production d'anticorps spécifiques au niveau des tractus génitaux mâles et femelles.

DISCUSSION

1 Etude de la glutathion peroxydase 5 chez le taureau et l'étalon

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée et différenciée, et très particulière d'un point de vue biochimique. Elle présente tout d'abord un ADN haploïde très compacté qui la rend inapte à la synthèse de protéines, et en particulier la synthèse de protéines intervenant dans le maintien de son intégrité en réponse à des agressions. Par ailleurs sa membrane plasmique contient une proportion d'acides gras polyinsaturés plus importante que la plupart des autres types cellulaires. Les acides gras polyinsaturés sont essentiels pour donner à la membrane la fluidité nécessaire à sa fusion avec la membrane ovocytaire lors de la fécondation. Cette composition particulière rend le spermatozoïde fragile, car la forte proportion d'acides gras polyinsaturés le rend plus vulnérable au stress oxydant (peroxydation lipidique) (Pre, 1991).

Ces particularités font du spermatozoïde une cellule fragile, comme le montrent certaines infertilités, et en particulier des infertilités liées au stress oxydant. D'ailleurs, un niveau élevé d'EOR dans l'éjaculat est une des principales causes de stérilité (Park et al., 2003). Ceci est prouvé chez des hommes qui fument beaucoup. Les éjaculats de ces hommes présentent un stress oxydant caractérisé par des spermatozoïdes avec des taux de fragmentation d'ADN élevés, et une faible concentration de vitamines anti-oxydantes. Ces hommes montrent une fertilité réduite, mais ne sont pas infertiles (Aitken and Krausz, 2001). De plus, leurs enfants présentent 4 à 5 fois plus de risques de développer des cancers infantiles, que ceux de pères non fumeurs (Aitken and Krausz, 2001)

Cette fragilité se manifeste aussi lors de la manipulation de cette cellule, et en particulier sa conservation. C'est pourquoi de nombreux essais concernant la composition du milieu de conservation ont été entrepris, pour compenser cette fragilité. Différents points importants sont à prendre en compte lors de la composition d'un tel milieu : l'incapacité du spermatozoïde à réguler son volume, sa composition lipidique particulière, et sa sensibilité aux EOR.

Si l'osmolarité du milieu de conservation est trop faible, de l'eau va pénétrer dans les spermatozoïdes, et former des cristaux lors de la congélation. Si l'osmolarité est correcte, le milieu intracellulaire doit se vitrifier (Woods et al., 2004). Si le milieu de conservation est hyperosmotique, de l'eau va sortir du spermatozoïde et un influx d'ions peut se produire. Lors du réchauffement, le phénomène inverse va se produire, entraînant un influx d'eau dans la cellule, et son possible éclatement (Holt, 2000). Ces phénomènes se produisent lors d'un

Discussion

refroidissement lent. Un refroidissement rapide va favoriser la cristallisation de l'eau dans la cellule (Holt, 2000).

La composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde est particulière, et à température physiologique des régions fluides et en phase gel coexistent. Une réduction de température favorise la transition des phases fluides en phase gel. Le spermatozoïde étant incapable de modifier sa composition lipidique pour faire face aux changements de température induits par la cryoconservation (Holt, 2000; Watson, 2000), l'addition de cholestérol pour stabiliser la membrane pourrait augmenter la viabilité du sperme conservé (Medeiros et al., 2002).

La présence excessive d'EOR dans le sperme cryoconservé est une source majeure d'infertilité, c'est pourquoi des antioxydants sont ajoutés aux milieux de conservation. Selon les espèces et la température de conservation, les résultats diffèrent.

Il a été montré chez le verrat, que les spermatozoïdes ayant la viabilité la plus élevée après congélation et réchauffement présentaient une forte activité SOD, et une grande quantité de GPX4 avant congélation (Pena et al., 2003). Certains produits ajoutés au milieu de conservation peuvent avoir un effet délétère. C'est le cas du jaune d'œuf qui pourrait augmenter l'effet délétère de l' H_2O_2 , par la présence de fer et d'autres métaux via des réactions de type Fenton (Bilodeau et al., 2002). Par ailleurs, d'autres produits ayant une action antioxydante connue sont utilisés à l'heure actuelle. Par exemple, l'addition de catalase n'a pas d'effet sur le maintien de la motilité des spermatozoïdes équins conservés à 5°C, contrairement au bélier, pour lequel l'ajout de catalase favorise le maintien de la motilité et de la fertilité lors d'une conservation à 5°C (Ball et al., 2001). L'absence d'effet de l'ajout de catalase sur le sperme équin pourrait être dû à la forte activité catalase naturellement présente, dont une partie reste liée au spermatozoïde, même après centrifugation (Ball et al., 2001). L'ajout d'antioxydants hydrosolubles (analogue de vitamine E, acide ascorbique) ou liposolubles (vitamine E, BHT) n'améliore pas la motilité de spermatozoïdes équins conservés à 5°C (Ball et al., 2001). Cependant, la vitamine E limite les dommages oxydants subis par les lipides des spermatozoïdes de verrat dans le sperme conservé sous forme liquide, et augmente la motilité des spermatozoïdes après leur cryoconservation (Pena et al., 2003). Chez l'homme, l'addition d'acide ascorbique n'améliore ni la motilité ni la viabilité des spermatozoïdes cryoconservés (Askari et al., 1994). Cependant l' α -tocophérol améliore la motilité (Askari et al., 1994).

Discussion

Une autre protéine antioxydante, et spécifique du tractus génital pourrait être utilisée pour l'amélioration de la conservation des semences : GPX5. Nous nous sommes intéressés à cette protéine (modèle du laboratoire) chez deux espèces pour lesquelles la cryoconservation du sperme est très développée : le cheval, et le taureau. L'objectif de cette étude était dans un premier temps d'obtenir l'ADNc correspondant à cette protéine chez ces deux espèces, d'étudier son niveau et son (ses) site(s) d'expression, pour à terme produire cette protéine (pour chaque espèce) en système hétérologue, et l'ajouter aux milieux de conservation du sperme afin de limiter le stress oxydant, et d'améliorer le rendement de cryoconservation.

La séquence nucléotidique de la GPX5 bovine a été obtenue dans son intégralité, alors que seule une séquence partielle de GPX5 équine a été amplifiée. L'extrémité 5' de l'ADNc équin n'a pu être obtenu. Ceci pourrait être dû à la présence de structures secondaires au niveau de l'ARNm, comme des structures de type épingle à cheveux. Ses structures pourraient être responsables d'un détachement de la transcriptase inverse, aboutissant à un ADNc incomplet. Une autre hypothèse pourrait être la présence en quantité importante d'une forme tronquée des messagers non active transcriptionnellement, comme chez l'homme (Hall et al., 1998). Cependant nous n'avons mis en évidence qu'une seule bande lors de nos expériences de northern blot, ce qui infirme cette hypothèse.

Nous avons ensuite étudié les sites d'expression des ARNm dans le testicule, les canaux efférents et les différentes régions de l'épididyme de ces animaux. Chez le taureau, les ARNm de GPX5 sont majoritairement exprimés dans le segment II de la tête épидидymaire, mais sont aussi présents dans les deux autres segments de la tête, ainsi que faiblement dans le corps. La distribution des messagers équins est différente. En effet, le site majeur d'expression des ARNm correspond aux canaux efférents, puis le niveau d'expression décroît progressivement au long de la tête épидидymaire. La distribution des transcrits du bovin est proche de celle observée chez la souris (Schwaab et al., 1998), le chien (Beiglbock et al., 1998), et le verrat (Okamura et al., 1997), pour lesquels les ARNm sont principalement localisés dans la tête épидидymaire. Cependant, pour le chien, l'expression est encore plus restreinte ; elle est limitée à la région proximale de la tête. L'expression majoritaire dans les canaux efférents des messagers de GPX5 équins semble être une exception. Une explication possible pourrait être un problème lors de la séparation anatomique des canaux efférents et de la partie proximale de l'épididyme. En effet, contrairement aux rongeurs, chez les bovidés et les équidés, les canaux efférents sont étroitement imbriqués dans la tête de l'épididyme, rendant difficile la

Discussion

dissection. Nous avons donc peut être travaillé sur la partie proximale de l'épididyme, et non sur les canaux efférents. Pour vérifier cela, il faudrait en parallèle travailler avec des marqueurs spécifiques des canaux efférents, ainsi que de la tête épididymaire. Cependant, un autre exemple de localisation ectopique d'une protéine a déjà été montré dans le tractus génital. C'est le cas de la protéine MVDP/AKR1B7 qui a été localisée dans le canal déférent uniquement chez la souris (Val et al., 2002). Un autre exemple illustrant la différence de localisation des messagers entre différentes espèces est montré avec une carbonyle réductase. En effet, cette protéine a été étudiée chez le hamster (P26h), chez l'homme (P34H) et chez le macaque (P31m), et la localisation des messagers diffère pour chaque espèce. Pour le hamster, les ARNm sont trouvés dans le testicule (Gaudreault et al., 1999), pour l'homme ils sont localisés uniquement dans l'épididyme (Legare et al., 1999), alors que chez le macaque, ils sont retrouvés dans le testicule et l'épididyme (Lamontagne et al., 2001). Ces différentes études peuvent laisser penser que chez le cheval la transcription des messagers de GPX5 pourrait s'effectuer dans une région différente de celle observée jusqu'à présent pour d'autres espèces.

Nous avons ensuite cherché à localiser la protéine GPX5. Pour cela, un sérum interspécifique a été produit à partir d'un peptide présent dans toutes les GPX5 connues à ce jour, mais n'étant pas trouvé dans d'autres protéines. En western blot, les anticorps produits reconnaissent une bande dans la tête de l'épididyme de bovin, mais pas dans les autres régions épididymaires. Ce résultat est compatible avec la localisation des messagers. Cependant, l'analyse de la séquence peptidique de la protéine bovine montre une divergence d'un acide aminé par rapport à la séquence du peptide. En effet, une histidine est remplacée par une arginine. Le fait que ces deux acides aminés soient des acides aminés basiques pourraient expliquer la reconnaissance de l'épitope par les anticorps, malgré la différence de structure de ces deux résidus. Pour les tissus équins, aucune bande n'a été reconnue par les anticorps, en western blot. Nous avons dans un premier temps émis l'hypothèse d'une différence de séquence peptidique entre la protéine équine et le peptide choisi pour la fabrication des anticorps. Mais la traduction conceptuelle de la séquence nucléotidique obtenue a infirmé cette hypothèse. En effet, la séquence équine est totalement identique à la séquence du peptide. Une autre explication pour l'absence de résultat pourrait être une quantité de protéine trop faible pour le seuil de détection de la technique utilisée.

Des analyses en électrophorèse bidimensionnelle pour étudier le protéome du fluide épididymaire chez différentes espèces ont permis de mettre en évidence GPX5 dans le fluide de la tête épididymaire d'étalon (Dacheux et al., 2003; Fouhecourt et al., 2000). Cependant,

Discussion

en accord avec notre analyse, cette protéine est retrouvée en quantité très faible contrairement à d'autres espèces comme le bélier (Dacheux et al., 2003). A la vue de cette étude, et pour vérifier que notre sérum a la capacité de reconnaître la protéine GPX5 équine, il faudrait peut-être travailler sur une fraction enrichie en fluide épидидymaire.

Une autre hypothèse pouvant expliquer que notre anticorps ne détecte pas la protéine équine serait la présence de modifications post-traductionnelles sur cette protéine. En effet, la présence d'extension(s) sucrée(s), ou de phosphorylation(s) pourrai(en)t perturber la reconnaissance de la protéine par l'anticorps (Cole et al., 2004). Cependant, une analyse informatique des sites de O-glycosylations potentiels (NetOGlyc 3.1 Server, Julienus et al., 2005) n'a pas permis de mettre en évidence de tels sites sur la portion de séquence dont nous disposons, infirmant en partie notre hypothèse. Par contre une analyse des sites potentiels de phosphorylation (NetPhos 2.0 Server, Blom et al., 1999) a mis en évidence la présence de six sites possibles de phosphorylation (un sur une tyrosine, deux sur une thréonine, trois sur une sérine). Cependant, aucun des sites potentiels de phosphorylation ne se situe au niveau (ou proche) de la séquence reconnue par le peptide. De plus, la séquence bovine présente les mêmes sites de phosphorylation potentiels. La présence de phosphorylation(s) ne permet donc pas d'expliquer l'absence de détection de la protéine équine par les anticorps en western blot, sauf si l'extrémité amino terminale de la protéine équine présente des phosphorylations différentes de son homologue bovine.

L'étude de la séquence protéique bovine déduite de la traduction conceptuelle de la séquence nucléique nous a permis de mettre en évidence une divergence d'un acide aminé dans la séquence choisie pour le peptide. Cependant cette divergence n'a pas d'incidence sur la reconnaissance de la protéine par les anticorps produits à partir de ce peptide. En effet, une protéine d'environ 23kDa (taille conforme d'après la séquence) est détectée par le sérum. Cette protéine est aussi mise en évidence dans l'épithélium épидидymaire, depuis le segment II de la tête jusqu'au corps. Ces résultats sont compatibles avec ceux décrits précédemment. De plus le signal détecté est faiblement présent dans la lumière du canal au niveau du segment II de la tête (site principal de la localisation épithéliale). Ce résultat signifierait que la protéine GPX5 bovine est sécrétée depuis l'épithélium épидидymaire vers le fluide. La présence d'un signal peptidique potentiel dans la séquence de cette protéine est en accord avec cette hypothèse. Par contre, la présence de GPX5 dans le fluide n'est détectée que dans la lumière de ce segment. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer cette localisation transitoire : 1) la protéine est rapidement dégradée une fois dans la lumière de l'épididyme, 2)

Discussion

la protéine est réabsorbée dans l'épithélium, 3) la protéine s'associe au spermatozoïde et pénètre dans la cellule, n'étant alors plus accessible aux anticorps, 4) la protéine reste dans le fluide, mais subit des modifications la rendant inaccessible aux anticorps. L'hypothèse de la dégradation de la protéine dans le fluide est en accord avec la présence d'endoprotéases dans le fluide épидидymaire, comme la cathepsine D chez l'homme (Raczek et al., 1995), et la cathepsine L chez le porc et le rat (Okamura et al., 1995; Tomomasa et al., 1994). La réabsorption de la protéine correspondrait au phénomène illustré par la protéine Train A qui est sécrétée et réabsorbée par le même épithélium (Castella et al., 2004). L'hypothèse numéro 3 s'appuie sur des expériences montrant qu'une protéine sécrétée de façon apocrine depuis l'épithélium épидидymaire peut s'associer au spermatozoïde par l'intermédiaire des vésicules de sécrétion et pénétrer à l'intérieur du spermatozoïde. C'est le cas de la protéine MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) chez le rat, qui est retrouvée au niveau des fibres denses des spermatozoïdes (Sullivan et al., 2005). Des essais de détection de GPX5 sur des protéines de spermatozoïdes bovins cryoconservés ne nous ont pas permis de détecter cette protéine. Cette hypothèse semble donc peu vraisemblable. L'explication numéro 4 a été montrée pour la protéine CD52 chez le singe et l'homme (Yeung et al., 2001; Yeung et al., 2000). Cette protéine s'accumule sur le spermatozoïde entre la tête et le corps de l'épididyme, puis est de moins en moins détectée entre le corps et la queue épидидymaire. Par contre lorsque des spermatozoïdes de queue épидидymaire sont incubés dans un milieu favorisant la capacitation, la protéine est à nouveau détectée. Il semblerait que la protéine soit « cachée » par des remaniements lipidiques, qui la rendent invisibles aux anticorps (Yeung et al., 2001; Yeung et al., 2000).

Les différents résultats concernant GPX5 chez le taureau et le cheval tendent à montrer que la protéine serait faiblement présente chez le cheval, et qu'elle serait transitoirement sécrétée dans le fluide épидидymaire bovin. Donc la protéine, chez ces deux espèces, ne semblerait *a priori* pas une cible idéale pour améliorer les milieux de conservation du sperme de ces espèces, de par sa faible représentation et/ou sa localisation. Cependant, la production de ces deux protéines peut être tout de même envisagée, en système hétérologue, et des essais pourraient être menés afin de déterminer l'impact de cette protéine antioxydante recombinante sur la qualité des semences cryoconservées.

2 Recherche d'antigènes spermatiques pour l'immunocontraception du campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman

Le campagnol terrestre, *Arvicola terrestris* Scherman, est un rongeur fouisseur vivant dans les régions de moyenne montagne. Cet animal creuse ses galeries en laissant à la surface la terre excavée sous forme de tumuli ressemblant à des taupinières. Cette terre empêche l'herbe située dessous de repousser, ce qui induit des pertes de fourrage. De plus, cette terre est ingérée par les animaux (bovins), ce qui rend le lait impropre à la consommation, par la présence de spores butyriques. Ceci montre donc l'impact économique de ce rongeur, pour les agriculteurs. Par ailleurs, cet animal est porteur d'une maladie transmissible à l'homme, l'échinococcose alvéolaire. A l'heure actuelle, aucun traitement n'est disponible pour cette maladie touchant le foie et les poumons. Le campagnol terrestre est un hôte intermédiaire de ce pathogène (Bonnin et al., 1986), qu'il transmet à ses prédateurs, comme le chien, le renard, le sanglier, ou l'homme en contact avec ces animaux (Boucher et al., 2005; Magnaval et al., 2004; Pleydell et al., 2004; Reiterova et al., 2005).

Aujourd'hui, le principal moyen de lutte contre le campagnol terrestre consiste en l'utilisation d'un anticoagulant chimique de la famille des coumarines ; la bromadiolone. Cependant, ce produit présente un inconvénient majeur, son absence de spécificité d'espèce. Ce caractère aspécifique entraîne des dommages dans la faune non cible. Ainsi, les animaux à régime proche de celui du campagnol, ou les prédateurs de celui-ci peuvent être touchés par cet anticoagulant (Berny et al., 1997). C'est pourquoi des restrictions d'utilisation de ce produit sont imposées (arrêté ministériel du 17 décembre 2001, bromadiolone à 0,005% sur du blé, maximum 20kg/ha). Ainsi, une réglementation impose l'obligation d'arrêtés préfectoraux pour pouvoir traiter des parcelles avec ce produit. Cette réglementation empêche l'utilisation de la bromadiolone au-dessus d'une certaine densité d'animaux par hectare, afin de limiter la quantité de bromadiolone dispersée dans l'environnement. La détermination de cette densité est effectuée par des personnes autorisées, et reportée sur des cartes de vigilance (campaNET), qui déterminent les communes sur lesquelles les traitements sont autorisés.

Ces restrictions poussent donc les acteurs concernés à développer des moyens de lutte alternatifs. Ces moyens sont de plusieurs ordres.

Le premier, efficace, mais extrêmement coûteux en temps consiste en un piégeage exhaustif du campagnol. Ce type de piégeage s'effectue avec des pinces déposées dans les galeries, qui tuent l'animal piégé. Ceci suppose de prospecter très fréquemment dans les parcelles pour poser les pièges et les relever.

Discussion

Un deuxième moyen de lutte consiste à favoriser la prédation. Un lâcher de prédateurs apparaît difficile à mettre en œuvre pour des raisons d'acclimatation et de concurrence territoriale des prédateurs. Un programme de plantation de haies a donc été entrepris par l'ENITA de Clermont-Ferrand, afin de reconstituer des habitats propices aux prédateurs du campagnol (comme les renards, les fouines, les buses, les milans, ou les chouettes).

Une autre action a été entreprise par ce même organisme. L'idée de ce programme est de labourer les prairies infestées de campagnol afin de détruire leur habitat et leur source d'alimentation. Cependant les résultats préliminaires de cette étude (engagée en 2004) sont en demi-teinte. En effet, l'idée de cette étude est de retarder de nouvelles pullulations, or certaines parcelles ont été à nouveau infestées de façon importante. De plus, des problèmes de météorologie n'ont pas permis une bonne repousse de l'herbe semée après les labours. Cette étude est donc à continuer sur des surfaces plus importantes, en espérant des conditions climatiques plus favorables.

Une autre approche envisageable pour lutter contre les pullulations du campagnol terrestre consiste en une lutte biologique utilisant des pathogènes. Cependant, de telles approches ne peuvent être envisagées dans la nature, à cause du risque de dissémination (Lawson, 1995).

Une autre alternative biologique possible est le vaccin contraceptif. Différentes cibles peuvent être envisagées pour ce genre d'études. Cependant si l'on souhaite pouvoir cibler les mâles et les femelles, sans perturber les régulations hormonales, ni les comportements et être le plus spécifique possible d'espèce, les cibles idéales sont les protéines de surface du spermatozoïde, spécifiques de ce type cellulaire. Différents essais de vaccination contraceptive d'animaux sauvages, avec des protéines spermatiques ont déjà été effectués. En Australie, des immunisations contre des antigènes spermatiques chez le phalanger renard (*Trichosurus vulpecula*) induisent une inhibition significative de la fertilité des femelles. Cependant, les mâles ne sont pas touchés (Duckworth et al., 1998). Les voies d'immunisation pouvant être envisagées pour l'immunisation de rongeurs fouisseurs sont limitées : la voie gastrique, par utilisation d'appâts, et la voie nasale, en libérant un gaz dans les galeries. Ces deux voies sont, de plus, reconnues comme efficaces pour induire une réaction immunitaire au niveau du tractus génital (Mestecky and Russell, 2000; Wu et al., 2000).

A partir de ces différentes données de la littérature, nous avons entrepris de rechercher des antigènes spermatiques susceptibles d'induire une réponse immunitaire perturbant la reproduction du campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman. Deux stratégies ont été

Discussion

développées, que nous avons appelées « avec » et « sans » *a priori*. En parallèle, nous avons aussi étudié quelle voie d'administration pourrait être utilisée pour ce vaccin.

Les animaux sur lesquels nous avons travaillé ont été capturés entre novembre 2001 et juin 2005, dans le Cantal, le Puy de Dôme et la Haute-Loire. Les statistiques de piégeage, et en particulier le nombre d'animaux piégés est en relation avec la densité d'animaux dans les zones concernées. En effet, plus les pullulations étaient importantes dans les régions prospectées, plus le nombre d'animaux piégés est élevé, quelle que soit la région considérée.

La première étape de ce travail a consisté à produire des anticorps dirigés contre des protéines spermatiques de campagnol. Ces expériences ont été réalisées sur des lapins. Ce même type d'approche avait déjà été employé pour la recherche d'antigènes spermatiques chez le renard (Verdier et al., 2002). Nous avons ensuite vérifié que les anticorps obtenus reconnaissent des protéines de surface de spermatozoïdes, cibles potentielles d'un vaccin contraceptif. Les antigènes de surface reconnus sont principalement localisés sur l'acrosome et le flagelle. Cette localisation est intéressante, car on peut supposer que des anticorps se fixant sur les antigènes acrosomiques pourraient perturber la liaison spermatozoïde-zone pellucide, ou pourraient perturber la réaction acrosomique. Pour la liaison d'anticorps sur les protéines flagellaires, cela pourrait modifier la motilité spermatique.

L'étape suivante de ce travail a consisté à identifier les protéines reconnues par les anticorps. Pour cela, les protéines spermatiques ont été extraites et soumises à des électrophorèses bidimensionnelles avant d'être mises en présence des anticorps anti-spermatozoïdes. Les spots reconnus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Treize protéines ont ainsi été identifiées. Sur des critères de fonction, de localisation, et/ou de spécificité tissulaire, cinq protéines ont été sélectionnées comme antigènes potentiels pour une immunocontraception.

La première protéine sélectionnée est la protéine GST μ . Les GST (Glutathion S-Transférase) forment une famille enzymatique qui catalyse la conjugaison du glutathion à des centres électrophiles. Chez le rat, dans la queue épидидymaire, les cellules principales montrent un fort niveau d'expression de GST μ , alors que seules quelques cellules basales montrent une expression de cette protéine (Andonian and Hermo, 1999). Par ailleurs, GST μ est présente dans les cellules apicales de la tête d'épididyme de souris (Vernet et al., 2004). La protéine est localisée à la surface du spermatozoïde chez la chèvre (Gopalakrishnan et al., 1998), où elle est attachée de façon non covalente (Hemachand et al., 2002). La présence d'anticorps anti-

Discussion

GST μ diminue le taux de spermatozoïdes réalisant leur réaction acrosomique *in vitro*, ce qui laisse penser que cette protéine est importante pour ce phénomène (Gopalakrishnan et al., 1998). Après la réaction acrosomique, il y a une relocalisation de la protéine depuis l'acrosome à la partie postérieure de la tête du spermatozoïde (Gopalakrishnan et al., 1998). Cette relocalisation pourrait suggérer un rôle de la protéine dans l'adhérence du spermatozoïde à l'ovocyte (Gopalakrishnan et al., 1998). Par ailleurs, GST μ est capable de se lier à la zone pellucide (Hemachand et al., 2002).

Une autre protéine identifiée lors de cette étude est la GPX4. Cette protéine est localisée sous forme soluble dans le noyau du spermatozoïde, ainsi que non soluble dans les mitochondries de la pièce intermédiaire (Nayernia et al., 2004; Ursini et al., 1999). La GPX4 retrouvée dans les spermatozoïdes de la queue épидидymaire ne présente pas d'activité enzymatique, alors que l'enzyme est active dans les spermatides rondes (Ursini et al., 1999). La transition d'une GPX4 soluble et active, en une protéine de structure se déroule pendant la différenciation des spermatides en spermatozoïdes (Ursini et al., 1999). La GPX4 mitochondriale intervient dans la structure du flagelle, alors que la GPX4 nucléaire est impliquée dans la condensation de la chromatine (par l'oxydation des protamines), et donc la protection de l'ADN contre les dommages oxydatifs (Pfeifer et al., 2001).

Nous avons aussi sélectionné la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de type 2, qui est une isoforme spermatique de la GAPDH. Cette enzyme catalyse la conversion du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate, et est essentielle dans la glycolyse. La comparaison des séquences peptidiques des isoformes somatique et spermatique montre une identité de 71%, et une conservation des résidus impliqués dans la liaison du cofacteur NAD⁺, et la cystéine liant le substrat de l'enzyme (Welch et al., 1992). La présence en grande quantité des ARNm de GAPDH-2 dans les spermatides rondes et allongées laisse penser que cette enzyme joue un rôle important dans la production d'énergie et pourrait être importante dans la fonction des cellules germinales mâles (Mori et al., 1992). Sur les spermatozoïdes de mammifères, la GAPDH est associée à la gaine fibreuse (Westhoff and Kamp, 1997).

Une autre cible choisie parmi les protéines analysées par spectrométrie de masse est la dihydrolipoamide déshydrogénase. Cette protéine est le composant E3 du complexe multi-enzymatique alpha-céto acide déshydrogénase (Mitra, 2004). Cette protéine est une enzyme du métabolisme post-pyruvate. Elle est localisée à la fois dans le contenu acrosomique, et

Discussion

(dans la pièce intermédiaire du flagelle de hamster (Mitra et al., 2005). La localisation de la protéine ne varie pas au cours de la capacitation, cependant la partie acrosomique est libérée lors de la réaction acrosomique (Mitra et al., 2005). L'enzyme est phosphorylée sur des résidus tyrosine lors de la capacitation, dans ces deux localisations (Mitra et al., 2005). Le rôle de cette protéine dans la capacitation reste à déterminer (Mitra et al., 2005).

La dernière cible choisie est une protéine de fonction inconnue, dont l'ADNc a été séquencé à partir d'une banque testiculaire. Cette protéine a été sélectionnée d'après sa spécificité tissulaire.

Parmi les cinq cibles sélectionnées, des ADNc ont pu être obtenus pour quatre d'entre elles (GST μ , GPX4, GAPDH-2, spot 12), et une séquence spécifique d'*Arvicola terrestris* a été déterminée pour chacune. Quant à la dernière cible, la dihydrolipoamide déshydrogénase, nous n'avons pas réussi à amplifier l'ADNc correspondant. Comme nous avons utilisé des oligonucléotides dégénérés, il est possible que la température d'amorçage (T_m) de la PCR n'ait pas été optimale. Si de nouvelles amplifications utilisant des T_m différents ne nous donnent pas les résultats attendus, nous testerons d'autres couples d'oligonucléotides.

Pour les cibles dont nous avons obtenu les ADNc, nous avons aligné les séquences peptidiques déduites avec les séquences disponibles dans les banques de données d'animaux susceptibles de côtoyer le campagnol terrestre (animaux à régime proche, animaux partageant le même habitat, prédateurs, et homme), et nous avons déterminé les séquences antigéniques divergentes entre ces espèces. Les peptides ainsi identifiés vont être utilisés pour des immunisations de campagnol, et des tests de fertilité seront réalisés sur les animaux immunisés.

En parallèle à cette étude, nous avons travaillé sur des protéines spermatiques ayant déjà été utilisées dans des essais d'immunocontraception. Nous avons choisi les protéines P26h, SP-10, et LDH-C4. Nous avons de plus travaillé sur la protéine du laboratoire GPX5 qui a été localisée à la surface du spermatozoïde de souris.

La protéine acrosomique SP-10 a été utilisée pour des immunisations de rongeurs. Des souris et rats mâles immunisés contre SP-10 présentent une réponse immunitaire importante. L'histologie du testicule n'est pas modifiée, et la spermatogenèse n'est pas interrompue (Sehgal et al., 1996). Les anticorps produits se fixent sur l'acrosome des spermatozoïdes

Discussion

étudiés (Sehgal et al., 1996). L'absence d'atteinte du testicule est étonnante, car la protéine SP-10 est présente sur les cellules germinales non matures. Une explication possible serait l'utilisation d'une protéine recombinante humaine pour cette étude sur les rongeurs. La réponse immunitaire pourrait être trop faible pour induire des dommages au niveau testiculaire, ceci d'autant plus que l'immunisation a été réalisée par voie systémique (Sehgal et al., 1996). Cette protéine a aussi été utilisée pour immuniser des primates femelles. Les résultats de ces expériences montrent une production d'IgA et d'IgG spécifiques dans l'oviducte (Kurth et al., 1997). Ces études nous ont donc incité à étudier cette protéine sur notre modèle.

Une autre cible « *a priori* » de notre étude est la protéine de hamster P26h. Cette protéine est synthétisée par la partie proximale de la tête épидидymaire, et s'associe à la surface du spermatozoïde (sur l'acrosome) durant le transit épидидymaire. Elle intervient dans la liaison à la zone pellucide. L'immunisation de hamsters mâles contre P26h induit une production d'anticorps qui parviennent jusqu'à l'épididyme (Bérubé and Sullivan, 1994). La spermatogenèse et la motilité spermatique ne sont pas affectées par les anticorps anti-P26h (Bérubé and Sullivan, 1994). Le fait que l'immunisation ait été effectuée avec une protéine d'origine épидидymaire explique certainement l'absence de réaction testiculaire (Bérubé and Sullivan, 1994). L'infertilité des mâles immunisés contre P26h serait due au fait que les spermatozoïdes ne peuvent plus se lier à la zone pellucide (Bérubé and Sullivan, 1994). L'accouplement de hamsters mâles immunisés contre une protéine de fusion P26h-MBP (Maltose Binding Protein) avec des femelles dont les ovaires ont été stimulés montre un faible taux de fécondation (Gaudreault et al., 2002). Suite à cette immunisation, aucune histopathologie n'a pu être détectée dans les tissus reproducteurs, et aucun dommage n'a été révélé sur des spermatozoïdes prélevés tout au long de l'épididyme (Gaudreault et al., 2002). Par ailleurs, durant le temps d'immunisation aucune réponse immunitaire impliquant des lymphocytes T cytotoxiques n'a été mise en évidence (Gaudreault et al., 2002).

La localisation, la fonction et les précédents essais d'immunisation suggèrent que la protéine P26h est une bonne cible pour une immunocontraception du campagnol terrestre.

La LDH-C4 (une autre cible *a priori*) est l'isoforme spermatique de la lactate déshydrogénase. Cette protéine a été utilisée avec succès pour l'immunisation de femelles lapins, babouins, souris, et de babouins mâles (Goldberg, 1990; Goldberg et al., 2001). Par ailleurs, en ciblant l'épitope, on peut éviter d'induire une pathologie auto-immune chez le

Discussion

mâle (Goldberg et al., 2001). C'est pourquoi cette protéine nous semblait intéressante pour notre étude.

Nous avons travaillé sur ces cibles de la même façon que pour les cibles « sans *a priori* ». Des résultats ont pu être obtenus pour P26h, et SP-10. Cependant la séquence de P26h doit être confirmée, car il existe une incertitude sur certains nucléotides. Là encore des séquences peptidiques antigéniques et spécifiques d'*Arvicola terrestris* ont été déterminées, et vont servir pour des tests d'immunisations.

Avant de tester les peptides choisis chez le campagnol, nous avons étudié la production d'IgA spécifiques dans le tractus génital de souris mâles et femelles, immunisées par voie nasale ou gastrique. L'immunisation a été réalisée avec un peptide correspondant à la partie Nter de la protéine GPX5, couplé à la BSA. Il faut noter que les anticorps produits chez le lapin contre ce peptide couplé ne détectaient que très faiblement la protéine GPX5 de souris. La qualité du couplage est donc à remettre en cause. En effet, ce même peptide couplé à la BSA avait déjà été utilisé au laboratoire pour une production d'anticorps dirigés contre la GPX5 murine, chez le lapin, et les anticorps produits reconnaissaient leur cible. Ceci explique donc l'absence de détection du peptide seul chez toutes les souris immunisées. Il semblerait que seuls des anticorps anti-BSA ait été produits par ces souris.

Chez les femelles, les deux voies d'immunisation ont entraîné une production d'IgA spécifiques dans les sécrétions génitales testées (vaginales et utérines). Les dilutions des sécrétions n'étant pas identiques, il est difficile de déterminer dans quelle partie du tractus génital la production d'IgA a été la plus forte. Cependant, pour les sécrétions utérines, il semble que la voie d'immunisation gastrique soit plus efficace pour produire des anticorps spécifiques.

Pour les mâles, là encore les deux voies d'immunisation ont permis de produire des IgA spécifiques, principalement dans les vésicules séminales et la prostate. En effet, les réponses de l'épididyme semblent très faibles. La faible intensité du signal observé pourrait provenir d'une trop grande dilution des sécrétions étudiées. Une réponse IgA de la prostate avait déjà été montrée chez l'homme et la souris, cependant nos résultats sont en désaccord avec ce qui avait été montré pour les glandes séminales (Hickey et al., 2004; Sirigu et al., 1995).

Afin de déterminer plus précisément les niveaux de réponse des différentes sécrétions des tractus génitaux mâles et femelles, il faudrait analyser les échantillons par ELISA. Cependant,

Discussion

nos résultats permettent de montrer que des immunisations nasales et gastriques permettent de produire des IgA spécifiques dans les tractus génitaux mâles et femelles. Donc ces deux voies pourront être envisagées pour réduire la fertilité du campagnol terrestre.

Par ailleurs, des essais d'immunocontraception de souris par immunisations passives ont été réalisés au laboratoire. Différents anticorps anti-GPX5 ont été injectés intra-vaginalement à des souris sur lesquelles une stimulation ovarienne avait préalablement été réalisée. Les résultats préliminaires de ces expériences montrent une diminution de la fertilité de ces souris (Cadet et Vernet, communication personnelle). Ces résultats valident dans un premier temps la protéine GPX5 comme cible d'une approche immunocontraceptive. De plus, ils valident l'immunocontraception (présence d'anticorps dans les voies génitales) comme moyen de réduire la fertilité.

Notre travail nous a permis d'obtenir les séquences de différents peptides susceptibles d'être des cibles pour un vaccin contraceptif visant le campagnol terrestre. Pour déterminer parmi les différents peptides possibles lesquels seront les plus immunogènes, nous allons immuniser des campagnols avec ces peptides. Nous effectuerons ces immunisations par voie nasale et/ou gastrique afin de vérifier la production d'anticorps spécifiquement au niveau du tractus génital.

Par la suite, pour tester l'effet de ces anticorps sur la fertilité du campagnol, nous effectuerons des tests de liaison à la zone pellucide, en présence de différents mélanges d'anticorps. Pour cela, il faut au préalable réaliser une stimulation ovarienne des femelles. Nous avons réalisé des essais sur quelques animaux. L'ovulation étant physiologiquement déclenchée par l'accouplement (Yakovleva et al., 1997), nous avons utilisé des doses très importantes d'hormones. Nous avons obtenu des super-ovulations sur certaines des femelles testées (fig.51). Ces essais préliminaires sont encourageants pour la poursuite des expériences, mais doivent être répétés pour déterminer plus précisément les concentrations d'hormones à utiliser, ainsi que les délais entre les injections, ou le moment du prélèvement.

Discussion

Ce travail nous a donc permis de sélectionner différents antigènes spermatiques susceptibles d'être utilisés pour une immunocontraception du campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman. De plus, nous avons pu déterminer deux voies d'immunisation possibles pour ce rongeur : voies nasale et gastrique.

PERSPECTIVES

Perspectives

Le travail réalisé durant ma thèse comporte deux aspects qui ouvrent chacun sur différentes perspectives.

Les perspectives concernant l'étude de la GPX5 chez le cheval et le taureau sont dans un premier temps, d'obtenir la séquence complète de l'ADNc équin. Une fois les séquences connues, la production en système hétérologue des protéines recombinantes spécifiques de chaque espèce pourra être envisagée. Il faudrait alors ajouter ces protéines lors du refroidissement, et/ou du réchauffement des semences et mesurer le stress oxydant et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes dans chaque condition.

Une autre étude intéressante, consisterait à tenter d'effectuer une corrélation entre le taux d'expression de GPX5 de différents individus (étalons, taureaux), et leur fertilité (en sperme frais, ou congelé).

Pour l'étude concernant l'immunocontraception du campagnol terrestre, les travaux qui restent à effectuer sont multiples. Tout d'abord, il va falloir vérifier l'immunogénicité des peptides choisis. Il faudra ensuite tester l'effet des anticorps ainsi produits sur la fécondation, par des tests de liaison à la zone pellucide. Préalablement à ces tests, les doses et les délais pour la stimulation ovarienne devront être déterminés avec plus de précision.

Si les peptides choisis ne donnent pas satisfaction, dans un premier temps, l'obtention des extrémités des séquences nucléiques des cibles déjà choisies devra être réalisée. Enfin, si les résultats ne sont toujours pas satisfaisants, il faudra chercher de nouvelles cibles.

Par ailleurs, le mode d'administration du vaccin devra être déterminé. Ceci se fera en fonction des possibilités techniques, qui relèvent du génie des procédés.

Enfin, quand les cibles et le mode d'administration seront déterminés, des essais de vaccination en milieu naturel mais confiné seront réalisés. Il faudra alors contrôler les populations par un système de capture-marquage-recapture afin de déterminer l'efficacité des traitements.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Abdennebi-Najar, L. (2003). [Interests and limits of immunocontraception]. *Gynecol Obstet Fertil* 31, 774-777.
- Abe, K., Takano, H., and Ito, T. (1983). Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. *Arch Histol Jpn* 46, 51-68.
- Abou-Haila, A., and Fain-Maurel, M. A. (1984). Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. *Anat Rec* 209, 197-208.
- Airoidi, J. P. (1979). Etude du rythme d'activité du campagnol terrestre, *Arvicola terrestris scherman* Shaw. *Mammalia* 43, 25-52.
- Aitken, J. (2002). Active oxygen in spermatozoa during epididymal transit. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 435-447.
- Aitken, J., Paterson, M., and van Duin, M. (1996). The potential of the zona pellucida as a target for immunocontraception. *Am J Reprod Immunol* 35, 175-180.
- Aitken, R. J., and Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122, 497-506.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Andonian, S., and Hermo, L. (1999). Immunocytochemical localization of the Ya, Yb1, Yc, Yf, and Yo subunits of glutathione S-transferases in the cauda epididymidis and vas deferens of adult rats. *J Androl* 20, 145-157.
- Apte, A. N., and Siebert, P. D. (1993). Anchor-ligated cDNA libraries: a technique for generating a cDNA library for the immediate cloning of the 5' ends of mRNAs. *Biotechniques* 15, 890-893.
- Askari, H. A., Check, J. H., Peymer, N., and Bollendorf, A. (1994). Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 33, 11-15.
- Awano, M., Kawaguchi, A., and Mohri, H. (1993). Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 99, 375-383.
- Baban, B., Chandler, P., McCool, D., Marshall, B., Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol* 61, 67-77.
- Baker, M. A., Krutskikh, A., Curry, B. J., McLaughlin, E. A., and Aitken, R. J. (2004). Identification of cytochrome P450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. *Biol Reprod* 71, 307-318.

Références Bibliographiques

- Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G., and Baumbe, J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 56, 577-589.
- Barber, M. R., and Fayrer-Hosken, R. A. (2000). Evaluation of somatic and reproductive immunotoxic effects of the porcine zona pellucida vaccination. *J Exp Zool* 286, 641-646.
- Bathori, G., Parolini, I., Tombola, F., Szabo, I., Messina, A., Oliva, M., De Pinto, V., Lisanti, M., Sargiacomo, M., and Zoratti, M. (1999). Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* 274, 29607-29612.
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., and Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 21, 895-902.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., and Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 24, 621-628.
- Beaulieu, V., Da Silva, N., Brown, C. R., Smith, P. J., Brown, D., and Breton, S. (2004). Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H⁺ATPase (V-ATPase) recycling. *J Biol Chem*.
- Beiglbock, A., Pera, I., Ellerbrock, K., and Kirchhoff, C. (1998). Dog epididymis-specific mRNA encoding secretory glutathione peroxidase-like protein. *J Reprod Fertil* 112, 357-367.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Heijne, G. v., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides SignalP 3.0. *J Mol Biol*.
- Bennetts, L. E., and Aitken, R. J. (2005). A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 71, 77-87.
- Bergquist, C., Johansson, E. L., Lagergard, T., Holmgren, J., and Rudin, A. (1997). Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* 65, 2676-2684.
- Berny, P. J., Bernard, N., Tremolières, C., Defaut, R., Rieffel, D., and Giraudoux, P. (2002). Evaluation écotoxicologique des traitements en nature. Paper presented at: Prairies d'altitude et pullulations de campagnols: pratiques de lutte et enjeux environnementaux (Besçon).
- Berny, P. J., Buronfosse, T., Buronfosse, F., Lamarque, F., and Lorgue, G. (1997). Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere* 35, 1817-1829.
- Bérubé, B., and Sullivan, R. (1994). Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol Reprod* 51, 1255-1263.
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Cormier, N., and Sirard, M. A. (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 57, 1105-1122.

Références Bibliographiques

- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., and Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 55, 282-288.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-1362.
- Bonnin, J. L., Delattre, P., Artois, M., Pascal, M., Aubert, M. F., and Petavy, A. F. (1986). [Intermediate hosts of *Echinococcus multilocularis* in northeastern France. Description of lesions found in 3 naturally infested rodent species]. *Ann Parasitol Hum Comp* 61, 235-243.
- Boucher, J. M., Hanosset, R., Augot, D., Bart, J. M., Morand, M., Piarroux, R., Pozet-Bouhier, F., Losson, B., and Cliquet, F. (2005). Detection of *Echinococcus multilocularis* in wild boars in France using PCR techniques against larval form. *Vet Parasitol* 129, 259-266.
- Boué, F., Blais, J., and Sullivan, R. (1996). Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* 54, 1009-1017.
- Boue, F., and Sullivan, R. (1996). Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. *Biol Reprod* 54, 1018-1024.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brohmann, H., Pinnecke, S., and Hoyer-Fender, S. (1997). Identification and characterization of new cDNAs encoding outer dense fiber proteins of rat sperm. *J Biol Chem* 272, 10327-10332.
- Castella, S., Benedetti, H., de Llorens, R., Dacheux, J. L., and Dacheux, F. (2004). Train A, an RNase A-like protein without RNase activity, is secreted and reabsorbed by the same epididymal cells under testicular control. *Biol Reprod* 71, 1677-1687.
- Cohen, D. J., Rochwerger, L., Ellerman, D. A., Morgenfeld, M. M., Busso, D., and Cuasnicu, P. S. (2000). Relationship between the association of rat epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Mol Reprod Dev* 56, 180-188.
- Cole, K. S., Steckbeck, J. D., Rowles, J. L., Desrosiers, R. C., and Montelaro, R. C. (2004). Removal of N-linked glycosylation sites in the V1 region of simian immunodeficiency virus gp120 results in redirection of B-cell responses to V3. *J Virol* 78, 1525-1539.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25, 147-150.
- Cooper, T. G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod* 20, 9-11.
- Cooper, T. G., and Yeung, C. H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* 61, 28-38.

Références Bibliographiques

- Cuasnicu, P. S., Cohen, D. J., Ellerman, D. A., Busso, D., Da Ros, V. G., Morgenfeld, M. M. (2002). Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 389-404.
- Cyr, D. G., Finsson, K., Dufresne, J., and Gregory, M. (2002). Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 103-118.
- Dacheux, F., and Dacheux, J.-L. (2001). L'épididyme et les glandes annexes. In *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, I. Editions, ed. (Paris, Editions Ellipses), pp. 290-315.
- Dacheux, J. L., Castella, S., Gatti, J. L., and Dacheux, F. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63, 319-341.
- Dacheux, J.-L., and Dacheux, F. (2002). Protein secretion in the epididymis. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 151-168.
- Dacheux, J.-L., Gatti, J. L., Castella, S., Métayer, S., Fouchécourt, S., and Dacheux, F. (2003a). The epididymal proteome. In *The third international conference on the epididymis*, B. T. Hinton, Turner T.T., ed. (Charlottesville, The van Daren company).
- Dacheux, J. L., Gatti, J. L., and Dacheux, F. (2003b). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 61, 7-17.
- Dadoune, J. P., Siffroi, J. P., and Alfonsi, M. F. (2004). Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 237, 1-56.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., and Mattick, J. S. (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19, 4008.
- Drevet, J. R. (2000). Glutathione peroxidases expression in the mammalian epididymis and vas deferens. In *Andrology 2000*, F. Francavilla, Forti, ed. (Abruzzo, Collana di studi abruzzesi), pp. 427-462.
- Duckworth, J. A., Buddle, B. M., and Scobie, S. (1998). Fertility of brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) immunised against sperm. *J Reprod Immunol* 37, 125-138.
- Dufaure, J. P., Lareyre, J. J., Schwaab, V., Mattei, M. G., and Drevet, J. R. (1996). Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C R Acad Sci III* 319, 559-568.
- Ellerman, D. A., Brantua, V. S., Martinez, S. P., Cohen, D. J., Conesa, D., and Cuasnicu, P. S. (1998). Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. *Biol Reprod* 59, 1029-1036.
- Evans, E. A., Zhang, H., and Martin-DeLeon, P. A. (2003). SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 54.

Références Bibliographiques

- Fouchecourt, S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., and Dacheux, J. L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 62, 1790-1803.
- Frenette, G., Lessard, C., and Sullivan, R. (2002). Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod* 67, 308-313.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8998-9002.
- Fujihashi, K., Kato, H., van Ginkel, F. W., Koga, T., Boyaka, P. N., Jackson, R. J., Kato, R., Hagiwara, Y., Etani, Y., Goma, I., *et al.* (2001). A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. *Acta Odontol Scand* 59, 301-308.
- Fujinoki, M., Kawamura, T., Toda, T., Ohtake, H., Shimizu, N., Yamaoka, S., and Okuno, M. (2003). Identification of the 58-kDa phosphoprotein associated with motility initiation of hamster spermatozoa. *J Biochem (Tokyo)* 134, 559-565.
- Gallichan, W. S., Woolstencroft, R. N., Guarasci, T., McCluskie, M. J., Davis, H. L., and Rosenthal, K. L. (2001). Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol* 166, 3451-3457.
- Gaudreault, C., Le gare, C., Berube, B., and Sullivan, R. (1999). Hamster sperm protein, p26h: a member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Biol Reprod* 61, 264-273.
- Gaudreault, C., Montfort, L., and Sullivan, R. (2002). Effect of immunization of hamsters against recombinant P26h on fertility rates. *Reproduction* 123, 307-313.
- Gehlbach, D., and Haas, G. G., Jr. (2004). Shared journey. Paper presented at: Immunological factor and infertility.
- Ghyselinck, N. B., Dufaure, I., Lareyre, J.J., Rigaudiere, N., Mattei, M.G., Dufaure, J.P. (1993). Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 7, 258-272.
- Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Soranzo, M., Sandri, G., and Panfili, E. (1997). Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 57, 1502-1508.
- Goldberg, E. (1990). Lactate dehydrogenase C4 as an immunocontraceptive model. In *Gamete interaction-Prospects for immunocontraception*, G. D. Alexander N.J., Speiler J.M., Waites G.M.H., ed. (New York, Wiley Liss Inc.), pp. 63-73.
- Goldberg, E., VandeBerg, J. L., Mahony, M. C., and Doncel, G. F. (2001). Immune response of male baboons to testis-specific LDH-C(4). *Contraception* 64, 93-98.

Références Bibliographiques

- Gopalakrishnan, B., Aravinda, S., Pawshe, C. H., Totey, S. M., Nagpal, S., Salunke, D. M., and Shaha, C. (1998). Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: evidence of catalytic activity-independent functions. *Biochem J* 329 (Pt 2), 231-241.
- Grdic, D., Smith, R., Donachie, A., Kjerrulf, M., Hornquist, E., Mowat, A., and Lycke, N. (1999). The mucosal adjuvant effects of cholera toxin and immune-stimulating complexes differ in their requirement for IL-12, indicating different pathways of action. *Eur J Immunol* 29, 1774-1784.
- Hall, L., Williams, K., Perry, A. C., Frayne, J., and Jury, J. A. (1998). The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J* 333 (Pt 1), 5-9.
- Hardy, C. M., Clarke, H. G., Nixon, B., Grigg, J. A., Hinds, L. A., and Holland, M. K. (1997). Examination of the immunocontraceptive potential of recombinant rabbit fertilin subunits in rabbit. *Biol Reprod* 57, 879-886.
- Hardy, C. M., Clydesdale, G., Mobbs, K. J., Pekin, J., Lloyd, M. L., Sweet, C., Shellam, G. R., and Lawson, M. A. (2004). Assessment of contraceptive vaccines based on recombinant mouse sperm protein PH20. *Reproduction* 127, 325-334.
- Hemachand, T., Gopalakrishnan, B., Salunke, D. M., Totey, S. M., and Shaha, C. (2002). Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *J Cell Sci* 115, 2053-2065.
- Hermo, L., Adamali, H. I., and Andonian, S. (2000). Immunolocalization of CA II and H⁺ V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J Androl* 21, 376-391.
- Hermo, L., and Jacks, D. (2002). Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* 63, 394-410.
- Hermo, L., and Robaire, B. (2002). Epididymal cell types and their functions. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 81-102.
- Hess, R. A., Bunick, D., and Bahr, J. (2001). Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. *Mol Cell Endocrinol* 178, 29-38.
- Hickey, D. K., Jones, R. C., Bao, S., Blake, A. E., Skelding, K. A., Berry, L. J., and Beagley, K. W. (2004). Intranasal immunization with *C. muridarum* major outer membrane protein (MOMP) and cholera toxin elicits local production of neutralising IgA in the prostate. *Vaccine* 22, 4306-4315.
- Hinsch, K. D., Asmarinah, Hinsch, E., and Konrad, L. (2001). VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim Biophys Acta* 1518, 329-333.
- Hinsch, K.-D., De Pinto, V., Aires, V., A, , Schneider, X., Messina, A., and E, H. (2004). Voltage-dependent anion selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J Bio Chem*.
- Hoffer, A. P., and Hinton, B. T. (1984). Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biol Reprod* 30, 991-1004.

Références Bibliographiques

- Hogrefe, H. H., Griffith, J. P., Rossmann, M. G., and Goldberg, E. (1987). Characterization of the antigenic sites on the refined 3-A resolution structure of mouse testicular lactate dehydrogenase C4. *J Biol Chem* 262, 13155-13162.
- Holt, W. V. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3-22.
- Holt, W. V. (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Hu, K. F., Lovgren-Bengtsson, K., and Morein, B. (2001). Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 51, 149-159.
- Jervis, K. M., and Robaire, B. (2001). Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod* 65, 696-703.
- Jimenez, C., Ghyselinck, N. B., Depeiges, A., and Dufaure, J. P. (1990). Immunochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. *Biol Cell* 68, 171-174.
- Jimenez, C., Lefrancois, A. M., Ghyselinck, N. B., and Dufaure, J. P. (1992). Characterization and hormonal regulation of 24 kDa protein synthesis by the adult murine epididymis. *J Endocrinol* 133, 197-203.
- Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., Dicandoloro, P., Wilson, E., Kopf, G. S., and Turner, T. T. (2005). The Murine Epididymal Transcriptome: Transcriptional Profiling of Segmental Gene Expression in the Epididymis. *Biol Reprod*.
- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 73-84.
- Jones, R. (2002). Plasma membrane composition and organisation during maturation of spermatozoa in the epididymis. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 405-416.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., and Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15, 153-164.
- Kadam, A. L., Fateh, M., and Naz, R. K. (1995). Fertilization antigen (FA-1) completely blocks human sperm binding to human zona pellucida: FA-1 antigen may be a sperm receptor for zona pellucida in humans. *J Reprod Immunol* 29, 19-30.
- Kirkpatrick, J. F., Liu, I. K. M., and Turner, J. W. (1990). Remotely delivered immunocontraception in feral horses. *Wildlife Soc Bull* 18, 326-330.
- Kirkpatrick, J. F., Liu, I. K. M., and Turner, J. W. (1995). Contraception of wild and feral equids. In *Contraception in Wildlife Management*, T. J. e. Kreeger, ed. (Washington, US Government Printing Office).
- Kirkpatrick, J. F., Turner, J. W., Jr., Liu, I. K., Fayrer-Hosken, R., and Rutberg, A. T. (1997). Case studies in wildlife immunocontraception: wild and feral equids and white-tailed deer. *Reprod Fertil Dev* 9, 105-110.

Références Bibliographiques

- Kohsaka, T., Takahara, H., Tagami, S., Sasada, H., and Masaki, J. (1992). A new technique for the precise location of lactate and malate dehydrogenases in goat, boar and water buffalo spermatozoa using gel incubation film. *J Reprod Fertil* 95, 201-209.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.
- Krause, K. H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57, S28-29.
- Kurth, B. E., Bryant, D., Naaby-Hansen, S., Reddi, P. P., Weston, C., Foley, P., Bhattacharya, R., Flickinger, C. J., and Herr, J. C. (1997). Immunological response in the primate oviduct to a defined recombinant sperm immunogen. *J Reprod Immunol* 35, 135-150.
- Lamontagne, N., Legare, C., Gaudreault, C., and Sullivan, R. (2001). Identification and characterization of P31m, a novel sperm protein in *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*). *Mol Reprod Dev* 59, 431-441.
- Lange, B. M., and Gull, K. (1995). A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J Cell Biol* 130, 919-927.
- Lawson, M. (1995). Rabbit virus threatens ecology after leaping the fence. *Nature* 378, 531.
- Lea, I. A., van Lierop, M. J., Widgren, E. E., Grootenhuis, A., Wen, Y., van Duin, M., and O'Rand, M. G. (1998). A chimeric sperm peptide induces antibodies and strain-specific reversible infertility in mice. *Biol Reprod* 59, 527-536.
- Légaré, C., Berube, B., Boue, F., Lefievre, L., Morales, C. R., El Alfy, M., and Sullivan, R. (1999). Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidyl-anchored protein. *Mol Reprod Dev* 52, 225-233.
- Legare, C., Gaudreault, C., St-Jacques, S., and Sullivan, R. (1999). P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology* 140, 3318-3327.
- Leterrier, F., and Gary-Bobo, C. (1989). *Biologie membranaire: structure et dynamique des membranes biologiques*, Hermann).
- Lin, M., and Rodger, J. C. (1999). Acrosome formation during sperm transit through the epididymis in two marsupials, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *J Anat* 194, 223-232.
- Linfor, J. J., and Meyers, S. A. (2002). Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl* 23, 107-113.
- Magnaval, J. F., Boucher, C., Morassin, B., Raoul, F., Durantou, C., Jacquiet, P., Giraudoux, P., Vuitton, D. A., and Piarroux, R. (2004). Epidemiology of alveolar echinococcosis in southern Cantal, Auvergne region, France. *J Helminthol* 78, 237-242.
- Mahi-Brown, C. A., VandeVoort, C. A., McGuinness, R. P., Overstreet, J. W., O'Hern, P., and Goldberg, E. (1990). Immunization of male but not female mice with the sperm-specific isozyme of lactate dehydrogenase (LDH-C4) impairs fertilization in vivo. *Am J Reprod Immunol* 24, 1-8.

Références Bibliographiques

- Martinez-Garcia, F., Regadera, J., Cobo, P., Palacios, J., Paniagua, R., and Nistal, M. (1995). The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 27, 195-206.
- Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F. M., Rapone, S., Dondero, F., and Gazzaniga, P. P. (1995). Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 26, 145-148.
- Medeiros, C. M., Forell, F., Oliveira, A. T., and Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.
- Mehta, M. N., Mahale, S. D., Iyer, K. S., Vanage, G. R., Raghavan, V. P., and Moodbidri, S. B. (2003). Effect of active immunization with the C-terminal 67-94 (R-28) region of human seminal plasma inhibin on the fecundity of adult male rabbits. *Am J Reprod Immunol* 49, 42-50.
- Mestecky, J., Michalek, S. M., Moldoveanu, Z., and Russell, M. W. (1997). Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt*, 33-43.
- Mestecky, J., and Russell, M. W. (2000). Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27, 351-355.
- Millar, S. E., Chamow, S. M., Baur, A. W., Oliver, C., Robey, F., and Dean, J. (1989). Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice. *Science* 246, 935-938.
- Miller, L. A., Johns, B. E., and Killian, G. J. (2000). Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *Am J Reprod Immunol* 44, 266-274.
- Mitra, K., Rangaraj, N., and Shivaji, S. (2005). Novelty of the Pyruvate Metabolic Enzyme Dihydrolipoamide Dehydrogenase in Spermatozoa: CORRELATION OF ITS LOCALIZATION, TYROSINE PHOSPHORYLATION, AND ACTIVITY DURING SPERM CAPACITATION. *J Biol Chem* 280, 25743-25753.
- Mitra, K., Shivaji, S (2004). Novel tyrosine phosphorylated post pyruvate metabolic enzyme, dihydrolipoamide dehydrogenase, involved in capacitation of hamster spermatozoa. *Biol Reprod*.
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L., and Gooley, A. A. (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 837-844.
- Morel, J. (1981) Le campagnol terrestre, *Arvicola terrestris* (L.), en Suisse: biologie et systématique (mammalia, rodentia), Université de Lausanne, Lausanne.
- Mori, C., Welch, J. E., Sakai, Y., and Eddy, E. M. (1992). In situ localization of spermatogenic cell-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapd-s) messenger ribonucleic acid in mice. *Biol Reprod* 46, 859-868.
- Nayernia, K., Diaconu, M., Aumüller, G., Wennemuth, G., Schwandt, I., Kleene, K., Kuehn, H., and Engel, W. (2004). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: expression

Références Bibliographiques

pattern during testicular development in mouse and evolutionary conservation in spermatozoa. *Molecular Reproduction and development* 67, 458-464.

Naz, R. K. (1987). The fertilization antigen (FA-1) causes a reduction of fertility in actively immunized female rabbits. *J Reprod Immunol* 11, 117-133.

Naz, R. K. (1999). Vaccine for contraception targeting sperm. *Immunol Rev* 171, 193-202.

Naz, R. K., and Chauhan, S. C. (2002). Human sperm-specific peptide vaccine that causes long-term reversible contraception. *Biol Reprod* 67, 674-680.

Naz, R. K., and Zhu, X. (1998). Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol Reprod* 59, 1095-1100.

Nicander, L. (1957). Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in stallions, rams and bulls. *Acta Morphol Neerland-Scand* 1, 337-362.

O'Hern, P. A., Bambra, C. S., Isahakia, M., and Goldberg, E. (1995). Reversible contraception in female baboons immunized with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase. *Biol Reprod* 52, 331-339.

Okamura, N., Iwaki, Y., Hiramoto, S., Tamba, M., Bannai, S., Sugita, Y., Syntin, P., Dacheux, F., and Dacheux, J. L. (1997). Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim Biophys Acta* 1336, 99-109.

Okamura, N., Tamba, M., Uchiyama, Y., Sugita, Y., Dacheux, F., Syntin, P., and Dacheux, J. L. (1995). Direct evidence for the elevated synthesis and secretion of procathepsin L in the distal caput epididymis of boar. *Biochim Biophys Acta* 1245, 221-226.

Olson, G. E., NagDas, S. K., Winfrey, V. P. (2002). Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, The epididymis: from molecules to clinical practice), pp. 371-388.

Olson, G. E., Winfrey, V. P., and Nagdas, S. K. (2003). Structural modification of the hamster sperm acrosome during posttesticular development in the epididymis. *Microsc Res Tech* 61, 46-55.

O'Rand, M. G., Beavers, J., Widgren, E. E., and Tung, K. S. (1993). Inhibition of fertility in female mice by immunization with a B-cell epitope, the synthetic sperm peptide, P10G. *J Reprod Immunol* 25, 89-102.

Paranko, J., Yagi, A., and Kuusisto, M. (1994). Immunocytochemical detection of actin and 53 kDa polypeptide in the epididymal spermatozoa of rat and mouse. *Anat Rec* 240, 516-527.

Park, N. C., Park, H. J., Lee, K. M., and Shin, D. G. (2003). Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation. *Asian J Androl* 5, 195-201.

Pascal, M., and Boujard, T. (1987). Essai de typologie de paramètres démographiques et morphologiques de la fraction colonisatrice d'une population de campagnols terrestres (*Arvicola terrestris scherman* (Shaw.)). *Rev Ecol (Terre Vie)* 42, 357-376.

Références Bibliographiques

- Paterson, M., Jennings, Z. A., Wilson, M. R., and Aitken, R. J. (2002). The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *J Reprod Immunol* 53, 99-107.
- Pelletier, R. M., and Byers, S. W. (1992). The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20, 3-33.
- Pena, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., and Rodriguez Martinez, H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 78, 85-98.
- Perez Martinez, S., Conesa, D., and Cuasnicu, P. S. (1995). Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J Reprod Immunol* 29, 31-45.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Perry, A. C., Jones, R., and Hall, L. (1993). Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. *Biochem J* 293 (Pt 1), 21-25.
- Perry, A. C., Jones, R., Niang, L. S., Jackson, R. M., and Hall, L. (1992). Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem J* 285 (Pt 3), 863-870.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., and Behne, D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *Faseb J* 15, 1236-1238.
- Pleydell, D. R., Raoul, F., Tourneux, F., Danson, F. M., Graham, A. J., Craig, P. S., and Giraudoux, P. (2004). Modelling the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infection in foxes. *Acta Trop* 91, 253-265.
- Pre, J. (1991). [Lipid peroxidation]. *Pathol Biol (Paris)* 39, 716-736.
- Quééré, J. P., Garel, J.P., Rous, C. Pradier, B., Delattre, P; (1999). Esimer les dégâts du Campagnol terrestre en prairie naturelle. *Fourrages* 158, 133-147.
- Raczek, S., Yeung, C. H., Hasilik, A., Robenek, H., Hertle, L., Schulze, H., and Cooper, T. G. (1995). Immunocytochemical localisation of some lysosomal hydrolases, their presence in luminal fluid and their directional secretion by human epididymal cells in culture. *Cell Tissue Res* 280, 415-425.
- Ramarao, C. S., Myles, D. G., White, J. M., and Primakoff, P. (1996). Initial evaluation of fertilin as an immunocontraceptive antigen and molecular cloning of the cynomolgus monkey fertilin beta subunit. *Mol Reprod Dev* 43, 70-75.
- Randazzo, F. M., Khavari, P., Crabtree, G., Tamkun, J., and Rossant, J. (1994). *brg1*: a putative murine homologue of the *Drosophila brahma* gene, a homeotic gene regulator. *Dev Biol* 161, 229-242.

Références Bibliographiques

- Reiterova, K., Miterpakova, M., Turcekova, L., Antolova, D., and Dubinsky, P. (2005). Field evaluation of an intravital diagnostic test of *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes. *Vet Parasitol* 128, 65-71.
- Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J. R. (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* 63, 96-103.
- Rhim, S. H., Millar, S. E., Robey, F., Luo, A.-M., Lou, Y.-H., Yule, T., Allen, P., Dean, J., and Tung, K. S. K. (1992). Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida. *J Clin Invest* 89, 28-35.
- Robaire, B., and Viger, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52, 226-236.
- Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M., and Henikoff, S. (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* 26, 1628-1635.
- Rostovtseva, T., and Colombini, M. (1996). ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 271, 28006-28008.
- Rouquette, A. M. (1990). Anticorps anti-zone pellucide. In *Immunologie de la reproduction*, F. Médecine-Sciences, ed. (Paris, Flammarion), pp. 167-179.
- Russell, M. W. (2002). Immunization for protection of the reproductive tract: a review. *Am J Reprod Immunol* 47, 265-268.
- Rutlant, J., and Meyers, S. A. (2001). Posttranslational processing of PH-20 during epididymal sperm maturation in the horse. *Biol Reprod* 65, 1324-1331.
- Saez, F., Frenette, G., and Sullivan, R. (2003). Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *J Androl* 24, 149-154.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual* (New York, Cold Spring Harbor).
- Scarlett, C. J., Lin, M., and Aitken, J. (2001). Actin polymerisation during morphogenesis of the acrosome as spermatozoa undergo epididymal maturation in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *J Anat* 198, 93-101.
- Schwaab, V., Baud, E., Ghyselink, N., Mattei, M. G., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1995). Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene* 167, 25-31.
- Schwaab, V., Lareyre, J. J., Vernet, P., Pons, E., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1998). Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 157-162.
- Sehgal, S., Koul, D., and Verma, S. (1996). Effect of immunization with human SP-10 in male rodents. *Am J Reprod Immunol* 36, 167-174.

Références Bibliographiques

- Sellami, M. (1983) Bilans hydrique et énergétique de la forme fouisseuse du campagnol terrestre (*Arvicola terrestris scherman* Shaw) en laboratoire et dans son milieu naturel, Thèse de docteur-ingénieur, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris.
- Serre, V., and Robaire, B. (2002). Interactions of the immune system and the epididymis. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 219-231.
- Shinohara, Y., Ishida, T., Hino, M., Yamazaki, N., Baba, Y., and Terada, H. (2000). Characterization of porin isoforms expressed in tumor cells. *Eur J Biochem* 267, 6067-6073.
- Singh, A. K., and Shichi, H. (1998). A novel glutathione peroxidase in bopvine eye, sequence analysis, mRNA level, and translation. *J Biol Chem* 273 (40), 26171-26178.
- Sipila, P., Cooper, T. G., Yeung, C. H., Mustonen, M., Penttinen, J., Drevet, J., Huhtaniemi, I., and Poutanen, M. (2002). Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 16, 2603-2617.
- Sirigu, P., Perra, M. T., and Turno, F. (1995). Immunohistochemical study of secretory IgA in the human male reproductive tract. *Andrologia* 27, 335-339.
- Sonnenberg-Riethmacher, E., Walter, B., Riethmacher, D., Godecke, S., and Birchmeier, C. (1996). The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. *Genes Dev* 10, 1184-1193.
- Srivastav, A. (2000). Maturation-dependent glycoproteins containing both N- and O-linked oligosaccharides in epididymal sperm plasma membrane of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Reprod Fertil* 119, 241-252.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., and Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*.
- Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J. L., Okamura, N., and Dacheux, J. L. (1996). Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 55, 956-974.
- Takikawa, M., Kamada, M., Maegawa, M., Yamano, S., Irahara, M., Aono, T., Futaki, S., Ohmoto, Y., and Koide, S. S. (2001). Evaluation of two sperm antigens, rSMP-B and YWK-II, as targets for immunocontraception. *Zygote* 9, 145-151.
- Talwar, G. P. (1997). Fertility regulating and immunotherapeutic vaccines reaching human trials stage. *Hum Reprod Update* 3, 301-310.
- Thurston, L. M., Watson, P. F., and Holt, W. V. (2002). Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters* 23, 255-262.
- Tollner, T. L., Overstreet, J. W., Branciforte, D., and Primakoff, P. D. (2002). Immunization of female cynomolgus macaques with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase results in high antibody titers but does not reduce fertility. *Mol Reprod Dev* 62, 257-264.

Références Bibliographiques

- Tomomasa, H., Waguri, S., Umeda, T., Koiso, K., Kominami, E., and Uchiyama, Y. (1994). Lysosomal cysteine proteinases in rat epididymis. *J Histochem Cytochem* 42, 417-425.
- Toshimori, K. (1998). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res* 293, 177-187.
- Toshimori, K. (2000). Sperm plasma membrane modifications associated with fertilization in mammals. *J Reprod Dev* 46, 65-78.
- Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., and Panfili, E. (1998). Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 59, 753-758.
- Tulsiani, D. R. (2003). Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microsc Res Tech* 61, 18-27.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285, 1393-1396.
- Val, P., Martinez, A., Sahut-Barnola, I., Jean, C., Veyssiere, G., and Lefrancois-Martinez, A. M. (2002). A 77-base pair LINE-like sequence elicits androgen-dependent mvdp/akr1-b7 expression in mouse vas deferens, but is dispensable for adrenal expression in rats. *Endocrinology* 143, 3435-3448.
- Vanage, G., Lu, Y. A., Tam, J. P., and Koide, S. S. (1992). Infertility induced in rats by immunization with synthetic peptide segments of a sperm protein. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 538-543.
- Verdier, Y., Rouet, N., Artois, M., and Boue, F. (2002). Partial characterization of antigenic sperm proteins in foxes (*Vulpes vulpes*). *J Androl* 23, 529-536.
- Vernet, P., Aitken, R. J., and Drevet, J. R. (2004a). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 216, 31-39.
- Vernet, P., Britan, A., Gueux, E., Mazur, A., and Drevet, J. R. (2004b). Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymidis. *Biochim Biophys Acta* 1675, 32-45.
- Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1997). Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev* 47, 87-98.
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., and Aitken, R. J. (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 65, 1102-1113.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61, 481-492.
- Welch, J. E., Schatte, E. C., O'Brien, D. A., and Eddy, E. M. (1992). Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 46, 869-878.

Références Bibliographiques

- Westhoff, D., and Kamp, G. (1997). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *J Cell Sci* *110* (Pt 15), 1821-1829.
- Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., and Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* *48*, 146-156.
- Wu, H. Y., Abdu, S., Stinson, D., and Russell, M. W. (2000). Generation of female genital tract antibody responses by local or central (common) mucosal immunization. *Infect Immun* *68*, 5539-5545.
- Yakovleva, T. V., Bazhan, N. M., and Makarova, E. N. (1997). Effects of food deprivation in early pregnancy on the development of ovaries and adrenals in female progeny of the water vole (*Arvicola terrestris*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* *116*, 103-109.
- Yamamoto, Y., Nagat, Y., Niki, E., Watanabe, K., Yohimura, S., (1993). Plasma glutathione peroxidase reduces phosphatidylcholine hydroperoxide. *Biochem Biophys Res Commun* *193*, 133-138.
- Yeung, C. H., Anapolski, M., Sipila, P., Wagenfeld, A., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., Nieschlag, E., and Cooper, T. G. (2002). Sperm volume regulation: maturational changes in fertile and infertile transgenic mice and association with kinematics and tail angulation. *Biol Reprod* *67*, 269-275.
- Yeung, C. H., Perez-Sanchez, F., Schroter, S., Kirchhoff, C., and Cooper, T. G. (2001). Changes of the major sperm maturation-associated epididymal protein HE5 (CD52) on human ejaculated spermatozoa during incubation. *Mol Hum Reprod* *7*, 617-624.
- Yeung, C. H., Schroter, S., Kirchhoff, C., and Cooper, T. G. (2000a). Maturational changes of the CD52-like epididymal glycoprotein on cynomolgus monkey sperm and their apparent reversal in capacitation conditions. *Mol Reprod Dev* *57*, 280-289.
- Yeung, C. H., Wagenfeld, A., Nieschlag, E., and Cooper, T. G. (2000b). The cause of infertility of male c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice. *Biol Reprod* *63*, 612-618.
- Zhang, H., Jones, R., and Martin-DeLeon, P. A. (2004). Expression and secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the epididymis: role of testicular lumicrine factors. *Matrix Biol* *22*, 653-661.
- Zhou, C. X., Zhang, Y. L., Xiao, L., Zheng, M., Leung, K. M., Chan, M. Y., Lo, P. S., Tsang, L. L., Wong, H. Y., Ho, L. S., *et al.* (2004). An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* *6*, 458-464.
- Zhu, X., and Naz, R. K. (1997). Fertilization antigen-1: cDNA cloning, testis-specific expression, and immunocontraceptive effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4704-4709.

ANNEXE



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Theriogenology

Theriogenology 64 (2005) 1016–1033

www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the

GPX5 orthologs of the mouse epididymis-restricted and sperm-bound selenium-independent glutathione peroxidase are not expressed with the same quantitative and spatial characteristics in large domestic animals

Elise Grignard, Joelle Morin, Patrick Vernet, Joel R. Drevet*

Laboratoire "Epididyme & Maturation des Gamètes", Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6547-GEEM, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

Received 4 November 2004; received in revised form 26 January 2005; accepted 26 January 2005

Abstract

We report here on the cloning of cDNAs coding bovine and equine orthologs of mouse epididymis-restricted and sperm-bound glutathione peroxidase 5 (GPX5), a selenium-independent member of the multigenic GPX family in mammals. The complete sequence of bovine GPX5 as well as a partial sequence of the equine GPX5 were characterized, conceptually translated and aligned with other known mammalian GPX5 proteins. Using Northern blotting assays, we show that the level of expression of GPX5 is high in bovine but low in equine and that in both species the regionalization of GPX5 expression in epididymis is not totally identical to what was reported for rodent mouse GPX5. An antibody was produced against GPX5 and used in Western blot assays as well as in immunohistochemistry assays on bovine epididymis sections. It shows that the protein is essentially present in the cytoplasmic compartment of the caput segment 2 epithelium of the bovine epididymis. Unlike in the mouse model, bovine GPX5 seems to be poorly secreted and does not seem to be present on cauda epididymal spermatozoa.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Glutathione peroxidase 5; Epididymis; Orthologs

* Corresponding author. Tel.: +33 473 407413; fax: +33 473 405245.
E-mail address: joel.drevet@univ-bpclermont.fr (J.R. Drevet).

1. Introduction

In aerobic organisms glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) belong to the catalytic triad of enzymes that cells use to counteract the deleterious effects of free radical generation due to oxygen consumption. In the univalent pathway of oxygen reduction (see Fig. 1), GPX occupies a key position because it is the sole enzyme that can recycle hydrogen peroxide and also repair some of the damage caused by an excess of free radical generation to cellular compounds such as oxidized lipids and proteins. GPX is also a crucial factor in the maintenance of a proper redox balance since, unlike catalase, which functions when H_2O_2 concentrations are above physiological levels, GPX is sensitive even for small variations of its substrates [17]. Because of these characteristics, GPX proteins have been suggested to play roles wider than a simple scavenger action. It is now well documented that the modulation of oxidative stress is part of signaling processes having broad consequences on cell proliferation, cell survival and cell differentiation (see for reviews [3,36,7,39]).

Among the five distinct GPX genes identified in mammals to date, (GPX1 to GPX5 in the internationally adopted nomenclature [16], GPX5 occupies a particular position. It is the only GPX lacking the seleno-cysteine residue in its catalytic site, a characteristic feature of other GPXs [21,32]. In addition, GPX5 expression is restricted to the male genital tract, namely the epididymis while other GPXs are expressed in a less tissue-specific manner. Within the mouse epididymis, the GPX5 gene was shown to be highly expressed by the principal cells of the caput epididymidis epithelium, accounting for 2–3% of the total mRNA pool [24]. The protein was shown to be secreted into the epididymis lumen where, subsequently, it was found to bind to the head of transiting spermatozoa [30,46]. From a functional point of view, although the mouse GPX5 protein has not yet been completely purified and its enzymatic activity not strictly assessed; *in vivo* and *in vitro* approaches have shown that it could protect the mouse epididymis and spermatozoa from peroxidative injuries [46–48]. In this respect, GPX5 is considered as a male genital tract and sperm-cell specific enzymatic scavenger whose major function would be to protect the

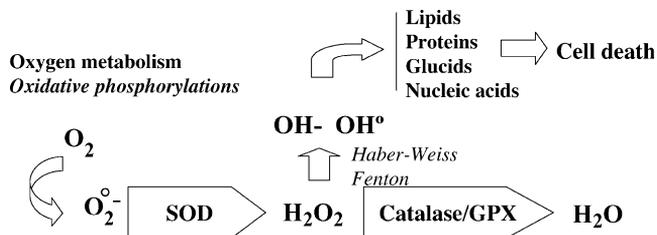


Fig. 1. Reactive oxygen species: cascade of production and recycling events. Oxygen consumption triggers the formation of superoxide anion. The latter is recycled by superoxide dismutase (SOD) into hydrogen peroxide (H_2O_2). In the presence of oxygen and iron, two secondary reactions (Haber-Weiss and Fenton) give birth to the aggressive hydroxyl radical which has the ability to attack any cell components (lipids in membranes, proteins sugars and nucleic acids) ultimately leading to cell death. Regarding the highly differentiated sperm cell; even mild oxidative challenge can alter sperm physiology leading among other phenomena to decrease motility, premature capacitation, hyperactivation. The maintenance of a balanced concentration of hydrogen peroxide both at the intracellular and extracellular levels is due to the actions of catalase and glutathione peroxidases (GPX).

sperm plasma membrane from attacks by free radicals [44]. This is particularly important because it is well documented that sperm cells are at great risk from peroxidative injury. This is due, in part, to the lack of repairing activities since spermatozoa are transcriptionally inactive cells with condensed nuclear material and virtually no cytoplasm. In addition, the high content of polyunsaturated fatty acids in sperm plasma membrane makes them targets of choice for free radical attacks. It has long been shown that lipid peroxidation destabilizes the sperm plasma membrane and modifies the activity of membrane-bound enzymes resulting ultimately in cell death [2,1,20].

The susceptibility of sperm cells to oxidative injury is particularly at stake when it comes to the issue of semen cryopreservation in mammals. Semen cryopreservation is a very important tool for applications such as conservation of genetic resources of endangered species, human reproductive medicine and, in the fields of agriculture by making possible organization of genetic improvement schemes on national and international scales. During cryopreservation protocols, semen is exposed to different challenges such as changes in temperature and osmotic stress, all leading to oxidative damages. These oxidative stresses are suspected to be responsible for the weak recovery of live, motile and fertile spermatozoa after cryopreservation procedures [34]. It was shown that reactive oxygen species (ROS) induce loss of bovine sperm motility in classical egg yolk Tris extender [13,12]. In parallel, levels of antioxidants were found decreased after a cycle of freezing and thawing of bovine spermatozoa [14]. In addition, in equine spermatozoa it was also reported that cryopreservation promotes ROS generation and DNA fragmentation [5,8]. It does appear that the removal of seminal plasma prior to freezing is a factor that contributes to increased peroxidative damage to frozen sperm cells [4]. Seminal plasma contains a variety of antioxidant enzymatic and non-enzymatic factors that act together to protect sperm integrity against the actions of ROS. For example, the high activity of catalase in equine seminal plasma is assumed to protect sperm motility from the detrimental effect of reactive oxygen species [4]. Similarly, high GPX activity was reported in bull seminal plasma [14].

To counteract ROS-mediated damage of sperm cells during cryopreservation procedures, cocktails of non-enzymatic and/or enzymatic antioxidants have been used empirically in attempts to block or prevent oxidative injury. For example, the addition of the lipid-soluble antioxidant BHT (butylated hydroxytoluene) or of the water-soluble antioxidant ascorbic acid were used unsuccessfully on cryopreserved equine sperm samples [6]. In contrast, the use of pentoxifylline was shown to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa [25]. In other studies, the addition of glutathione (GSH) or dithiothreitol (DTT) during semen cryopreservation has been reported to improve post-thaw motility recovery and acrosomal integrity [29]. Regarding the use of enzymatic scavengers, the addition of catalase to semen samples prior to freezing is unlikely to be efficient essentially because catalase is a large molecule which would suffer greatly during the freezing procedure. Catalase addition to equine sperm samples before freezing procedures was found ineffective [6], whereas catalase added for short-term storage at 5 °C to samples of equine spermatozoa proved useful to maintain live and acrosome intact sperm cells [6].

Very recently, it was reported that GSH availability and GPX expression seemed to be essential for a good post-thaw recovery of human cryopreserved semen [35]. Working on

the mouse GPX5 epididymis-restricted and sperm-bound antioxidant enzyme we thought that the small GPX5 protein (around 24 kDa) would be a natural and efficient enzymatic cryoprotectant that could be added to sperm samples prior to freezing or upon warming. Bovine and equine GPX5 proteins could be of some practical interest if the pattern of expression in these species was similar to the pattern observed in rodents. The goal of the present work was to clone the bovine and equine orthologs of mouse GPX5 protein and to establish the GPX5 pattern of expression in the testis, efferent and epididymal ducts in these species. The ultimate aim of this work would be to produce recombinant GPX5 proteins that could be used in cryopreservation protocols in economically important species for which semen conservation is an issue. As a first step, an interspecific mammalian GPX5 antibody was generated in order to detect GPX5 in bovine and equine epididymal protein samples. RT-PCR assays with GPX5 degenerate primers were then used to clone partial GPX5 cDNA sequences in both species. The rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR technology was used to complete the sequence of the bovine GPX5 protein and to extend the sequence of the equine ortholog. Northern blotting assays were carried out to compare the epididymal expression pattern of bovine and stallion GPX5 with that of the mouse. Finally, immunohistochemistry was performed on bull epididymis tissue sections to analyze the distribution and behavior of the GPX5 protein.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Bull epididymides and testes were collected from the slaughterhouse in Clermont-Ferrand (France). Stallion epididymides and testes were obtained after gelding procedure at a veterinary clinic (Dr. Chambéry, Chamalieres, France).

2.2. Antibody production

A selected synthetic GPX5 peptide (NH₂-VHDIRWNFEKFLV-COOH, Eurogentec, Belgium) coupled to KLH (NH₂ coupling) was used to immunize female rabbits by subcutaneous injections (100 µg/animal diluted in 500 µl 0.9% NaCl, w/v). An equal volume of complete Freund's adjuvant (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, USA) was used for primo-injection while incomplete Freund's adjuvant was used for the two subsequent boosts carried out at 4 weeks intervals. The polyclonal serum collected was applied onto an ACA Ultrogel affinity chromatography column (BioSeptra) onto which KLH was immobilized. Elution of immunoglobulins directed toward the GPX5 peptide was carried out with 1 × PBS.

2.3. Western blot assays

Tissues were homogenized in 50 mM Tris, 1 mM EDTA and protein concentrations were determined by the Bradford method using the Bio-Rad protein reagent (Bio-Rad). Fifteen micrograms of testicular and epididymal proteins were denatured (5' at 95 °C) prior

to be resolved by SDS–PAGE as described earlier [46]. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Whatman) and blots were incubated with the GPX5 polyclonal serum (dilution 1/100). To ascertain the specificity of the protein bands detected by the GPX5 antibody control detections were realized in which the GPX5 antibody was first adsorbed on its specific peptide. Protein band detection was ensured by the ECL detection system (Amersham Biosciences, UK). To remove glycosyl extensions onto the proteins that can impair the antibody detection, *O*-glycanase digestion (SIGMA) of epididymal protein extracts (100 µg) were carried out for 3 h at 37 °C.

2.4. RNA extractions and Northern blotting

Organs (testes, epididymides, efferent ducts) were homogenized using an Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Laborstechnik) in Trizol Reagent (Invitrogen). Extractions were carried out according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). RNA samples were resuspended in DEPC-treated water. RNA concentrations and purity were checked-out by spectrophotometry at 260 and 280 nm. RNA blots were made and hybridized according to standard protocols [42]. Northern hybridizations were performed essentially as described earlier [43]. Blot hybridizations were quantified with the quantity one software (Bio-Rad Life Science, Marnes la Coquette, France). RNA blots were normalized with reference to 18S rRNA hybridization.

2.5. RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends

For the cloning of the bovine and equine GPX5 cDNA sequences, 10 µg of total epididymal RNA was first reverse-transcribed at 42 °C for 1 h using 200 units of Superscript reverse transcriptase (Promega) in the supplier's condition. Reactions were stopped with the addition of 1.5 mM EDTA pH 8.0. Then, RNA were hydrolyzed with 0.4 M NaOH for 30 min at 65 °C. Amplification of a partial internal GPX5 cDNA fragment was first obtained using degenerate primers designed in highly conserved areas of already cloned GPX5 proteins in mammals (see Fig. 2). Three microliter aliquots of the above reverse-transcribed materials were amplified using 25 pmol (each) of forward and reverse IntGPX5deg primers (see Table 1) in the presence of 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega). PCR cycling conditions were as described in [22]. For the 5' and 3' extensions of the bovine and equine partial GPX5 cDNA sequences the RACE technology was carried out using the "Smart Race cDNA" amplification kit (Clontech) according to the manufacturer's recommendations. Primers used in these amplifications are described in Table 1.

2.6. Sub-cloning and sequencing

PCR amplified products were subcloned into the TOPO TA vector (Invitrogen) following the supplier's recommendations. Subcloned fragments were checked by sequencing (Eurogentec, Belgium). For each cDNA at least three overlapping sequence informations were used to reconstruct the bovine and equine GPX5 cDNAs. Alignments of GPX5 cDNA sequences and conceptual translations were carried out using the Blast search.

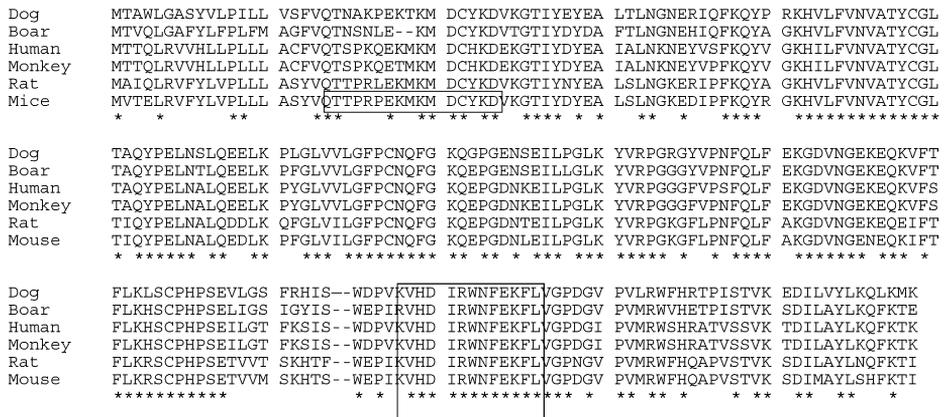


Fig. 2. Alignments of mammalian GPX5 proteins. Multiple alignments of the amino-acid sequences for known to date mammalian GPX5 proteins. The boxed area within the N-terminus extremity of the mouse GPX5 protein indicates the position of the synthetic peptide used to generate the mouse N-ter GPX5 antibody. The boxed area within the C-terminus extremity of all the aligned GPX5 sequences corresponds to the conserved amino-acid residues chosen to synthesize a peptide in order to generate an interspecific GPX5 polyclonal antibody. Asterisks at the bottom indicate the amino-acids residues that are conserved between all the GPX5 primary sequences. Dot lines within the sequences correspond to spacers which have been artificially introduced in order to maximize the alignments.

2.7. Immunohistochemistry

Tissues were dissected according to Nicander’s indication ([37]) regarding the anatomy of the bovine efferent ducts and the various epididymis segments. Tissue samples (125 mm³) were fixed in Carnoy’s solution (75% EtOH, 25% acetic acid) for 1 h,

Table 1
GPX5 oligonucleotides synthetic primers used in RT-PCR amplifications

Name	Sequence ^a	Length ^b	Degeneracy (fold)
DegenGPXfw	5'-cgca <u>agctt</u> CCSTGCAAYCARTTYGGA-MANCARG-3'	34	256
DegenGPXRv	5'-cgca <u>agctt</u> GAACTTCTCAAAGTCCA-GSSRATGTC-3'	37	8
Bull 3' RACE Fw	5'-AATCCTGTCCTCACCTTCTG-3'	21	
Bull nested 3' RACE Fw	5'-CTGGGAACCCATCATGGT-3'	18	
Bull 5' RACE Rv	5'-CTGAGTTTTCTCTGGTTCC-3'	20	
Bull nested 5' RACE Rv	5'-CCTGATTCCAAACTGATTGCA-3'	22	
Stallion 3' RACE Fw	5'-ACTCCTGTCCTACCCCTCTG-3'	21	
Stallion nested 3' RACE Fw	5'-CTGGGAACCTATAAAGGT-3'	18	

^a The International Union of Pure and Applied Chemistry symbols used to denote multiple nucleotides are as follows: Y = C + T; R = A + G; S = C + G; M = A + C; N = A + T + C + G. Nucleotides encoding GPX-specific sequences are in uppercase letters; those encoding endonuclease restriction sites (underlined) extensions onto the primers are in lowercase letters.

^b nt, nucleotides.

dehydrated in absolute ethanol (four times, 15 min each) and in butanol for 12 h. Tissues were finally embedded in paraffin wax (Paraplast SIGMA, St Quentin Fallavier, France). Paraffin sections (5 μ m) were cut and disposed on glass slides, dried overnight at 60 °C prior to dewaxing in Histo-Clear (National Diagnostics, USA) in two steps (5 min each). Sections were then rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. Immunostaining was performed using the Vector vectastain ABC kit according to the manufacturer instructions (ABCYS, Paris, France). The primary antibody was diluted 1/40 in the saturation solution and incubated overnight at 4 °C with the tissue sections. Sections were counterstained with hematoxylin and observed using a Zeiss Axioplan 2 imaging microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). As a negative control, 5 mg of the GPX5 peptide was incubated with 1 mg of the GPX5 antibody at 4 °C prior to its use as a primary antibody onto tissue sections.

3. Results

3.1. Generation of an interspecific GPX5 polyclonal antibody

In order to search for the expression of the GPX5 protein in bull and stallion, we aligned published mammalian GPX5 primary sequences and looked for a stretch of conserved and immunogenic amino acids residues that could be used as an interspecific GPX5 signature. As shown in Fig. 2, only one domain (boxed area) close to the C-terminus presented 100% identity in all the mammalian GPX5 proteins cloned to date. Other areas had significant level of homology but they were either too short or they concerned areas that could be found in other GPX proteins. Prior to synthesis we carried out a Blast analysis of the mouse and human protein data banks as well as translated cDNAs and ESTs (TFASTA) data banks to look for the eventuality of proteins that would contain an identical or similar peptide sequence. No significant homology with known proteins was found. Thus, a 13-mer

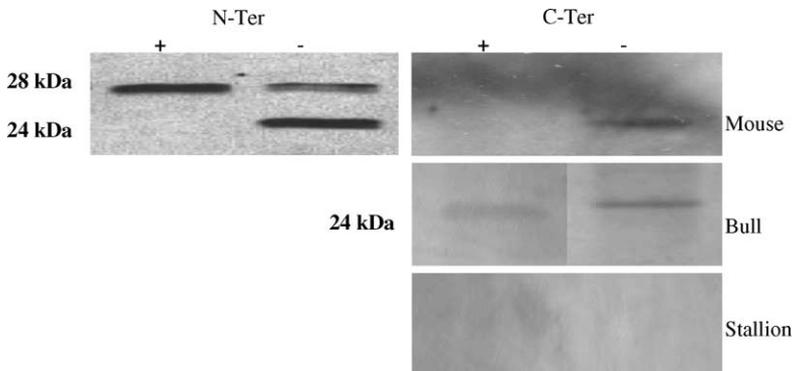


Fig. 3. Western blot detection of GPX5 in mouse, bull and stallion epididymal protein extracts. Epididymal protein extracts with glycosyl modifications (+) or glycanase-treated epididymal protein extracts without sugar extensions (-) from mouse bull or stallion incubated either with the N-ter mouse specific or the C-Ter interspecific antiGPX5 polyclonal serums.

synthetic peptide was coupled to KLH and used to immunize rabbits. The polyclonal serum collected was purified using a KLH-immobilized chromatography column. The purified anti-GPX5 polyclonal was then used in Western blot assays against protein samples prepared from mouse, bull and stallion epididymis tissues. As shown in Fig. 3, the serum recognized a protein band at an expected molecular weight range in the bovine sample (panel C-ter, lane +) but failed to recognize any proteins in mouse and stallion samples (panel C-ter, lanes +). Since post-translational modifications such as glycosyl extensions added onto the GPX5 protein could impair antibody epitope recognition, we also carried out in parallel GPX5 detection in protein samples that were treated with glycanases prior to their resolution onto SDS–PAGE (Fig. 3, panel C-ter, lanes –). When glycosyl extensions were removed, mouse GPX5 protein was efficiently recognized by the polyclonal serum at a size corresponding to its theoretical molecular weight (24 kDa), whereas no difference between glycosylated and not-glycosylated samples was observed in stallion’s samples.

Complete cDNA/protein sequence of Bull GPX5	
CTCTCAGACCAGTGTATCTGAGGACTACTACCA ATG ACTATACAGTAAAGGGCCCTTGTCTTTTCTCTTTTCTTAGCCGGCTTT	84
M T I Q L R A S C L P L F F L A G F	23
GTGCAGACAAATFCCAATCTFAGAGAAGATGGATTTGTCACAAAGATGTGAAAGGCACATATCATGATATGATGCTTTCACCTTT	168
V Q T N S N L E K M D C Y K D V K G T I Y D Y D A F T L	56
AATGAAAGGAACACATTCAGTTCAGAAATATCGGGCAAGCATGTCTTTTGTCAATGTGGCCACCTATFGTGGCTTGACA	252
N G K E H I Q P F K Q Y A G K H V L F V N V A T Y C G L	84
GCTCAATATCTCGAACGTACATCAGGAGGAGCTGAAGCCCTTTGGCCTAGTTGTGTGGGATTTCC GTG CAATCAGTTT	336
A Q Y P E L N A L Q E E L K P F G L V L V L G F P C N Q F	112
GGAAATCAGGAACAGGAGAAAATCAGAAATTTCTCAGGACTGAAGTATGTCCTCCAGGAGGAGGATACCTACCTAAATTC	420
G N Q E P G E N S E I L P G L K Y V R P G G G Y V P N F	140
CAACTGTTTAAAGAAAGGGATGTGAATGGTGAACAGAGCAGAAAGTCTCACCTCTTAAAGCAATCCTGTCTCACCCTCT	504
Q L F K K G D V N G E T E Q K V F T F L K Q Q S C P H P S	168
TGGGAACCCATCATGGCCGTGACATCCCGTGAATTTTGAAGTTCTCTAGTGGGACCTGATGGCATCCCTGTCTCAGCCGTG	588
W E P I M V R D I R W N F E K F L V G P D G I P V M R W	196
TTTCATCGGACTCCAGTCAGTACAGTCAAGACAGATATCCTGGCATAACAGTTCAAAACCAATAAGAAAGTCAAGTT	672
F H R T P V S T V K T D I L A Y M K Q F K T K *	221
GGGGCAGGACCAATCTGCTTCTTACCTGAAGACCTGTTAAAAACAAAATCTTTCTCTACATTCCTTCCATAATGCCTT	756
CCACTTGACTAAATCACATATAGTGCCAAAATTTCCACTCTCTATCAAGTAGATTTATGTTTCAGAAAGACTACTACTATTTCC	840
CTGCACGAGTATGTGGTAAGGAAAAGAAATCGAAACCCCTAAACCCCTCAGCTATCTGTTAACAAAGTTTAAATAAATATATAT	924
ATATATACCTCCCTAGAGGAGGGTCTGGCAACCCACTGCAGTATTTCTGCTGGGAGAAATCCCATGGACAGAGGAGCCCTGGCAGG	1008
CTGCAGTCCATGGAGTTGCAAAGAGTCAAGATATGACTGAGTGACTAAGCACAGTATATATGTGTAGATATATATATCTACACAC	1092
ACACACATATATATATCAAAAGAAAATCATTTCAATCCTAGGAGTAGGTCATTTGGCATGATATCTTCAAAAAGAAATGTCTCC	1176
TACACATCTGAGTCTTCTTCTTCTTACCCCTAAATGTAGAATTTGACAATGCGGTGACACAGCCGTCACAATTTCTAGCTGGAAGG	1260
CTTCAACATTTGCTTCCCTTAGAAGAAACATGTAAGTCAATTTCCAAGATTTTCAGATCAGTCTTTTCCATGACACCC	1344
CACCCACCTTACCTCCAGTGTGTCATCTTTTGTAGGAGCCCTAGATAGAGTGGGAGCAAGAAATGCTTACCTGGAAGG	1428
AAGATATCTTCCATGACAGTGGCAGTCAAGCCCTTTTAAATTCGACCCCTACAAAATTTTCCCTGTCTGCTCTTAGTGT	1512
ATTCAGATTATGATACTTTGGGCAGAACATCCTCTGAAAGATAGGCTTTCCTTCTCAACCGTAGAACCCCTTAGCTTCAGAACCA	1596
GCCTGCACTATCTCCAAATAA	
Partial cDNA/protein sequence of Stallion GPX5	
/GAGAACTCAGAGATCCTTCCGGGGCTGAAGTATGTCGGTCCGGGGGAGGATATGACCTAATTTCCAGCTTTTTGAGAAAGGA	84
E N S E I L P G L K Y V R P G G G Y V P N F Q L F E K G	28
GATGTGAATGGTAAAAAGAACAGAAAGTCTTCACCTTCTGGAAGCCTCTGTCTCACCCTCTGATGTTTTGGGCTCATTA	168
D V N G E K E Q K V F T P L K H S C P H P S D V L G S L	56
AAACATATATCTGGGACTGGAACTATAAAGTCCATGACATCCGCTGGAAATTCGAAAGTTCCTGGTGGCCCTGATGGA	252
K H S W D W E P I K V H D I R W N F E K F L V G P D G	84
GTCCCTGTCTGCGTGGTTCATTAAGACTCCGGTCACTGACAGTCAAGTCAAGTATATCTGGGCTACCTGAAGATTCAAAAT	336
V P V M R W F H K T P V S T V K S D I L A Y L K Q F K I	112
AAAAGGGAGGCTGATTTGGGGCCAGGACCCCTGCTTCTCAATGAGACCTGTTCAAAGAAAAGTCCATCTTCTACTACA	420
K G G *	116
CTTCTTCCCAATGGCCCTCCATTTGACAAATCACCTCTATACTGTTAGAGTTCACCTCTCTCCAGGATGATTTATATCTCA	504
CGAGTCTACTACTATCTCTCTTTCGAAGAGTATGTAGTGAAGAACAAAGAAATGGAAACCTAAATCTCCTCAACCTCTTTTAAA	588
ATTGAAATTCATATCCATCAAGGAAAATCATCTTCTTATAGGATGTTTCAGTGTGCCACAATTCGGAAGAAAGTTC	672
CTAGACATTTTGACTCTCCCGTCTCTCTACCTAAGGATAAAGAACAGCAATGGGCTTACGGCCATACAATTTAGTGTTC	756
CTCCATAGATTTTTCCTCCCTGAGATTAAGCATGACTGTCACTTTCCAACCTCTTTCAGATCAGTCTCAACCATGACACCT	840
CTGCCCTCACCCCTCCGCCCCTGATCTGTCACTTCTCTCTCCCTGAGGAGCCCTAAGGTAGAGTGGGAGGAGCAAGAAATTC	924
ACATGAAGGGAGGACATCTCCAGGATAGTGGGACCTAGAGCCCTCTCTTAAATTTGGACCTCAAAAATTTCCCTTATTGTG	1008
TGATCTTTAGTGTATTCAGTGTAGACACACTGGCCAGGCCACCTTTGAAGGATGGACTTCCCTCTTTAACCTTAGATTTCCA	1092
CAGCATCAAAACAGCCCTGCCACCATCTCCAAATAATGTTTCTGCAGCAAAAAA	1160

Fig. 4. Nucleotide and conceptually translated protein sequences of the amplified bovine and equine GPX5 cDNAs. The first ATG codon is indicated in bold characters, while the putative stop codon is indicated by an asterisk. Putative consensual polyadenylation sites at the 3' extremity of the cDNAs are also underlined. Numbers in the right margin indicate the position of nucleotide (normal characters) or amino-acids (bold characters) after conceptual translation of the cDNA sequences. GenBank accession numbers are in progress.

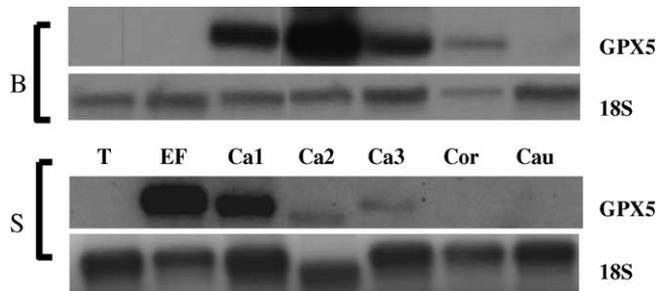


Fig. 6. Northern blot detection of GPX5 mRNA in bovine and equine tissue samples. Total RNA from bull (B) or stallion (S) testis (T), efferent ducts (EF), various sections of the caput (Ca1 to Ca3) as well as of the corpus (Cor) and cauda (Cau) epididymidis were hybridized using the cloned GPX5 cDNA fragments as probes. Lane to lane loading variations were standardized using as a probe a 18S rRNA fragment (18S).

detection of GPX5 in stallion epididymis protein samples was due to sequence differences. On the contrary, a single amino acid change (His to Arg) was found in the same area between the chosen consensual peptide sequence and the bull GPX5 protein. As expected for a putative secreted protein, a computer analysis of the N-terminus primary amino acid sequence of the bull GPX5 protein showed a potential signal peptide sequence (in italics, Fig. 2, as revealed by SignalP 3.0 Server; [10]).

3.3. Northern assays

Northern assays were used to investigate the distribution of the GPX5 mRNA in the bovine and equine epididymides. As shown in Fig. 6 (upper panel), the bull GPX5 transcript accumulated preferentially in the caput epididymides versus the corpus and the cauda. Within the bull caput, segment 2 was found to be the major site of GPX5 expression. Other bull tissues of the male genital tract taken as controls (i.e. testis and efferent ducts) failed to show any accumulation of the GPX5 transcript. Concerning stallion GPX5 mRNA, the Northern analysis (Fig. 6, lower panel) revealed first that the level of GPX5 expression in stallion was very low compared to bull. For equal amounts of RNA loaded on bull and stallion blots and with radio-labeled probes of comparable length, GC ratio and specific activities, 1 week exposure of the stallion autoradiogram was necessary while an

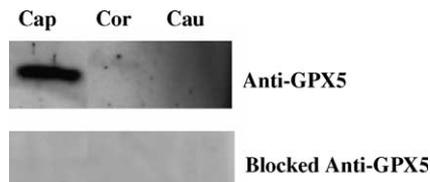


Fig. 7. Western blot detection of the bull GPX5 protein in epididymal protein extracts. The C-ter interspecific anti-GPX5 polyclonal serum was used to detect the GPX5 protein in caput (Cap), corpus (Cor) and cauda (Cau) epididymal protein extracts. To attest of the specificity of the interaction, an identical blot was incubated with the polyclonal serum blocked with an excess of the original peptide used to generate the polyclonal serum (blocked anti-GPX5).

overnight exposure of the bull autoradiogram was sufficient to obtain the signal presented in Fig. 6 (upper panel). Secondly, the Northern analysis also revealed that (within the organs tested) the major site of expression of GPX5 in stallion is not the caput epididymidis but rather efferent ducts. Within stallion epididymis and contrary to that in bull, segment 1 of the caput was the territory where the GPX5 transcript was found to accumulate preferentially (Fig. 6, lower panel). As the case in bull, stallion testes as well as corpus and cauda epididymides territories did not express GPX5 at a significant level. In both bull and stallion Northern analyses, lane to lane loading variation of RNA samples was taken into account by re-probing the same blots once stripped with a radio-labeled cDNA fragment directed against the constitutive 18S rRNA.

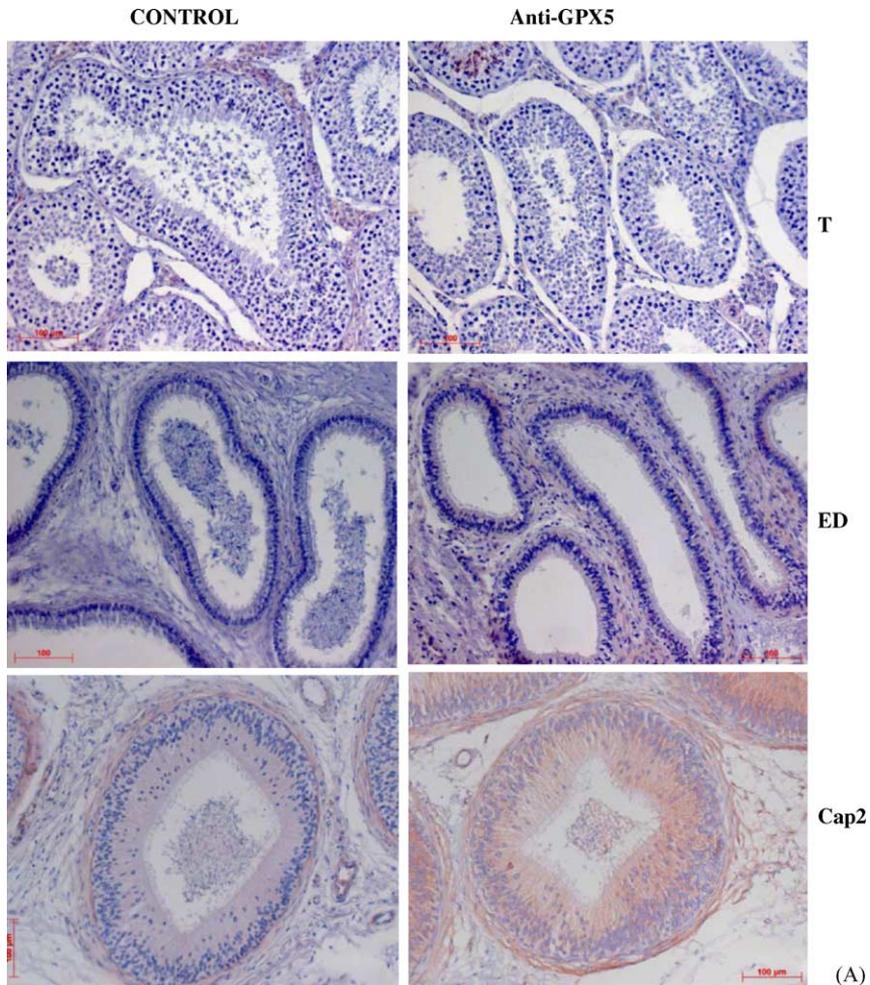


Fig. 8. Immunohistochemical detection of GPX5 in bull tissue sections. Testis (T), efferent duct (ED) and caput epididymidis segment 2 (Cap2) tissue sections (A) as well as caput segment 3, corpus and cauda epididymidis tissue sections (B) incubated with the anti-GPX5 polyclonal serum or with a blocked serum as a control.

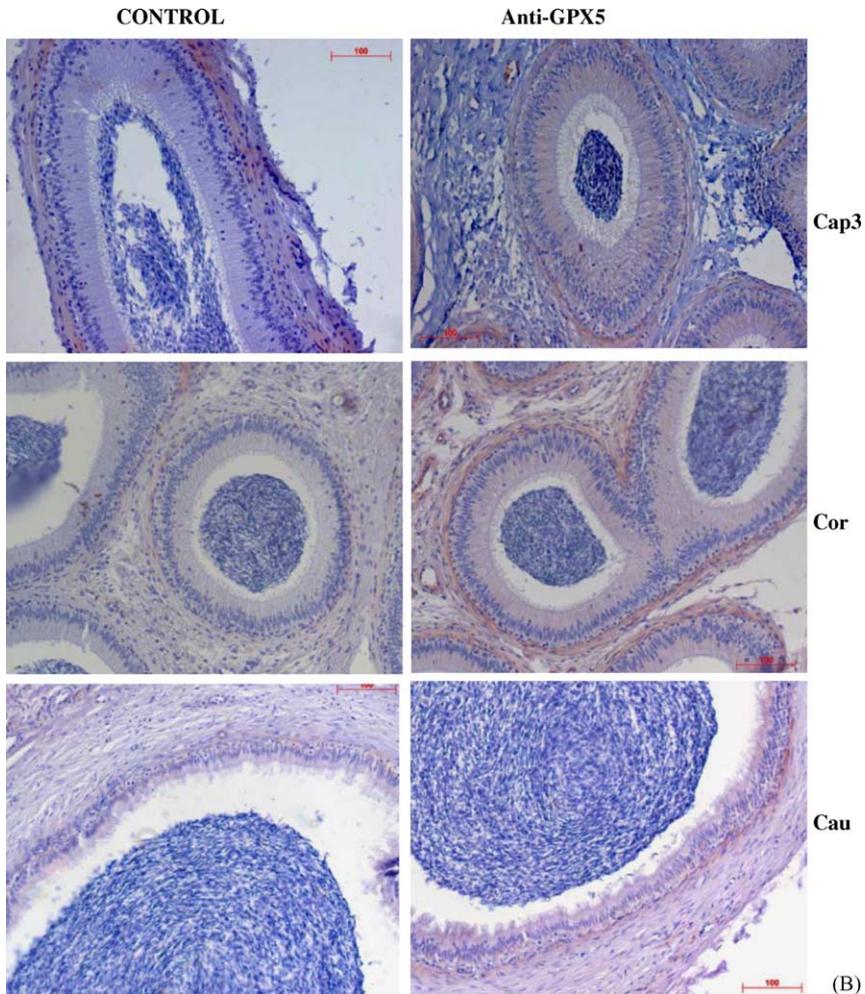


Fig. 8. (Continued).

3.4. Epididymal distribution of the bull GPX5 protein

To compare the profile of GPX5 mRNA accumulation with the distribution of the corresponding protein in the bovine epididymis, Western blot assays and immunohistochemical analyses were carried out. As shown in Fig. 7, the GPX5 protein was detected in Western blot assays in caput but not in corpus and cauda protein extracts (upper panel). The specificity of the detection was checked by the use of a peptide-blocked GPX5 antibody on an identical blot that failed to show any GPX5 protein (lower panel). The absence of detection of GPX5 in the bovine corpus and cauda epididymides samples is in agreement with the very weak (corpus) or absence (cauda) of detection of the GPX5 mRNA in the bull epididymis (as shown in Fig. 6, upper panel). It also suggests that the GPX5 protein is

poorly secreted or difficult to detect in the epididymal fluid. To localize bull GPX5 protein more exactly, tissue sections were treated with the purified polyclonal antibody. Fig. 8 shows sections of bull testes, efferent ducts and different territories of the epididymis. In agreement with the Northern analysis, the GPX5 protein was not detected in testis and efferent duct sections (Fig. 8A, panels T and ED) while the GPX5 protein was clearly seen in the caput epididymidis section (segment 2, panel Cap2) and at a lower level in caput epididymidis segment 3 (Fig. 8B, panel Cap3) and corpus epididymidis (Fig. 8B, panel Cor). For each panel, the right picture presents a typical detection of the GPX5 protein while the left picture corresponds to a typical control in which the GPX5 polyclonal serum was blocked with an excess of its target peptide prior to use. In caput segment 2, the GPX5 protein was found to be present essentially in the cytoplasmic compartment of the principal cells lining the epididymis tubule. GPX5 was also visible on the lumenally located pack of spermatozoa but solely in the caput segment 2 sections. None of the sections presented posterior to caput segment 2 showed any luminal detection of GPX5. This is in agreement with the Western blot data where no GPX5 protein was detected in corpus and cauda protein samples. Positive labeling can also be seen on the layer of smooth muscle that lined epididymal tubules. However, this labeling was also present all along the epididymis and, above all, in control sections in which the blocked antibody was used, attesting that there was some unspecific labeling.

4. Discussion

We report here on the cloning of the bovine and equine orthologs of mouse epididymis- and sperm-cell specific GPX5 protein, an antioxidant enzyme that could be of some help in protecting sperm cells *in vitro* during cryopreservation of male gametes for these economically important agronomic species. First characterized and cloned in rodents some 15 years ago [24,40], GPX5 has since been cloned in other mammals including dog [9] and boar [38,11] as well as monkey and human [26]. Although GPX5 cDNA sequences were found well conserved in these different species, differences between them were reported regarding the characteristics of expression of the GPX5 gene. For example, differential expression was reported for the human GPX5 gene leading to preferential accumulation of a truncated transcript supposedly coding a protein devoid of an antioxidant catalytic activity [26]. Differences were also reported with respect to the secretion of the protein and its localization in the sperm cell. Although corresponding cDNAs were not cloned, GPX5 has been previously shown to be present as secreted proteins through two-dimensional gel electrophoresis analyses and Edman N-terminal sequencing in ovine and equine epididymal fluids [18,23]. In these studies also, comparisons of GPX5 epididymal distribution and representation revealed differences between species [45,19]. These GPX5 species-specific behaviors prompted us to look closely at the expression of the bovine and equine GPX5 proteins.

The generation of an interspecific GPX5 polyclonal antibody revealed that the GPX5 protein is subjected to species-specific post-transcriptional maturation events. Mouse GPX5 protein was detected by our polyclonal serum only when *O*-glycosyl extensions were removed from the proteins. On the contrary, it was possible to detect bull GPX5

protein in the presence or the absence of sugar extensions. This behavior could have been predicted since a computer assisted analysis (NetOGlyc 3.1 Server, [31]) of the mouse GPX5 amino acid sequence revealed the presence of *O*-glycosylation sites, while this was not the case for the bull GPX5 primary sequence. The absence of detectable GPX5 in stallion epididymal protein samples, carrying or not sugar extensions, is more intriguing. Without knowledge of the primary sequence we first attributed this failure to stallion-specific amino acid divergences from the consensual sequence we had selected. The cloning of stallion GPX5 cDNA ruled out this hypothesis since 100% sequence conservation was found in the area of the peptide selection site. This left us with three possibilities, either the stallion GPX5 protein is subjected to specific post-transcriptional maturational events which impair antibody detection, or secondly, the protein is closely associated with membranes and is lost during the extraction procedure, or else, the protein is present in quantity which does not allow its detection in our Western blot assays. The third possibility is unlikely since, in a previous report, a Edman-sequenced protein spot was identified as a putative equine GPX5 protein [19] suggesting that GPX5 is present in equine protein samples at a detectable level.

RT-PCR amplifications using degenerate primers located in well-conserved areas of cloned GPX5 cDNAs were used to produce partial bovine and equine GPX5 cDNA fragments. The RACE protocol was then used successfully to extend both its 5' and 3' orientations of the bovine GPX5 cDNA. Conceptually translated and aligned with reported GPX5 amino acid sequences, bull GPX5 protein shows overall a high level of identity with that in other species (above 70% identity). As evidenced by the identical deletion of two amino acid residues in their respective N-ter extremities and, the preferential alignments that can be made in various areas, bull GPX5 protein shows the closest relationship (87% identity) with boar GPX5 protein [38]. Concerning the stallion GPX5-encoding cDNA, the RACE PCR technology only allowed us to amplify its 3' extremity. Our attempts to clone the 5' extremity of the equine GPX5 cDNA sequence failed. Several variations of the 5'-race technology were attempted to complete the stallion GPX5 sequence without success, suggesting that stallion GPX5 mRNA bears stable secondary structures that impair the reverse-transcription process. Our analysis of the regional distribution of GPX5 mRNA in both bovine and equine species revealed striking differences. In agreement with previously reported data in other mammals [24,40,38], bull GPX5 mRNA was found to accumulate preferentially in the caput epididymidis and to be absent in other tissues of the male genital system, such as testis and efferent ducts. In contrast, we show here that although stallion GPX5 mRNA was found also to accumulate in the proximal part of the caput epididymidis, its major site of expression seems to be the efferent ducts. To date, this is the first report in mammals that GPX5 mRNA can accumulate significantly outside the epididymis territory. In addition, although our analyses were not strictly quantitative, we noticed that there is much greater expression of GPX5 in bull than in stallion. With GPX5 cDNA probes of identical length and specific activities and with equal amounts of total RNA loaded on each blots, the detection of the bull GPX5 mRNA was much easier than that of the stallion. This suggested that the stallion GPX5 gene is poorly expressed compared to that in bull, in agreement with the absence of GPX5 detection using our specific antibody in stallion epididymal protein extracts. However, one cannot totally exclude the hypothesis already indicated above that our antibody failed to recognize stallion GPX5 protein because of

minor variations in the epitopes accessibility. Although post- or co-translational modifications of the stallion GPX5 protein might impair antibody recognition, it is likely that the absence of detection is partly due to the low representation of GPX5 in equine epididymis protein extracts. Fouchecourt et al. [23] reported bi-dimensional analyses of epididymal fluid proteins in stallion in which a small proportion of GPX5 protein was observed compared to other mammals investigated.

In bull epididymal protein samples, the GPX5 protein detected in Western blot assays, was found to be restricted to the caput territory. Protein extracts prepared from the corpus or the cauda territory were found not to respond to the antibody. This behavior of the bull GPX5 is quite peculiar since, as would be expected for an epididymal secreted protein, one would expect to find it in corpus and cauda protein extracts as was shown in mouse [46,41]. These observations suggest that only a very small fraction of GPX5 is secreted in the bull caput epididymis territory despite the presence in the N-terminus of the protein of a proper signal peptide. Supporting these data is the immunohistochemical analysis of bull epididymis sections using the antiGPX5 antibody which showed that only a small amount of GPX5 can be detected in the lumen of caput segment 2 sections associated with sperm cells. Outside this segment no luminal localization of GPX5 could be detected. In addition, we never detected GPX5 on cryopreserved or freshly recovered bull sperm samples (not illustrated). These results also suggest that the secreted GPX5 protein disappears from the epididymal lumen after the caput segment 2 and downward. This could be due to either passive or active degradation of the protein, or its reabsorption by the epididymis epithelium, or its sequestration onto non-accessible membrane domains or within vesicular structures. There are numerous proteolytic activities in addition to glycanases/glycosidases or/and glycosyl transferases activities in the epididymis which could modify the secreted protein and impair its recognition by our antibody. Reabsorption not only of water and ions [33,28] but also secreted proteins such as lipocalins [49] and the recently described RNase-A-like Train A protein [15] is also an important activity of the epididymis epithelium. Further experiments will be necessary to ascertain whether GPX5 or, a modified version of it, is no longer present on bull cauda epididymal sperm.

Our data suggest that GPX5 protein is poorly secreted in bull and could be either a cytosolic or a membrane-associated component. This atypical behavior is confirmed by the immunohistochemical analysis performed on bull epididymis sections which shows preferential cytosolic localization of GPX5 in sections of the segment 2 of the bull caput epididymis. Beyond this point, we have not recorded any GPX5 signal in a luminal localization. In mouse, where GPX5 has been extensively studied, the protein is secreted as early as the initial segment of the caput and is subsequently found in the luminal compartment of the organ associated with sperm cells up to the cauda epididymis compartment [46]. More recently, mouse GPX5 protein in its luminal epididymal localization was shown to be present at three distinct luminal locations, either free as a fluid component, associated to transiting spermatozoa and also to lipid-rich vesicles coming from apocrine secretion processes of the mouse epididymal epithelium [27,41]. Apparently, from our investigations bull GPX5 protein behavior is different. Taken together, the very low expression of GPX5 in stallion and the poor representation of GPX5 in the luminal compartment of the bull epididymis could diminish the interest of GPX5 use as an essential protective component of the sperm environment or the sperm itself in these

species. Despite these findings, we have undertaken the production of recombinant bovine GPX5 protein in order to test its activity towards various sperm-related substrates. We also envisage to use the recombinant protein in cryopreservation procedures in order to evaluate the impact of GPX5 addition on sperm parameters upon warming of frozen sperm samples. In parallel, a polyclonal antibody will be generated against the full length recombinant GPX5 bovine protein in order to check that GPX5 in bull is poorly associated with epididymal transiting spermatozoa.

Acknowledgement

The authors would like to thank Mrs. Felicity Vear (INRA, Crouel, France) for her skillful editorial assistance.

References

- [1] Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:659–68.
- [2] Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 1999;23:77–90.
- [3] Arrigo AP. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem* 1998;379:19–26.
- [4] Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IK. Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res* 2000;61:1026–30.
- [5] Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 2001;56:577–89.
- [6] Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res* 2001;62:508–15.
- [7] Barouki R, Morel Y. Oxidative stress and gene expression. *J Soc Biol* 2001;195:377–82.
- [8] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 2003;24:621–8.
- [9] Beiglbock A, Pera I, Ellerbrock K, Kirchhoff C. Dog epididymis-specific mRNA encoding secretory glutathione peroxidase-like protein. *J Reprod Fertil* 1998;112:357–67.
- [10] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SiganIP 3.0. *J Mol Biol* 2004;16:783–95.
- [11] Bertani GR, Marklund S, Hu ZL, Rothschild MF. Mapping of the glutathione-peroxidase-5 (GPX5) gene to pig chromosome 7. *J Anim Sci* 1999;77:2855–6.
- [12] Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 2002;57:1105–22.
- [13] Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 2001;15:275–86.
- [14] Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000;55:282–8.
- [15] Castella S, Benedetti H, De Llorens R, Dacheux JL, Dacheux F, Train A, an Rnase-A-Like protein without Rnase activity is secreted and reabsorbed by the same epididymal cells under testicular control. *Biol Reprod* 2004 [Epub ahead of print].
- [16] Chu FF. The human peroxidase genes GPX2, GPX3 and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 1994;66:96–8.

- [17] Cohen G, Hochstein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 1963;2:1420–8.
- [18] Dacheux JL, Druart X, Fouchecourt S, Syntin P, Gatti JL, Okamura N, et al. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *J Reprod Fertil* 1998;53S:99–107.
- [19] Dacheux JL, Gatti JL, Castella S, Metayer S, Fouchecourt S, Dacheux F. The epididymal proteome. In: Hinton BT, Turner TT, editors. *The third international conference on the epididymis*. 2002. p. 1150–122.
- [20] de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2:48–54.
- [21] Drevet JR. Glutathione peroxidase expression in the mammalian epididymis and vas deferens. In: Francavilla F, Francavilla S, editors. *Andrology*. 2000. p. 4270–462.
- [22] Dufaure JP, Lareyre JJ, Schwaab V, Mattei MG, Drevet JR. Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C R Acad Sci III* 1996;319:559–68.
- [23] Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 2000;62:1790–803.
- [24] Ghyselinck NB, Dufaure J, Lareyre JJ, Rigaudiere N, Mattei MG, Dufaure JP. Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 1993;7:258–72.
- [25] Gradil CM, Ball BA. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology* 2000;54:1041–7.
- [26] Hall L, Williams K, Perry AC, Frayne J, Jury JA. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly splice: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J* 1998;333:5–9.
- [27] Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* 2002;63:394–410.
- [28] Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:52–65.
- [29] Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:3–22.
- [30] Jimenez C, Ghyselinck NB, Depeiges A, Dufaure JP. Immunohistochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. *Biol Cell* 1990;68:171–4.
- [31] Julenius K, Molgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type *O*-glycosylation sites. *Glycobiology* 2004 [Epub ahead of print].
- [32] Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohe R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, et al. Probing the presumed catalytic triad selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:651–60.
- [33] Martinez-Garcia F, Regadera J, Cobo P, Palacios J, Paniagua R, Nistal M. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 1995;27:195–206.
- [34] Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 1995;26:145–8.
- [35] Meseguer M, Garrido N, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human semen. *J Androl* 2004;25:773–80.
- [36] Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 1999;342:481–96.
- [37] Nicander L. Studies of the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in stallion, rams and bulls. *Acta Morphol Netherland-Scand* 1957;1:337–62.
- [38] Okamura N, Iwaki Y, Hiramoto S, Tamba M, Bannai S, Sugita Y, et al. Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim Biophys Acta* 1997;1336:99–109.
- [39] Papp E, Nardai G, Soti C, Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors* 2003;17:249–57.

- [40] Perry AC, Jones R, Niang LS, Joackson RM, Hall L. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem J* 1992;285:863–70.
- [41] Rejraji H, Vernet P, Drevet JR. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* 2002;63:96–103.
- [42] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor University Press, 1989.
- [43] Schwaab V, Baud E, Ghyselinck NB, Mattei MG, Dufaure JP, Drevet JR. Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene* 1995;167:25–31.
- [44] Schwaab V, Lareyre JJ, Vernet P, Pons E, Faure J, Dufaure JP, et al. Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil* 1998;53S:157–62.
- [45] Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the boar epididymis. *Biol Reprod* 1996;55:956–74.
- [46] Vernet P, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev* 1997;47:87–98.
- [47] Vernet P, Rigaudiere N, Ghyselinck NB, Dufaure JP, Drevet JR. In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol* 1996;74:125–31.
- [48] Vernet P, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y, Dufaure JP, Drevet JR. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. *Mol Reprod Dev* 1999;54:362–70.
- [49] Vierula ME, Rankin TL, Orgebin-Crist MC. Electron microscopic immunolocalization of the 18 and 29 kilodaltons secretory proteins in the mouse epididymis: evidence for differential uptake by clear cells. *Microsc Res Tech* 1995;30:24–36.

Ce travail a consisté en l'étude de protéines de spermatozoïdes matures de différentes espèces, avec l'objectif de contrôler leur pouvoir fécondant.

Dans un premier temps une protéine antioxydante spécifique du tractus génital mâle, et acquise au cours de la maturation épидидymaire, la glutathion peroxydase 5 (GPX5), a été étudiée dans deux espèces d'intérêt agronomique : l'étalon et le taureau. Les semences de ces animaux sont fréquemment conservées pour des inséminations artificielles. Or lors de la conservation, les spermatozoïdes subissent entre autres un stress oxydant. L'ajout de cette protéine antioxydante dans le milieu de conservation pourrait limiter les dommages subis par les spermatozoïdes. Les séquences nucléiques spécifiques de cette protéine dans chaque espèce ont été obtenues. Les ARNm ont ensuite été localisés dans les canaux éférents et la tête épидидymaire équine, ainsi que dans la tête et le corps de l'épididyme bovin. Par ailleurs, la protéine bovine a été localisée dans la tête et le corps épидидymaire.

La seconde partie de ce travail a consisté à analyser des antigènes spermatiques spécifiques d'un rongeur fouisseur, le campagnol terrestre *Arvicola terrestris* Scherman dans le but de les utiliser pour une immunocontraception de cet animal nuisible. La détermination de protéines spermatiques susceptibles d'être immunogènes a été entreprise. Des peptides spécifiques de ces différentes protéines ont été sélectionnés. Par ailleurs, les voies d'immunisation de ce rongeur par les peptides choisis ont été étudiées. Les voies nasale et gastrique correspondent aux critères d'efficacité pour cibler la production d'anticorps au niveau du tractus génital, et de voies utilisables pour un rongeur fouisseur.

Mots clés : épидидyme, fertilité, immunocontraception, spectrométrie de masse

During this work, I studied proteins of matures spermatozoa from different species, with the aim to control their fertility.

In a first part, an antioxidant protein, specific of the male genital tract, and acquired during epididymal maturation, the glutathione peroxidase 5 (GPX5) was studied in two species of agricultural interest: stallion and bull. Semen of these animals are commonly preserved for artificial insemination procedures. During preservation, spermatozoa are submitted to various stresses (physical, mechanical, oxidative...) resulting in oxidative attacks of the sperm cells. The addition of the GPX5 antioxidant protein in media used for cryopreservation of semen could limit oxidative damages to spermatozoa. Specific nucleic sequences of this protein for each species were obtained. Messengers RNA were then localized in the efferent ducts and caput epididymis in the stallion, and in the caput and corpus of bovine epididymis. The bovine protein was localized in the caput and corpus epididymides.

The second part of this work consisted in the selection of specific sperm antigens of a fossorial rodent, the water vole *Arvicola terrestris* Scherman, to use them in an immunocontraceptive approach of this pest. The determination of sperm proteins epitopes was initiated. Specific peptides for these proteins were selected. In parallel, immunisation routes were studied. Our study shows that nasal and gastric routes allow the production of antibodies in the genital tract in mouse.

Key words: epididymis, fertility, immunocontraception, mass spectrometry

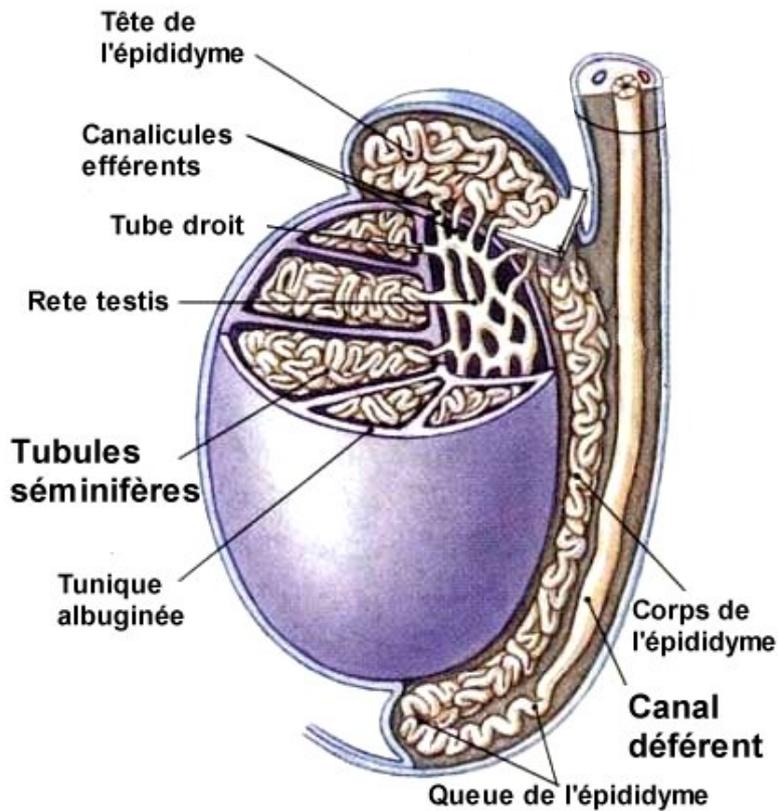


Fig. 1 : représentation schématique de l'épididyme accolé au testicule

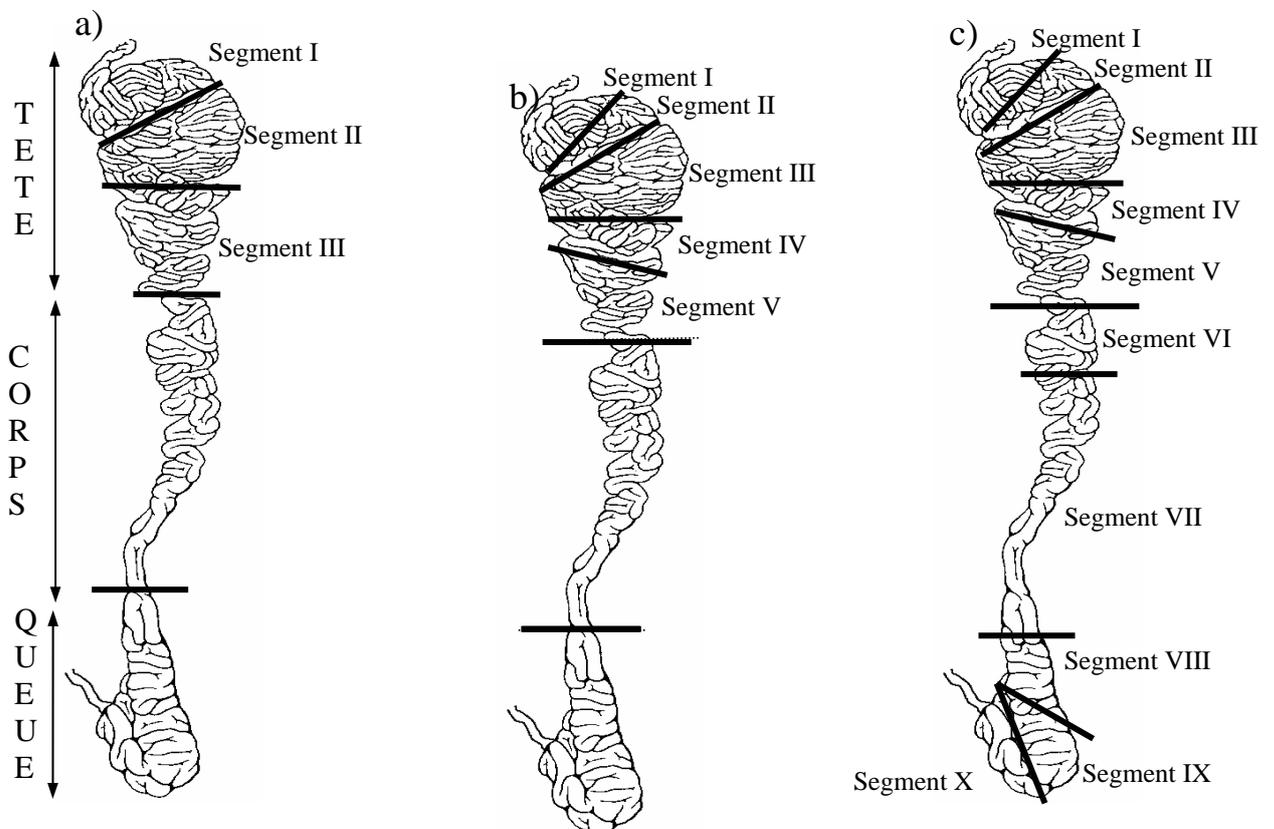


Fig 2: évolution de la régionalisation épидидymaire murine depuis vingt ans, en fonction de l'ultrastructure, de l'activité enzymatique, et de l'activité transcriptionnelle
Modifié d'après Abe et al., 1983 (a), Abou-Haila et Fain-Maurel, 1984 (b), et Johnston et al., 2005 (c)

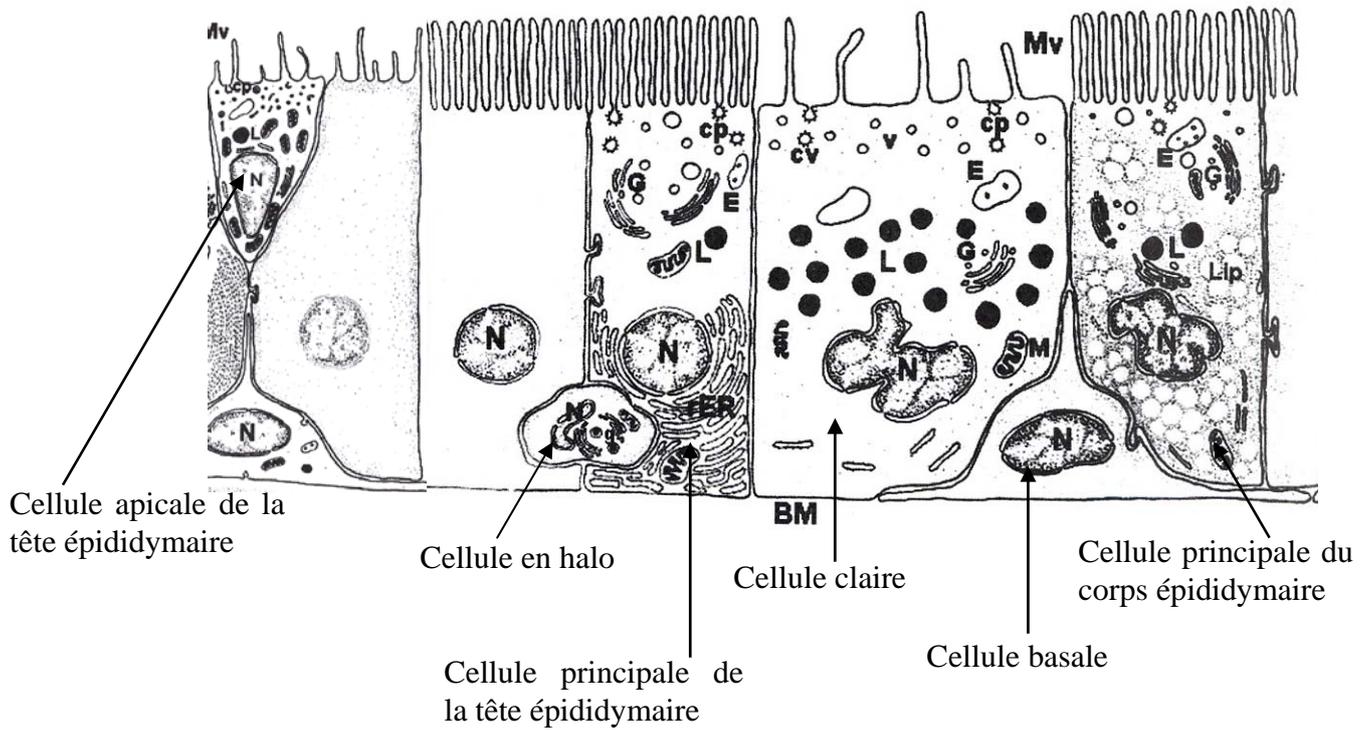


Fig. 3 : représentation schématique de différents types cellulaires épидидymaires de mammifères

cp : puits recouverts, E : endosomes, L : lysosomes, G : appareil de Golgi, rER : reticulum endoplasmique rugueux, lip : gouttelettes lipidiques, Mv : microvillosités, BM : membrane basale, N : noyau, v : petites vésicules apicales

Modifié d'après Herno et Robaire, 2002

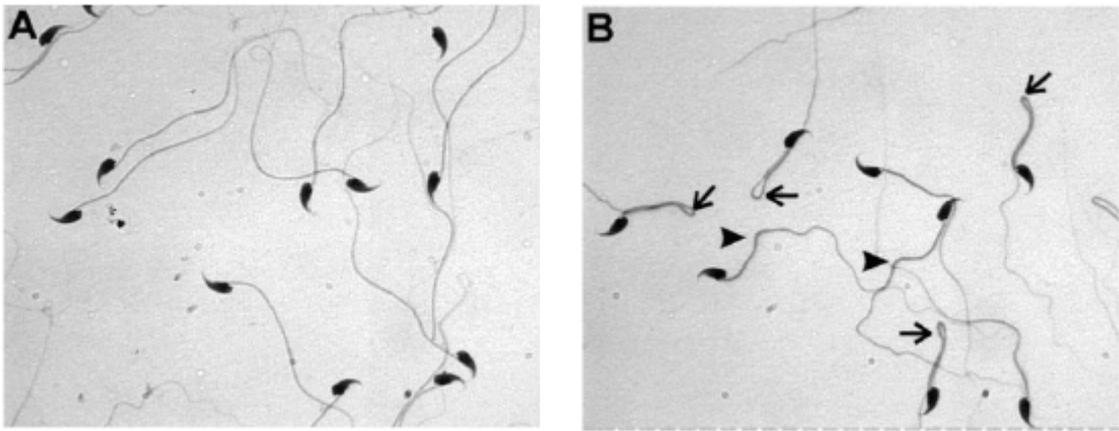


Fig 4 : photographie en microscopie optique de spermatozoïdes de la queue épидидymaire de souris sauvages (A), ou GPX5-Tag2 (B)

Flèches : structures en épingles à cheveux des flagelles

Pointes de flèches : flagelles torsadés

Modifié d'après Sipila et al., 2002

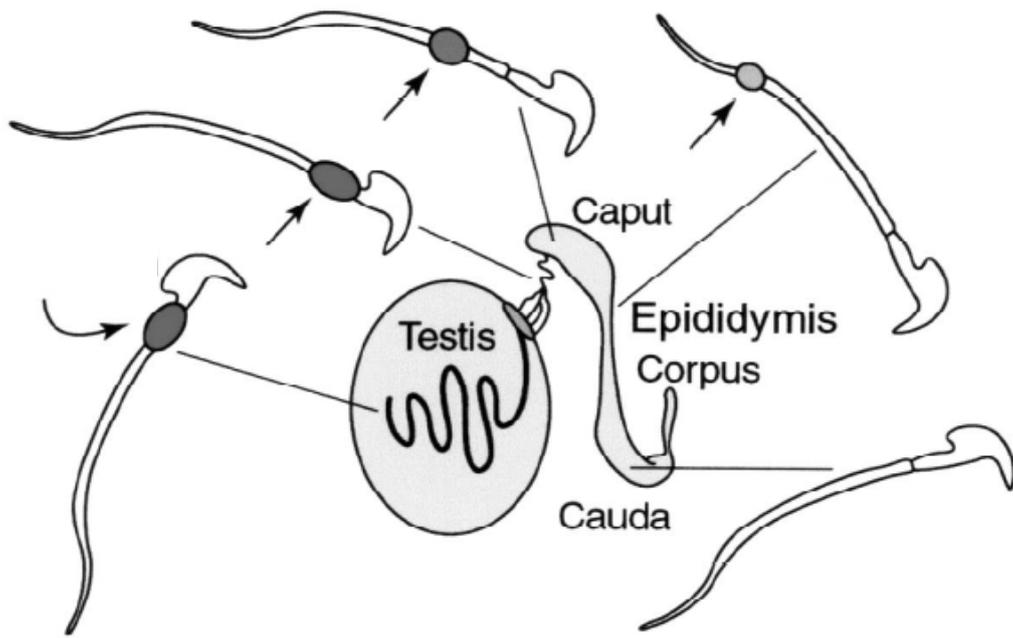


Fig 5: représentation schématique de la migration de la gouttelette cytoplasmique le long du spermatozoïde, au cours du transit dans le testicule et l'épididyme
Modifié d'après Hess et al., 2001

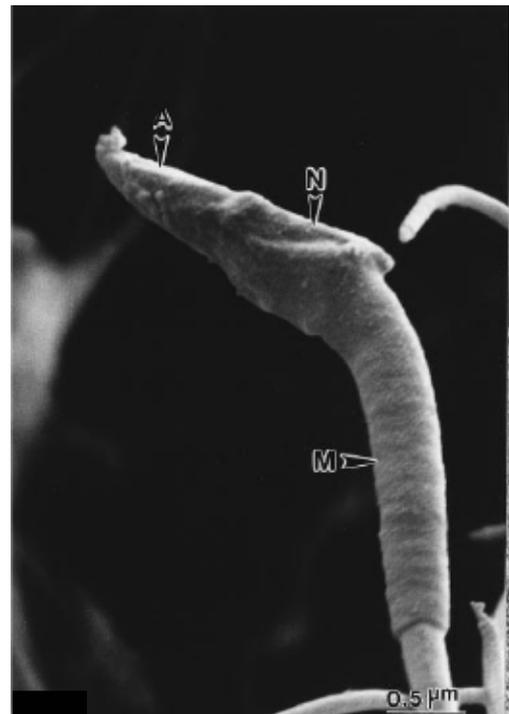


Fig 6: photos en microscopie à balayage de spermatozoïdes de la tête proximale (gauche), et de la queue distale (droite) de l'épididyme de wallaby
A : acrosome, N : noyau, M : pièce intermédiaire du flagelle
Modifié d'après Lin et Rodger, 1999

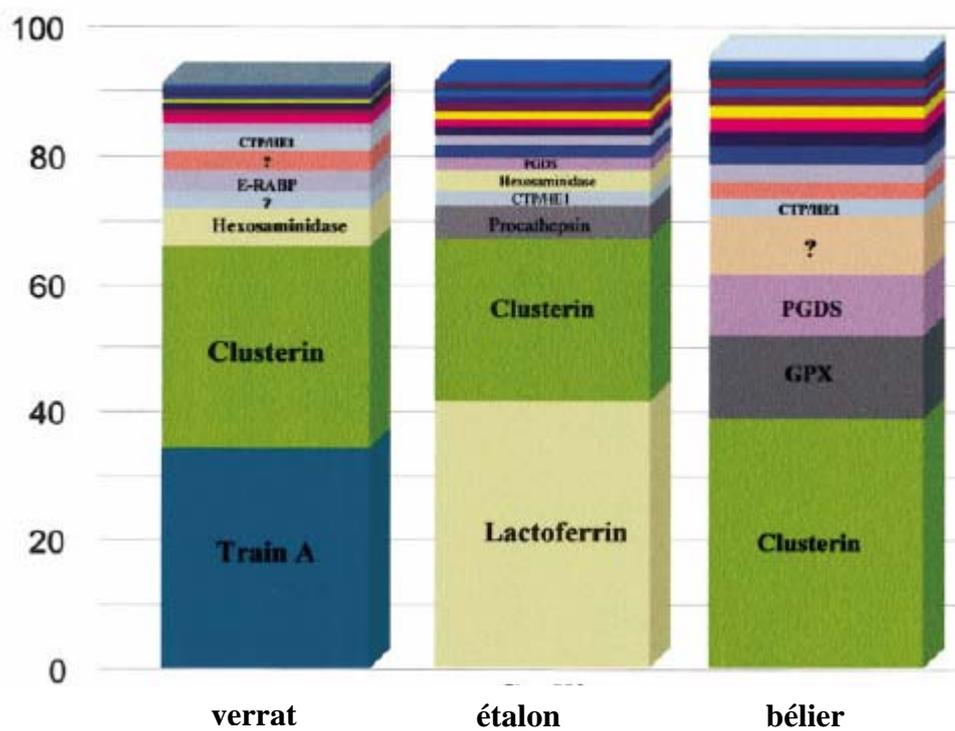


Fig 7: principales protéines épидидymaires sécrétées dans trois espèces, exprimées en pourcentage de la sécrétion totale de l'organe

CTP/HE1 : Cholesterol Transfer Protein, E-RABP : Epididymal Retinoic Acid Binding Protein, GPX: Glutathion Peroxydase, PDGS: Prostaglandine D2 Synthase

Modifié d'après Dacheux, et al., 2003

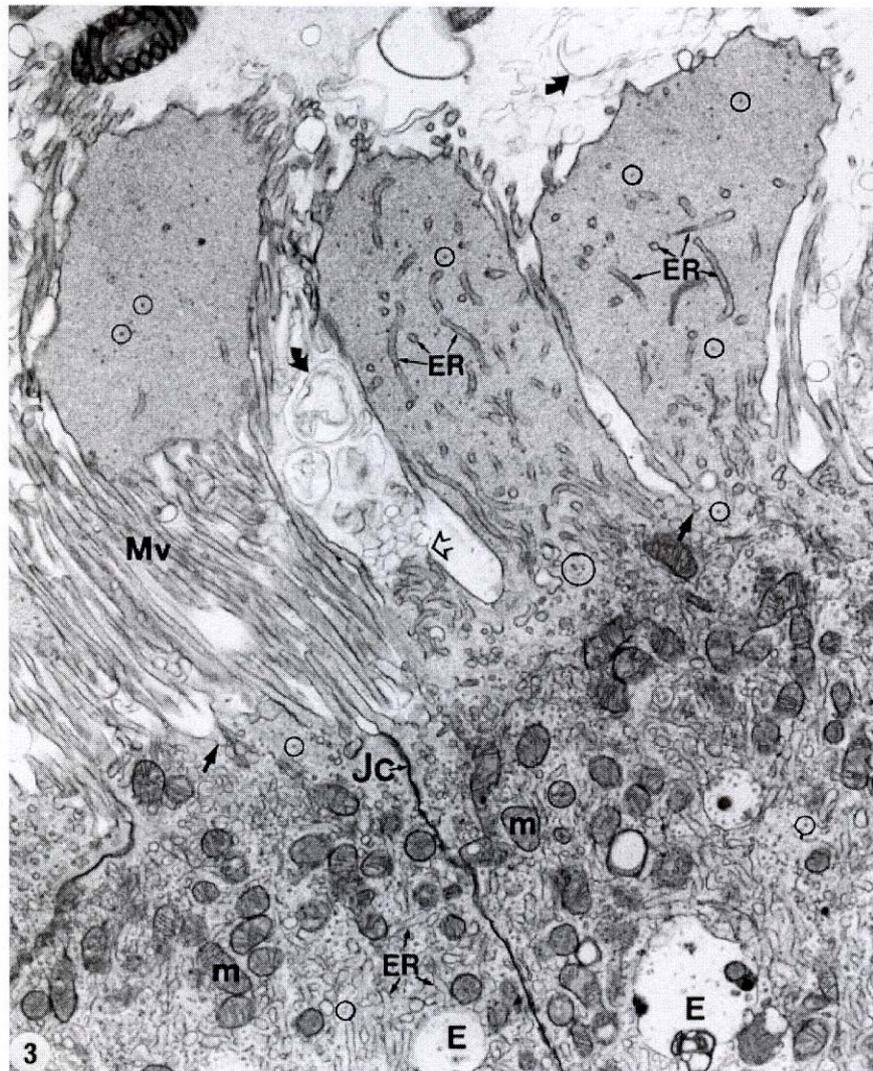


Fig 8 : protrusions apicales émises par des cellules principales de la tête épидидymaire chez la souris

E : endosome, ER ; reticulum endoplasmique, m : mitochondrie, Jc : jonction cellulaire, Mv : microvillosités

Modifié d'après Hermo et Jacks, 2002

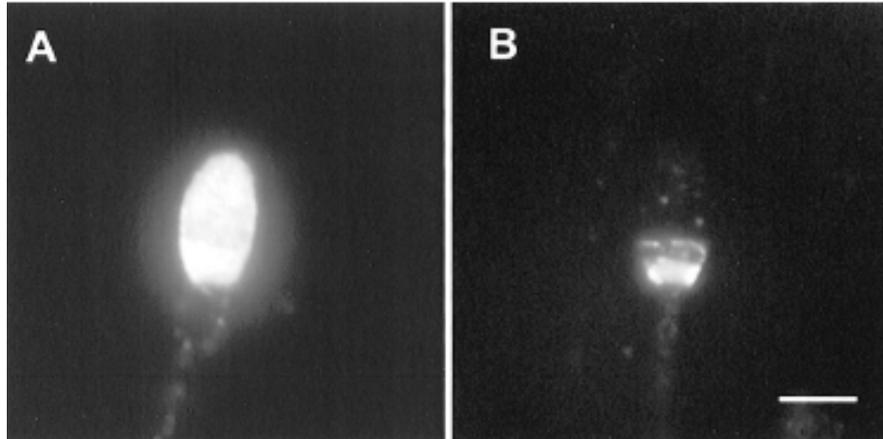


Fig 9 : immunolocalisation de la protéine PH-20 sur des spermatozoïdes équins. En A, la protéine est répartie sur la totalité du spermatozoïde de tête épидидymaire, alors qu'en B elle est restreinte à la région post-acrosomique des spermatozoïdes de la queue épидидymaire.

Echelle : 5µm

Modifié d'après Rutlant et Meyers, 2001

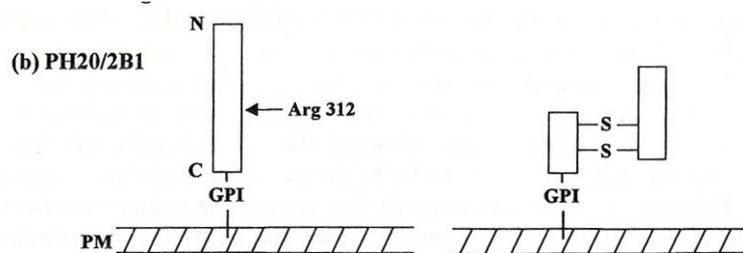


Fig 10 : représentation schématique du clivage endoprotéolytique précédant la migration de la protéine spermatique de surface PH-20, dans l'épididyme

PM : membrane plasmique, GPI : glycosylphosphatidyl-inositol

Modifié d'après Jones, 2002

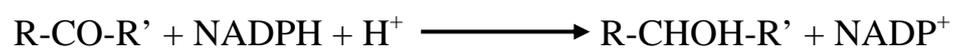


Fig 11 : réaction catalysée par la carbonyle réductase



Fig 12 : réaction de dismutation de l'anion superoxyde catalysée par les superoxyde dismutases



Fig 13 : réaction catalytique de la catalase

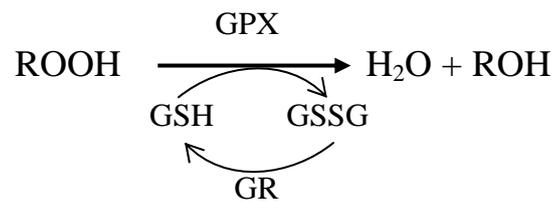


Fig 14 : réaction catalysée par les glutathion peroxydases
 GPX : glutathion peroxydase
 GR : glutathion réductase

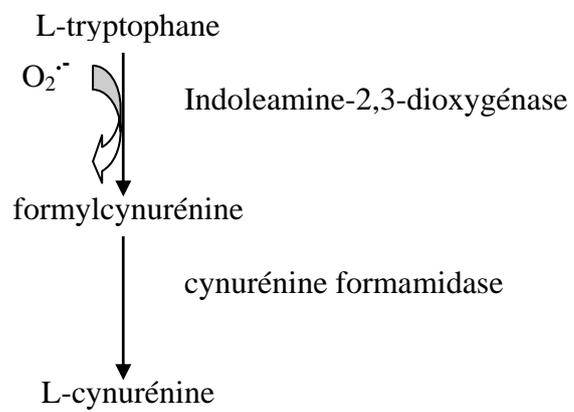


Fig 15 : voie de dégradation du tryptophane impliquant l'indolamine dioxygénase

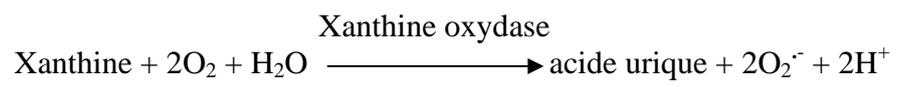


Fig 16: système xanthine-xanthine oxydase

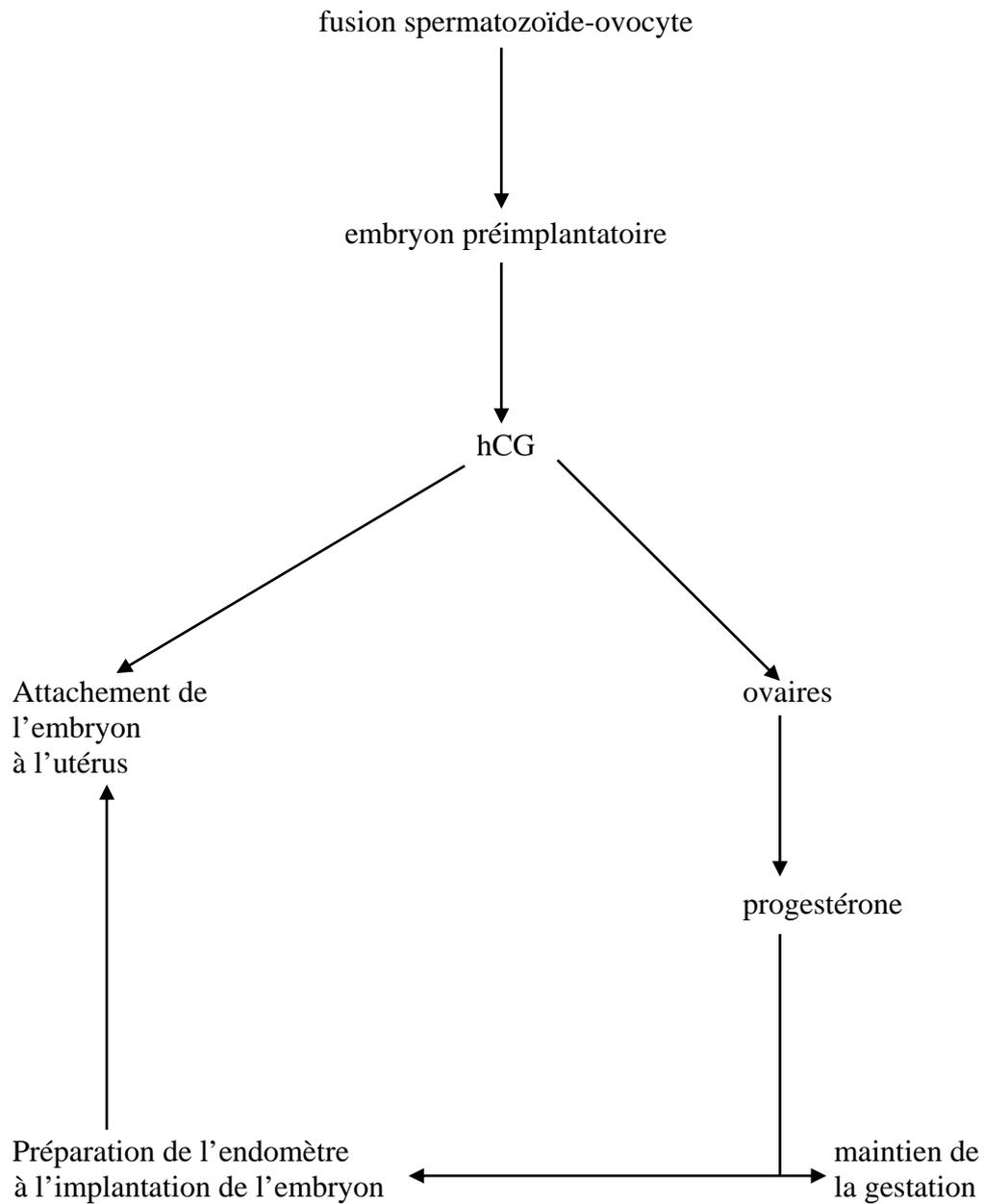


Fig 17 : représentation schématique de l'importance de l'hCG dans l'établissement et le maintien de la grossesse
Modifié d'après Talwar, 1997

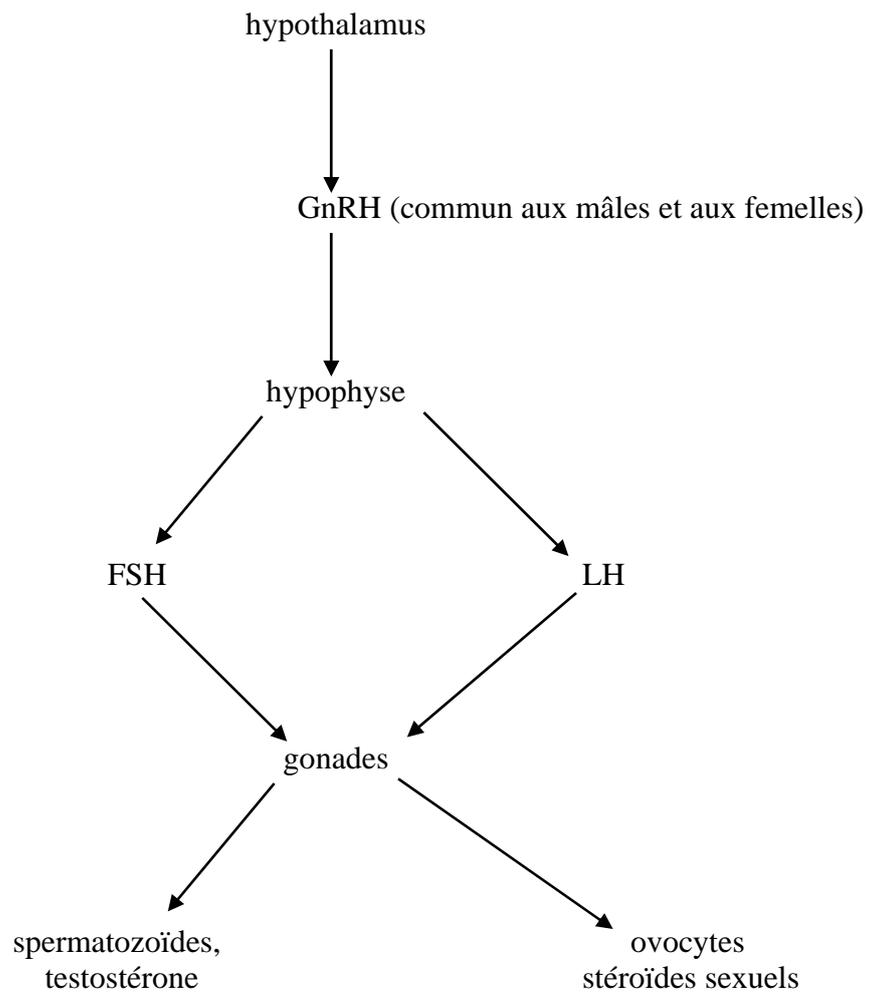


Fig 18 : représentation schématique du rôle du GnRH dans la formation des gamètes et des stéroïdes sexuels
Modifié d'après Talwar, 1997

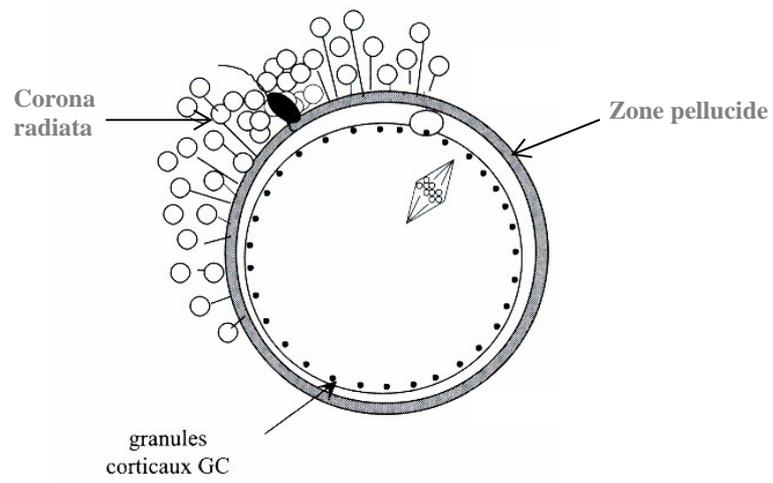


Fig 19: représentation schématique d'un ovocyte de mammifère
Modifié d'après Thibault 2001

Tableau 1 : récapitulatif des essais d'immunocontraception ciblant des antigènes spermatiques

(ne sont notés dans ce tableau que les essais d'immunisations pour lesquels l'impact des anticorps sur la fertilité a été étudié *in vivo*)

Antigène	Origine	Espèce(s)	Rôle de la protéine	Effet(s) de l'immunisation	Référence(s)
SP-17	testiculaire	souris	Liaison à la zone pellucide	Induit l'infertilité de souris femelles BALB/c, mais pas de souris B6AF1	(Lea et al., 1998)
FA-1	testiculaire	lapin, souris	Liaison à la zone pellucide	Réduction de la fertilité de souris femelles et de lapines	(Naz, 1987; Naz and Zhu, 1998)
LDH-C4	testiculaire	babouin, souris, lapin, renard, macaque	Métabolisme du lactate	Réduction de la fertilité de babouins mâles et femelles Pas de réduction de la fertilité chez le macaque femelle Diminution de la fertilité de souris mâles, mais pas femelles	(Goldberg et al., 2001; Mahi-Brown et al., 1990; O'Hern et al., 1995; Tollner et al., 2002)
DE AEG	épididymaire	rat	Fusion spermatozoïde-ovocyte	Diminution de la fertilité de rats mâles et femelles	(Ellerman et al., 1998; Perez Martinez et al., 1995)
YLP12	testiculaire	souris	Liaison à la zone pellucide	Diminution de la fertilité des femelles	(Naz and Chauhan, 2002)
SP-10	testiculaire	rat, souris		Pas d'arrêt de la spermatogenèse	(Sehgal et al., 1996)
PH-20 2B1 SPAM-1	testiculaire et épididymaire	cochon d'inde, souris	Pénétration du cumulus oophorus et liaison à la zone pellucide	Infertilité mâle et femelle cochon d'inde Pas d'effet chez la souris	(Hardy et al., 2004)
Fertiline PH-30	testiculaire	cochon d'inde, lapin	Liaison à la membrane plasmique ovocytaire	Infertilité complète des cochons d'inde mâles, et partielle des femelles Diminution faible de la fertilité de lapins mâles et femelles	(Hardy et al., 1997; Ramarao et al., 1996)
P10G		souris		Infertilité de souris femelles	(O'Rand et al., 1993)
YWK II	testiculaire	rat, homme	Signal de transduction	Diminution de la fertilité des rats mâles Inhibition de la fertilité des hommes	(Takikawa et al., 2001; Vanage et al., 1992)
P26h	épididymaire	hamster	Liaison à la zone pellucide	Diminution de la fertilité des mâles	(Bérubé and Sullivan, 1994; Gaudreault et al., 2002)
hSPI	prostate	lapin, rat	Inhibine	Diminution de la fertilité des mâles	(Mehta et al., 2003)

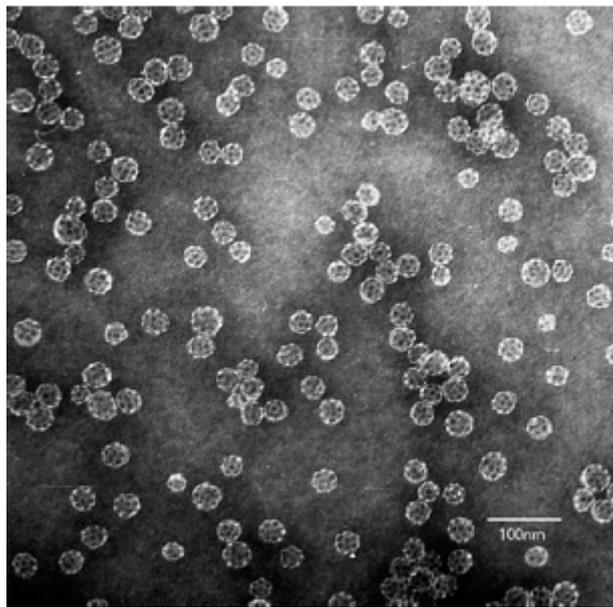


Fig 20 : photographie en microscopie électronique d'ISCOM
Modifié d'après Sanders, et al., 2005



Fig 21 : photographies d'*Arvicola terrestris* Scherman



Fig 22 : tumuli de terre dénotant la présence d'*Arvicola terrestris* Scherman

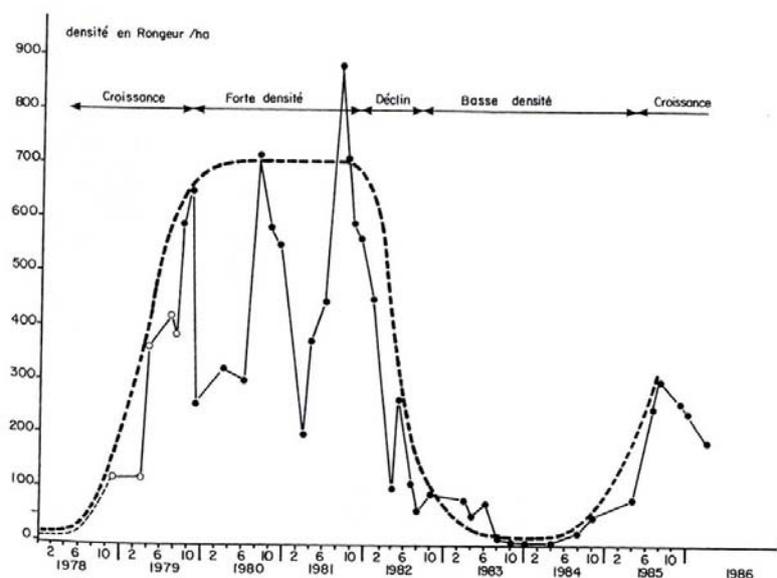
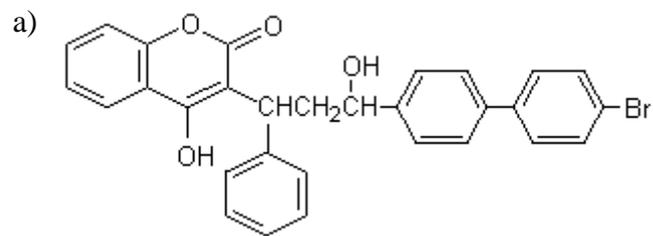


Fig 23 : évolution des densités de campagnol terrestre sur trois communes du Haut-Doubs, entre 1978 et 1986

En trait plein sont représentées les valeurs des suivis de populations, en tiretés, la courbe du cycle de pullulation lissée à la main

Modifié d'après Pascal et Boujard, 1987



b)



Fig 24 : bromadiolone (a) distribuée sur du blé par une charrue sous-soleuse (b), dans des galeries artificielles

Cette photographie nous a été fournie par la FNLON du Cantal.

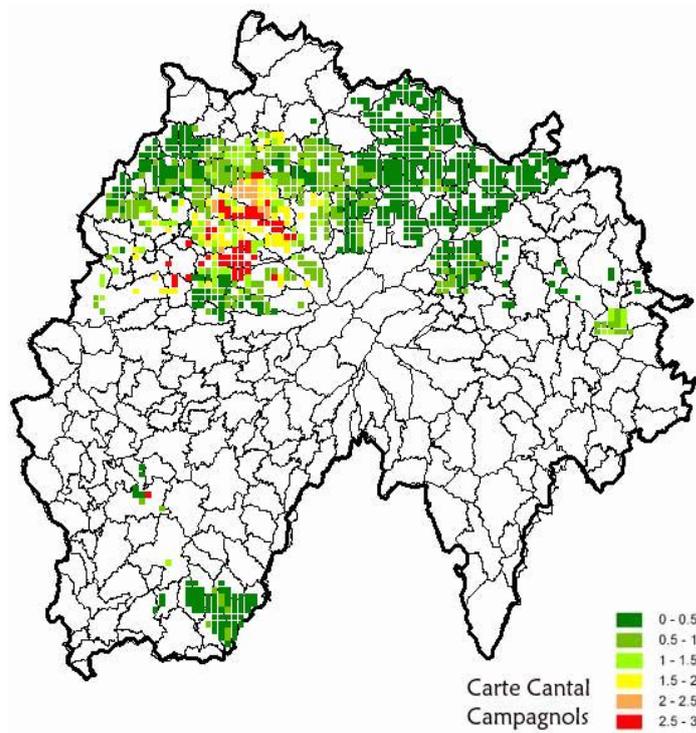


Fig 25 : exemple de carte de densité de population de campagnol, du réseau d'observation campANET. Observations réalisées dans le Cantal, entre août et novembre 2002.



Fig 26 : photos des différentes étapes du piégeage d'un campagnol terrestre
a, b : présentation du matériel (sondeur et bêche), c : localisation d'une galerie à l'aide du sondeur, d : entrées de 2 galeries, e : présentation du piège ouvert à ses 2 extrémités, f : piège posé en terre, g : l'anesthésiant est versé dans l'enceinte, h : l'animal capturé est libéré et anesthésié, puis i : sexé, et j : pesé

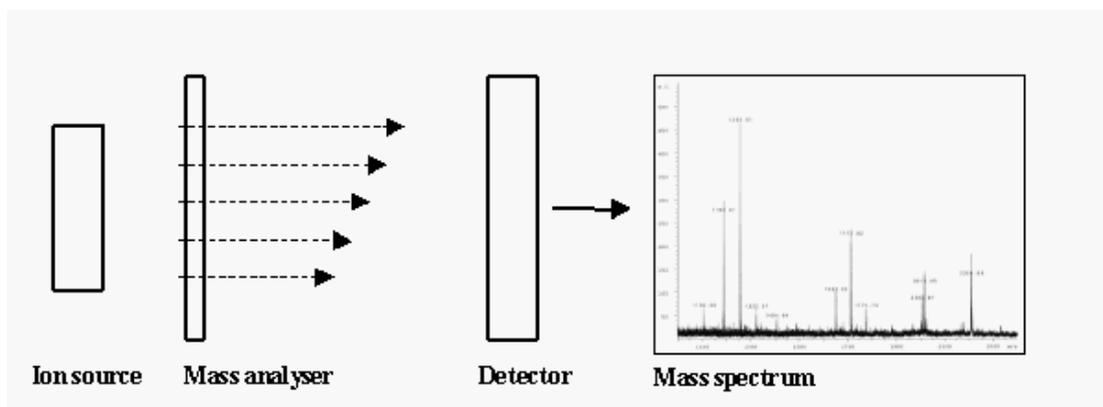


Fig 28: schéma général de la spectrométrie de masse

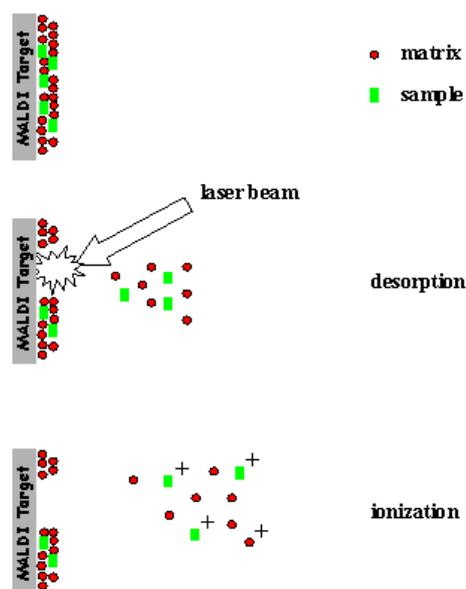


Fig 29 : représentation schématique de l'ionisation d'un échantillon

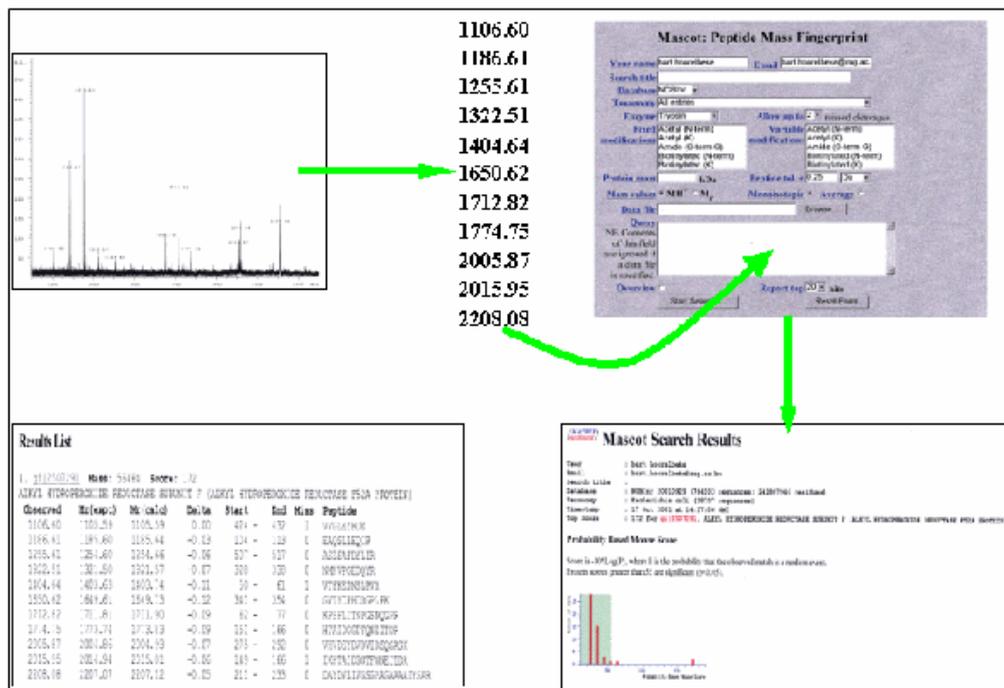


Fig 30 : identification d'une protéine par les profils de ses peptides

Tableau 2: séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR

cible	oligonucléotide 1 (5'-3')	oligonucléotide 2 (5'-3')	température PCR
GPX5	pz35 CGCAAGCTTCC(G,C)TGCAA(C,T)CA(A,G)TT(T,C)GGA(A,C)AnCA(G,A)G	pz37 CGCAAGCTTGAACTTCTCAAAGTTCCAG(G,C)(G,C)(A,G)ATGTC	50°C
GAPDH2	ArvGAPDH2Fw CTGACCGTGGGCATCAA(CT)GG(AGCT)TT(CT)GG	ArvGAPDH2Rev ATGCCGGCCTTGGC(AG)TC(AG)AA(AGT)AT	64°C à 56°C
Murine EST	Arv12Fw CGGTACCAGGTGGGCAA(CT)AC(AGCT)TA(CT)GG	Arv12Rev GGACCGGTAGATGTGGGTG(GC)T(AT)(AGCT)GGCCA(AG)TG	64°C à 56°C
GPX4	ArvGPX4Fw GGTGGACATGCACGCC(AC)(G)C(AGCT)TA(CT)GC(AGCT)GA	ArvGPX4Rev CAGGAACCTGGTGAAGTTCCA(CT)TT(AGT)AT	64°C à 56°C
GSTμ	ArvGSTμFw TCCCAGTGGCTGGACG(AT)(AGCT)AA(AG)TT(CT)AA	ArvGSTμRev TCCAGGACGTCGTAGGTCA(AG)(AG)AA(AG)TC(AGCT)AC	46°C à 38°C
P26h	P26Fw GCCGGGACACCGTGAA(AG)GC(AGCT)(CT)T(AGCT)CA	P26rev GCAGGAACAGGATGGAGTTCA C(ATGC)AC(AG)TC(CT)TC	66°C à 58°C
SP-10	SP-10Fw GCGAGTACTTCTCCCTGGAGAA(CT)CC(AGCT)(AT)(GC)(AGCT)GA	SP-10Rev GGAGAACAGGTTTCATGGAGGG(AG)CACAT(AG)CACAT(AG)TT	65°C à 57°C

Tableau 3: séquences des oligonucléotides utilisés pour la RACE

espèce	extrémité	oligonucléotide 1 (5'-3')	nested oligonucléotide (5'-3')
taureau	3'	AATCCTGTCCTCACCCCTTCTG	CTGGGAACCCATCATGGT
taureau	5'	CTGAGTTTTCTCCTGGTTCC	CCTGATTTCCAAACTGATTGCA
cheval	3'	ACTCCTGTCCTCACCCCTCTG	CTGGGAACCTATAAAGGT

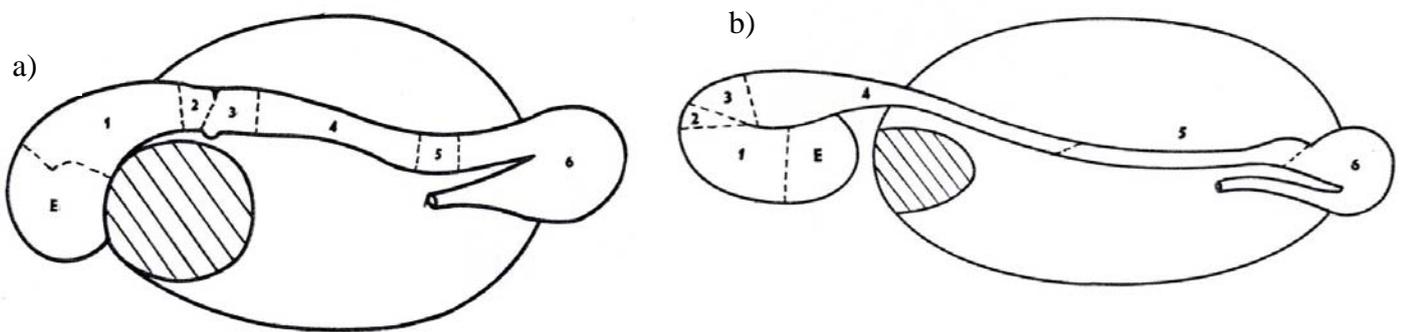


Fig 31: représentation schématique d'un épидидyme équin (a) et bovin (b), selon Nicander (1957)

La zone hachurée correspond au cordon spermatique, E : canaux efférents, 1, 2, 3 : segments de la tête épидидymaire, 4, 5 : segments du corps épидидymaire, 6 : queue épидидymaire.

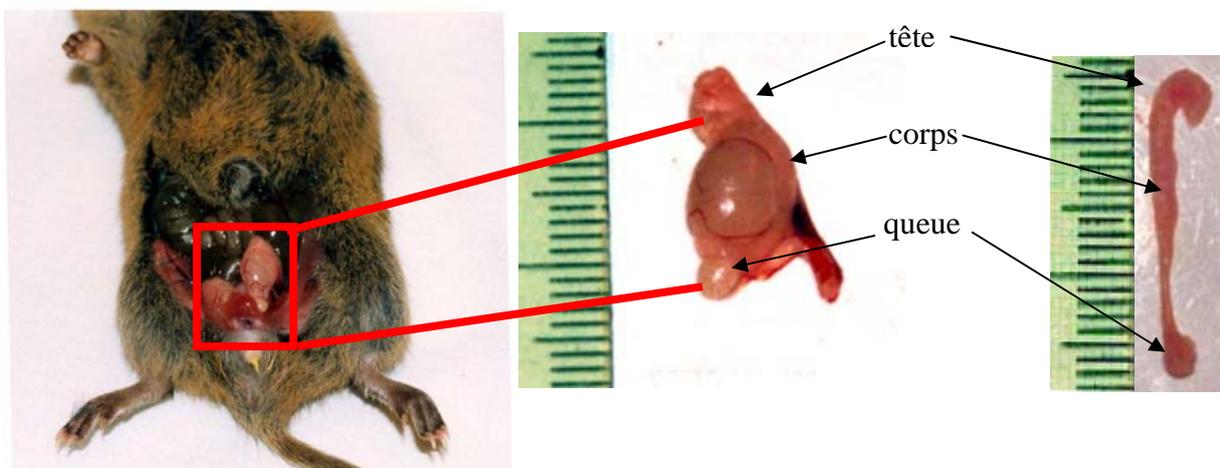


Fig 32 : photos d'épididyme et de testicule d'*Arvicola terrestris* Scherman

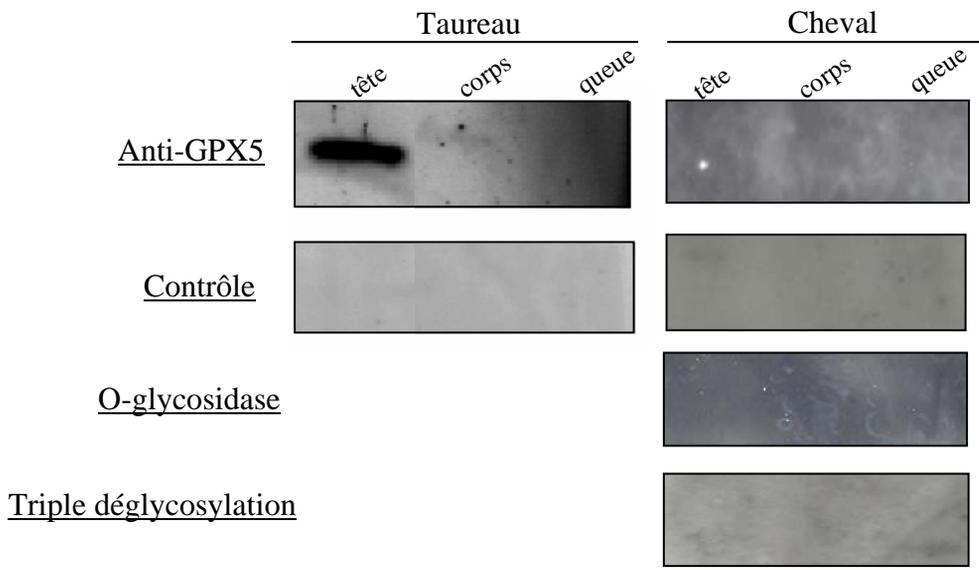


Fig 33: détection par western blot de la protéine GPX5 chez le taureau et l'étalon

a)		
CTCTCAGACCAGTGATCTGAGGATACTACCA ATG ACTATACAGTTAAGGGCCTCTTGCTTTTTCTCTTTTTCTAGCCGGCTTT		84
	<u>M T I Q L R A S C L F L F F L A G F</u>	18
GTGCAGACAAATTCCAATCTAGAGAAGATGGATTGCTACAAAGATGTGAAAGGCATCTATGATTATGATGCTTTCACTCTT		168
<u>V Q T N S N L E K M D C Y K D V K G T I Y D Y D A F T L</u>		46
AATGGAAGGAACACATTCAGTTCAAGCAATATGCGGGCAAGCATGCTTTTTGTCAATGTGGCCACCTATTGTGGTCTGACA		252
N G K E H I Q F K Q Y A G K H V L F V N V A T Y C G L T		74
GCTCAATATCCTGAAGTGAATGCACTACAGGAGGAGCTGAAGCCCTTTGGCCTAGTTGTGTGGGATTTCCGTGCAATCAGTTT		336
A Q Y P E L N A L Q E E L K P F G L V V L G F P C N Q F		102
GGAAATCAGGAACAGGAGAAAACACTCAGAAATCTTCCAGGACTGAAGTATGTCCGTCCAGGAGGAGGATACGTACCTAATTTCC		420
G N Q E E P G E N S E I L P G L K Y V R P G G G Y V P N F		130
CAACTGTTTAAGAAAGGGGATGTGAATGGTGAACAGAGCAGAAAGTCTCACCTTTTAAAGCAATCCTGTCTCCACCTTCT		504
Q L F K K G D V N G E T E Q K V F T F L K Q S C P H P S		158
TGGGAACCCATCATGGTCCGTGACATCCGCTGGAATTTGAAAAGTTCCTAGTGGGACCTGATGGCATCCCTGTGCATGCGCTGG		588
W E P I M V R D I R W N F E K F L V G P D G I P V M R W		186
TTTCATCGGACTCCAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT		672
F H R T P V S T V K T D I L A Y M K Q F K T K *		209
GGGGCAGGAGCCATCCTGCTTCTTTACCTGAAGACCTGTTTTAAAAACAAAATCTTTCTCTACATTTCTTCTTAAATGCCCT		756
CCACTTGACTAAATCACATATAGTGCCAAAATTTCCACTCTCTATCAAGTAGATTTATGTTTCAAGACTACTACTATTTCCCT		840
CTGCACGAGTATGTGGTAAAGAGAAAAGAAATCGAAACCCCTAAACCCCTCAGCTATCTGTTAAACAAGTTTAATAAAAATATATATAT		924
ATATATACCTCCCTAGAGGGGCTGGCAACCCACTGCAGTATTCTTGCTGGAGAATCCCATGGACAGAGGAGCCTGGCAGG		1008
CTGCAGTCCATGGAGTTGCAAAGAGTCAAGTATGACTGAGTACTAAGCAGTATATATGTGTAGATATATATATCTACACAC		1092
ACACACATATATATATATCAAAAGAAAATCATTCATCCATGAGGATAGGTCAAATTTGGCATGATATCCTGAAAAAGAAATGTTCC		1176
TACACATTTCTGAGTCTTCTTCTTCTCTACCTTAAATGTGTAGAATTGACAATGCGGTGAACAGCCGTACAATTTAAGTTCTA		1260
CTTCATAACATTTGTCTTCCCTTAGAAGAAACATGTAAGTCAATTTCCAAAGATTTTCAGATCAGTCTTTTCCATGACACCC		1344
CACCCACCTACCTCCACTGATGTGCTACTCTTTTGTAGGAGCCCTAGATAGAGTGGGAGCAAGAAATTCCTTACGTGAAGGG		1428
AAGAGTATCTCCATGACAGTGGCAGTCAAGCCTCTTTTAAATTCGGACCCCTACAAAAATTTCTCTGTCTGATCTTTAGTGT		1512
ATTCAGATTATGATACTTGGGCAGAAACCTCTGAAAAGATAGGCTTCCCTTCTCAACCGTAGAACCCCTTAGCTTCAGAACCA		1596
GCCCTGCAACTATCTCCA ATAAA		1619
b)		
GAGAACTCAGAGATCCTTCCGGGGCTGAAGTATGTCCGTCCGGGGGGAGGATATGTACCTAATTTCCAGCTTTTTGAGAAAGGA		84
E N S E I L P G L K Y V R P G G G Y V P N F Q L F E K G		28
GATGTGAATGGTGAAGAAAGAACGAAAGTCTTCCACTTCTTGAAGCACTCTGTCTCACCCTCTGATGTTTTGGGCTCATT		168
D V N G E K E Q K V F T F L K H S C P H P S D V L G S L		56
AAACATATATCCTGGGACTGGGAACCTATAAAGGTCATGACATCCGCTGGAATTTGAAAAGTTCCTGGTGGGGCCTGATGGA		252
K H I S W D W E P I K V H D I R W N F E K F L V G P D G		84
GTCCCTGTCATGCGCTGGTTCATAAGACTCCGGTCAGTACAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT		336
V P V M R W F H K T P V S T V K S D I L A Y L K Q F K I		112
AAAAGGGAGGCTGAATTTGGGGCCAGGAGCCACCCTGCTTCTCAATGAAGACCTGTTCAAAGAAAAGTCCATCTTCTTACTACA		420
K K G G *		116
CTTCTTCTCAATGGCCTCCACTTGACCAAAATCACCTCTATACTGTTAGAGTTCCTACTCTCTACCGAGTAGATTTATACTCA		504
CGAGTCTACTACTATCTTCTTGCAGAGTATGTGAGTGAAGAACAAAAGAAATGAAACCTAAATCCTCAACCTCTGTTTAAA		588
ATTAGGAATTCATATCCATCAAGGAAAATCATCTTTCTATGAGGATGGTTCAGTGTGCCACAATATCCCGAAGAAGATGTTCC		672
CTAGACATTTTACTCTCCGCTCTCTCTACCTAAGGATAAAGAACAGCAATGGGGTTACGGCCATACAATTTAGTTTCCA		756
CTCCATAAGATTTTCTCCCTGAGATAAGCATGACTGTGAGTTCCTCAACTCTTTTCAGATCAGTCTTCAACCATGACACCT		840
CTGCCCTGCACCCCTCTGCCCCGCTGATCTGTCAATCTCTGTAGGAGCCCTAAGGTAGAGTGGGAGCAGGAAATTCCTC		924
ACATGAAGGGAAGGACATCTCCACGATAGTGGACCTAGAGCCTCTCTCTTAAATTTGGACCTACAAAAACTTTCTTATGTC		1008
TGATCTTTAGTGTATTAGGTTATGACACACTGGGCAGGGCACCCTTTGAAGGATGGACTTTCCCTTTTAAACCTAGATTCCA		1092
CAGCATCAAAAACAGACCTGCCACCATCTCC ATAAA ATGTTTTCTGCAGCAAAAAAAAAAAAAA		1160

Fig 34: séquences nucléiques et peptidiques de GPX5 chez le taureau (a) et le cheval (b)
 Le peptide signal putatif de GPX5 bovine est souligné. Les codons initiateur (ATG), et stop (TGA, TAA), ainsi que le signal de polyadénylation putatif (AATAAA) sont marqués en gras.

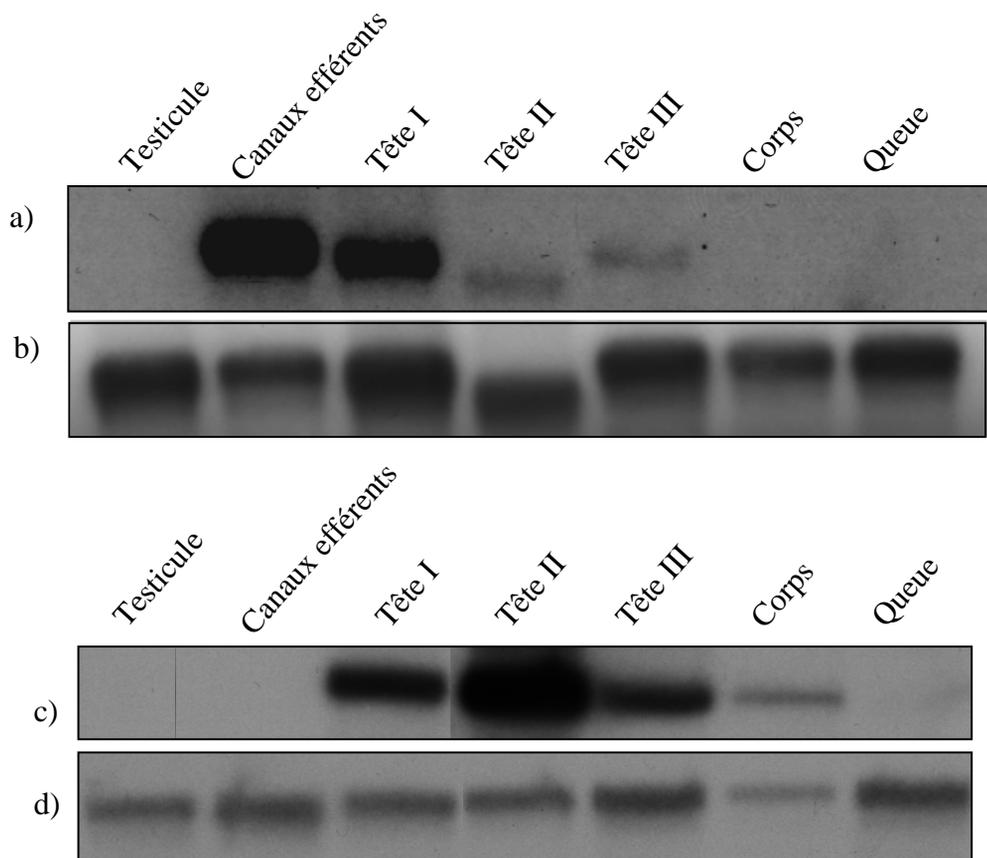


Fig 36: analyse en northern blot de différents tissus équins (a, b) et bovins (c, d). Les sondes utilisées correspondent à GPX5 (a, c), et 18S (b, d)

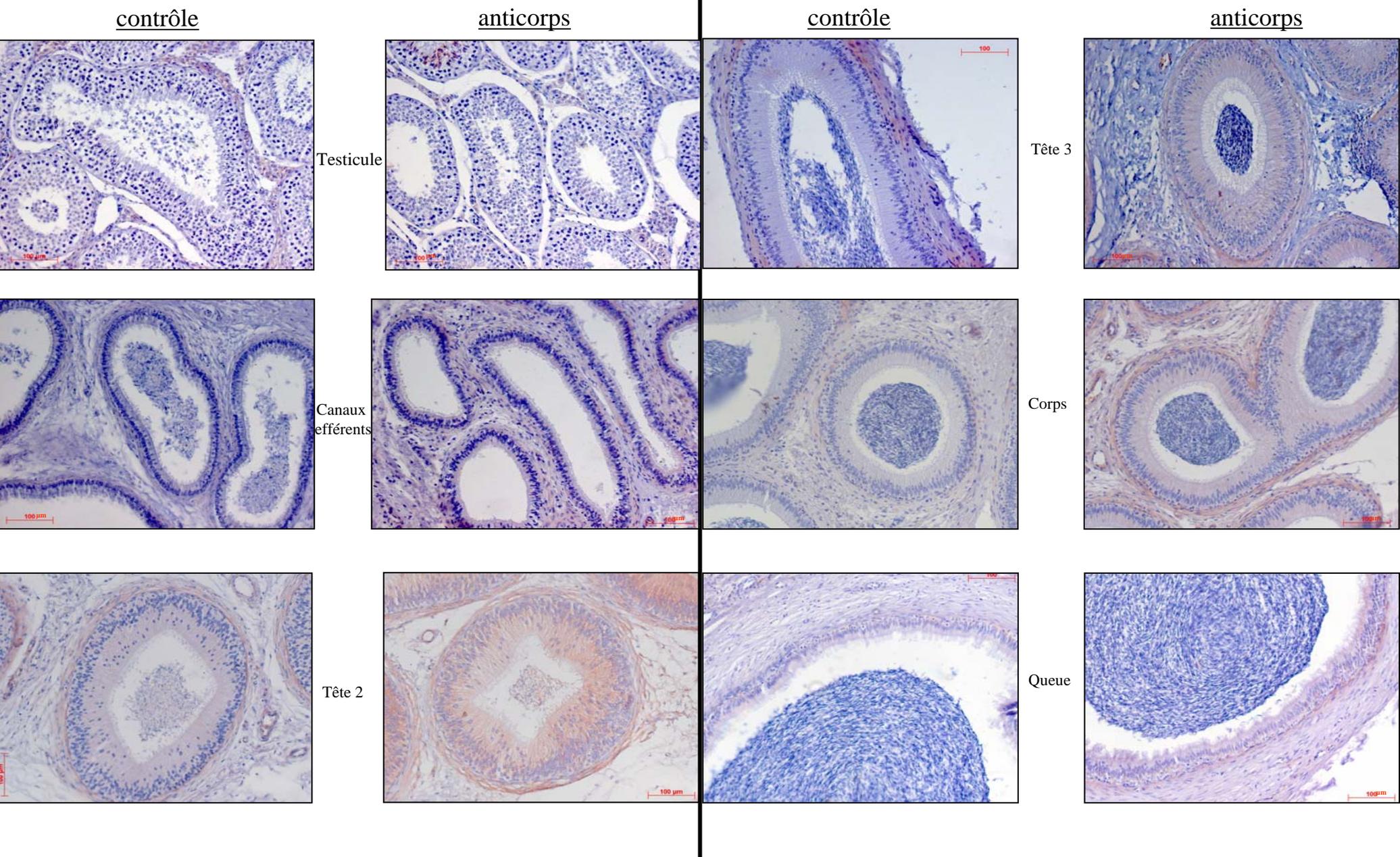


Fig 37: détection immunologique de GPX5 sur des coupes histologiques de testicule et d'épididyme bovin

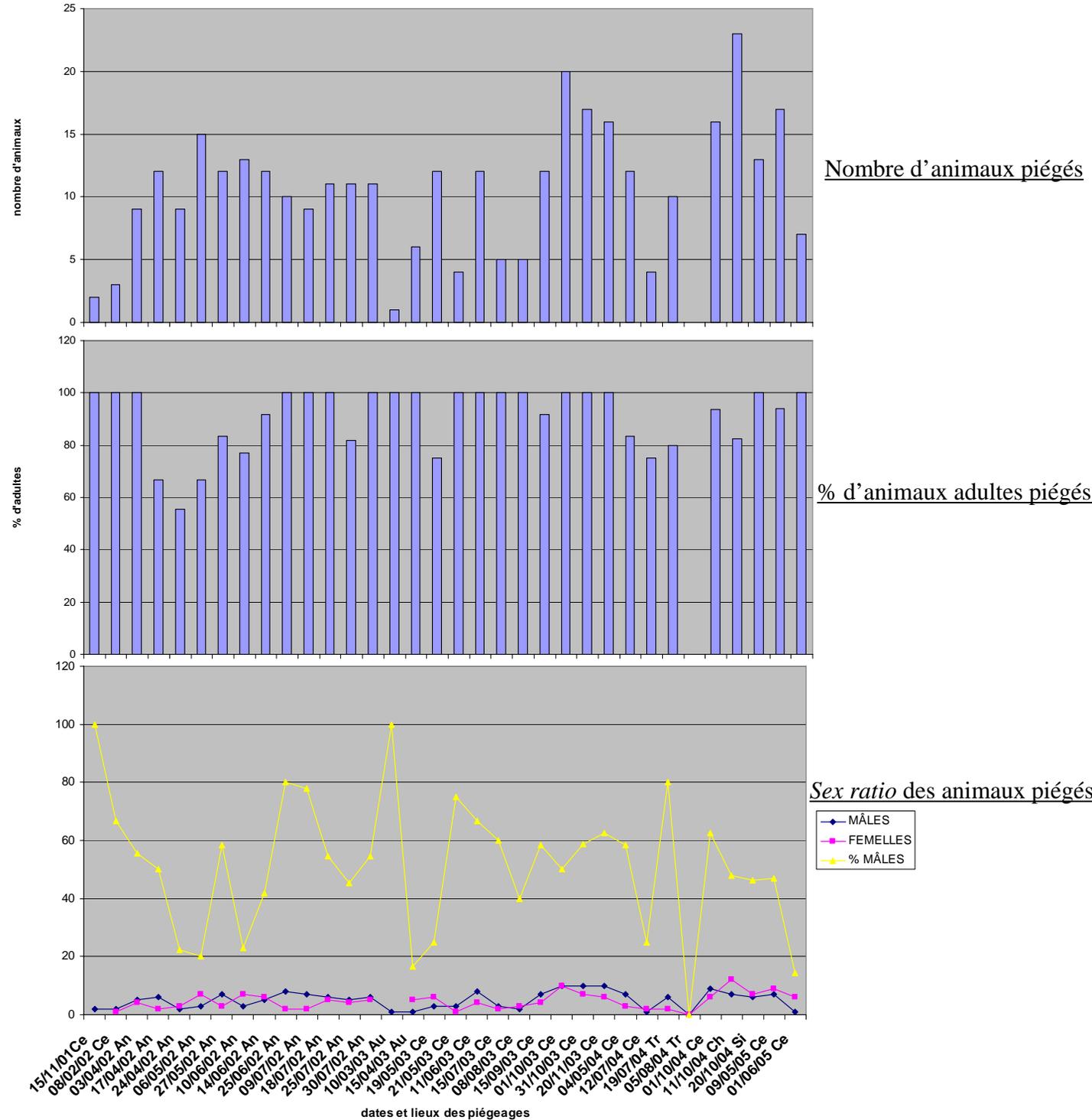


Fig 38: représentations schématiques des statistiques de piégeage d'*Arvicola terrestris* Scherman, de novembre 2001 à juin 2005. Les lieux et dates de piégeages sont identiques pour tous les graphes. An: Anglars-de-Salers (15), Au: Aurières (63), Ce: Ceysnat (63), Ch: Chambon sur Lac (63), Si: Siauges Ste Marie (43), Tr: Trizac (15)

Tableau 4: statistiques des captures par jour de piégeage et par année

Année	Jours de piégeage	Animaux piégés	% d'adultes	% mâles
2002	13	10,5 ± 2,8	86,4 ± 15,7	50 ± 19,5
2003	11	10 ± 6,1	97 ± 7,7	55,7 ± 2,9
2004	7	11,1 ± 7,5	73,5 ± 33	45,7 ± 26,2
2005	2	12 ± 7	97,1 ± 4	30,7 ± 23

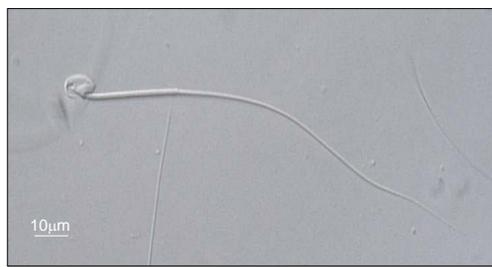


Fig 39: observation microscopique en contraste de phase d'un spermatozoïde de campagnol adulte, de la queue de l'épididyme

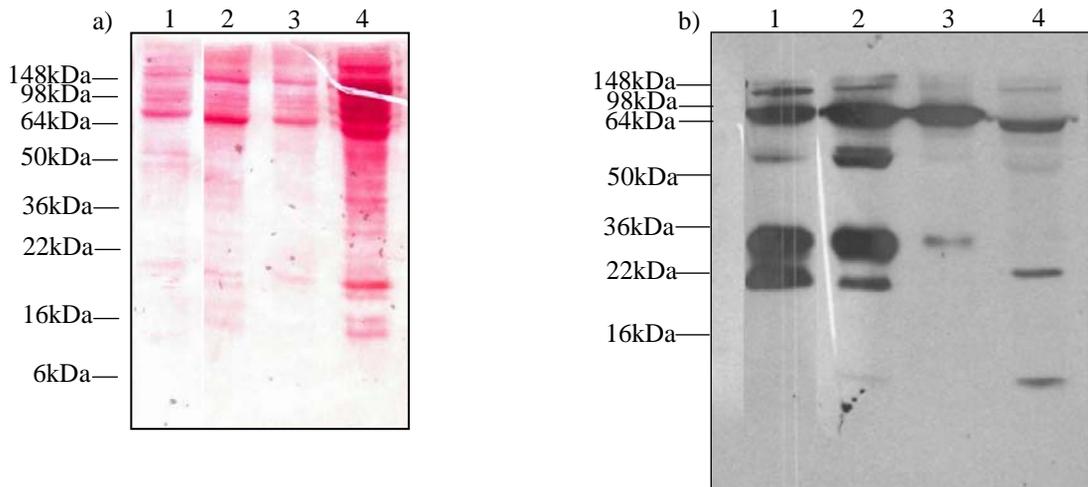


Fig 40: détection par western blot de protéines spermatiques et épидидymaires de campagnols et de souris

a) membrane colorée au rouge Ponceau, b) western blot correspondant

Piste 1: protéines spermatiques membranaires de campagnol

Piste 2: protéines spermatiques solubles de campagnol

Piste 3: protéines épидидymaires de campagnol

Piste 4: protéines épидидymaires murines

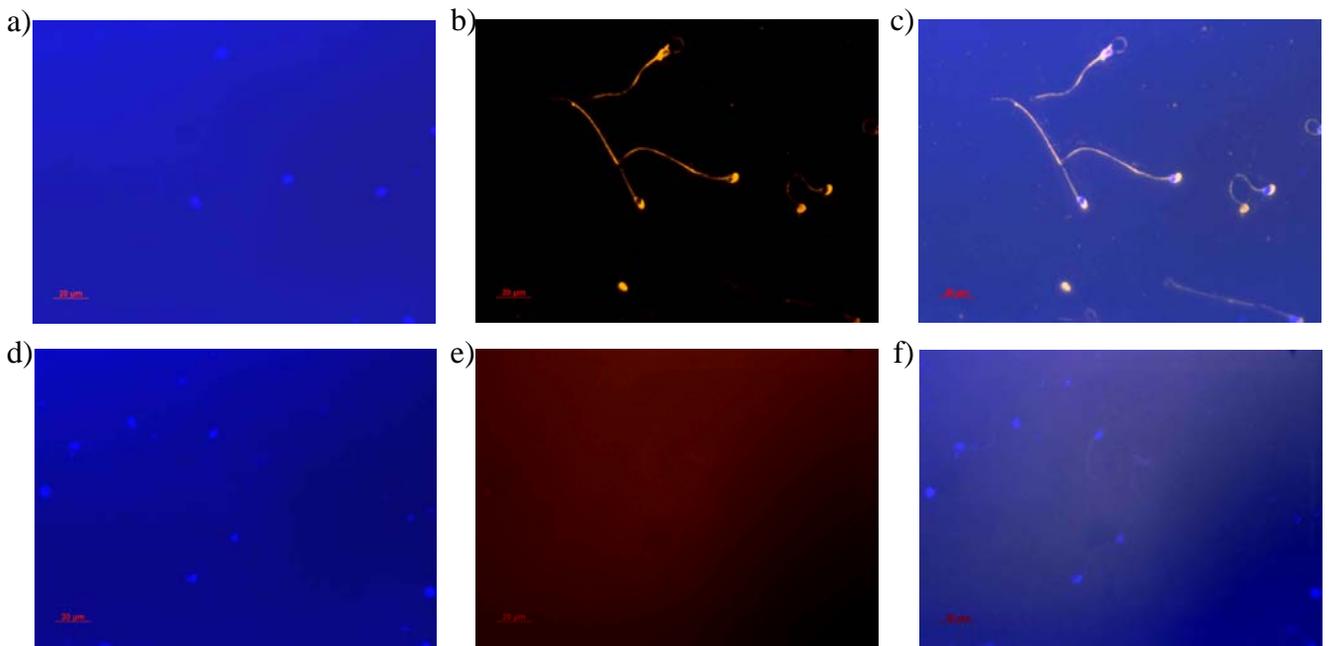


Fig 41: détection par immunofluorescence des antigènes spermatiques de surface reconnus par les sérums

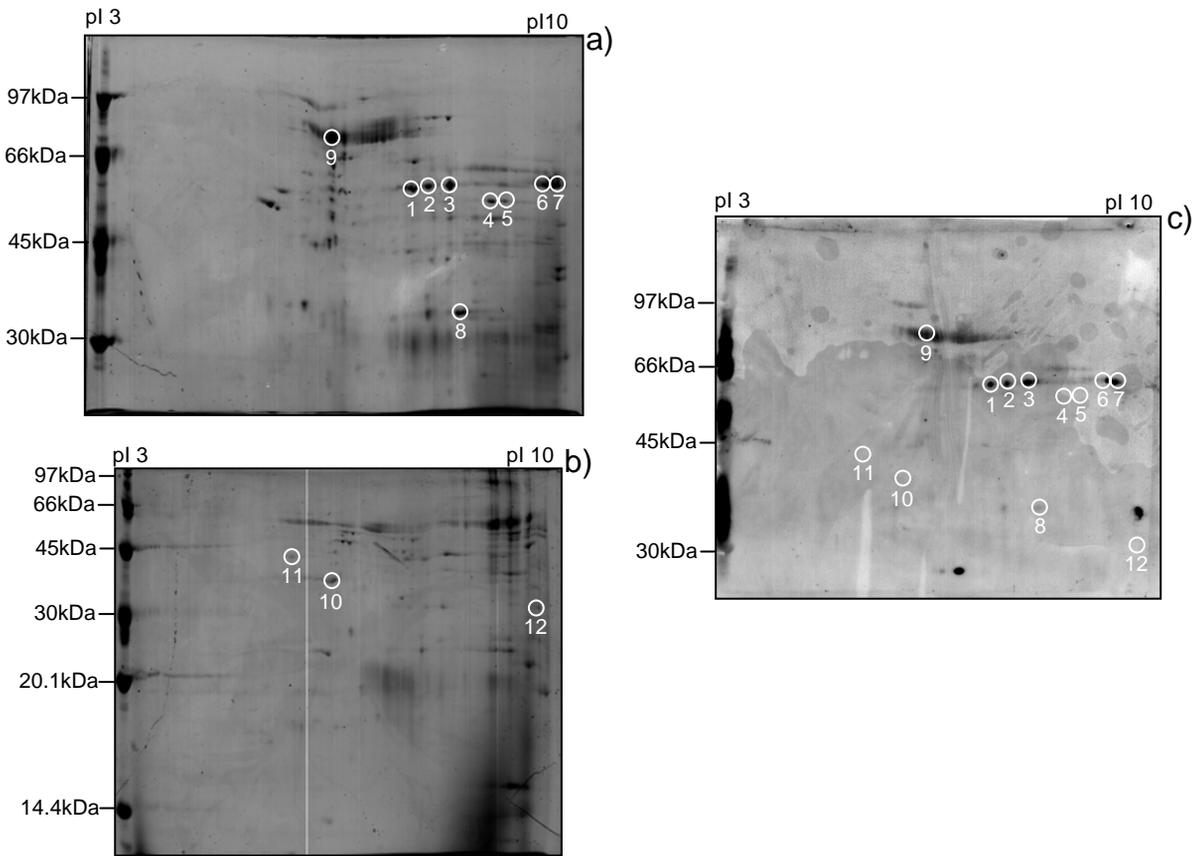
(a, b, c), ou par un sérum préimmun (d, e, f)

a, d: détection des noyaux au DAPI

b, e: détection des antigènes par des anticorps marqués au TRITC

c, f: superposition des deux signaux

Méthode d'extraction protéique A



Méthode d'extraction protéique B

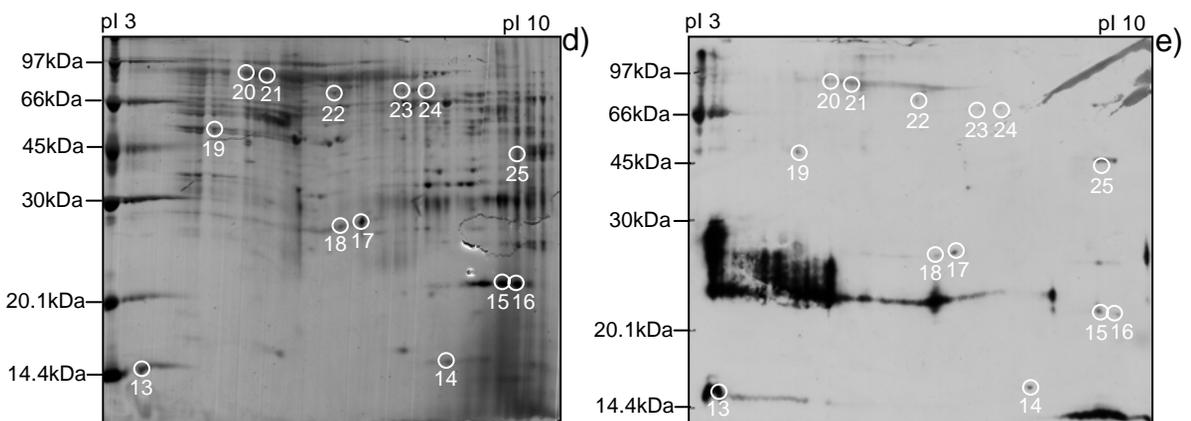


Fig 42: gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines spermatiques membranaires, colorées au bleu de Coomassie colloïdal (a, b, d), et les western blot correspondant (c, e).

Les spots présents à la fois sur les gels et les membranes sont entourés. Ils ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

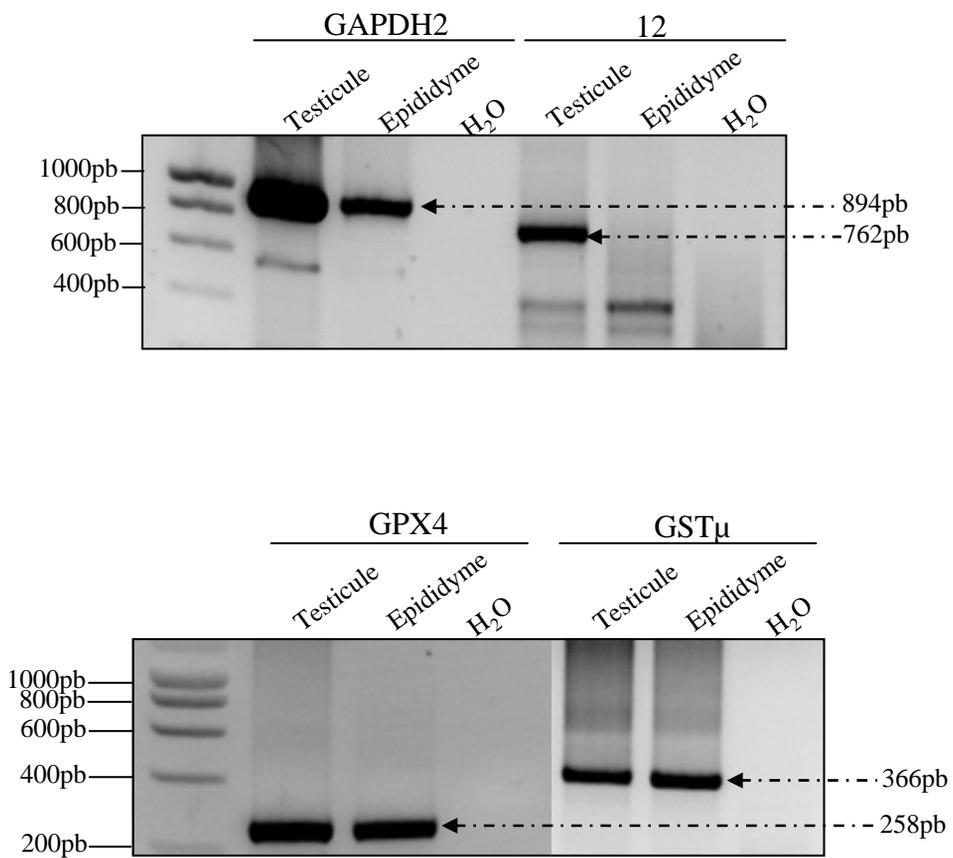


Fig 43: électrophorèse sur gel d'agarose des produits de touchdown PCR, dans l'approche sans *a priori*

Tableau 6 : séquences des peptides susceptibles d'être utilisés pour une immunocontraception

Cible	Peptide(s)
GPX4	NH ₂ -FPCNQFGKQEPGSN-COOH
GAPDH ₂	NH ₂ -SVEHKNGLRVV-COOH
	NH ₂ -KEYNPGSMTI-COOH
Spot 12	NH ₂ -SVLSPMSKPKFIED-COOH
	NH ₂ - YPPCPPGRK-COOH
	NH ₂ -AYQKELERRSQTL-COOH

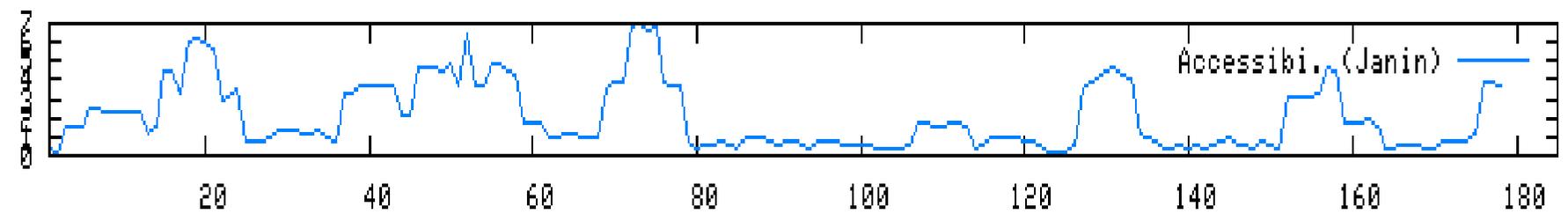
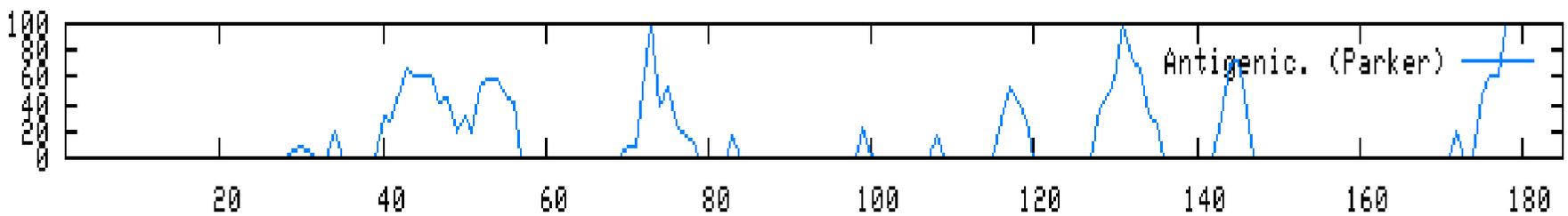
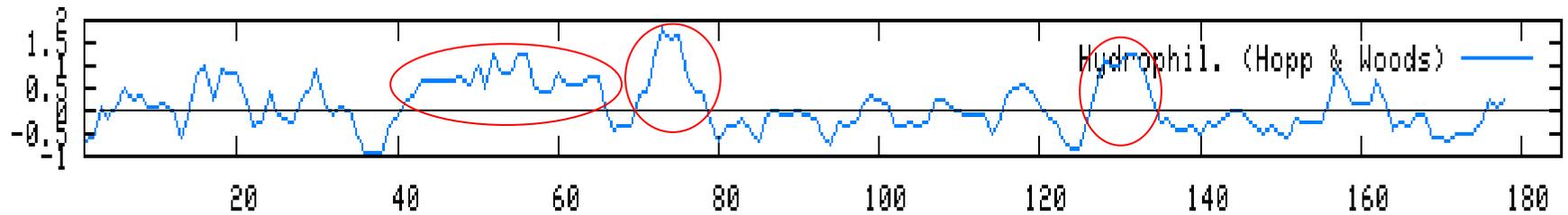
GAPDH2

```

rat      EAPPPPPPPPPPPPPPPPPPKPAKELTVGINGFGRIGRLVLRVCMKEGVRVAVNDPFIDPEYMVYMFKYDSTHGRYKGTVEHKNGRLVVDNLEINVFOCKEPKEIPWSSVGNP
souris  EAPPPPPPPPPPPPPPPPLQKPARELTVGINGFGRIGRLVLRVCMKEGIRVAVNDPFIDPEYMVYMFKYDSTHGRYKGNVEHKNGQLVVDNLEINTYQCKDPKEIPWSSIGNP
campagnol -----LTVGINGFGRIGRLVLRVCMKEGKIKVAVNDPFIDPEYMVYMFKYDSTHGRYKGSVEHKNGRLVVDLEIHVYQCKDPKIPWSSVSGSP
homme   EIKPPPPPLPPHPATPPPKMVSVARELTVGINGFGRIGRLVLRACMEKGKVVAVNDPFIDPEYMVYMFKYDSTHGRYKGSVEFRNGQLVVDNHEISVYQCKEPKQIPWRAVSGSP
chien   PEPKPEPVKEEPPPLPQPKKAPVGQKLTVGINGFGRIGRLVLRACIQKGVKVVAVNDPFIDPEYMVYMFKYDSTHGRYKGSVEHRNGLVVDNQEISVFOCKQPRDIPWKSVDGNP
          ***** *  ** *****
  
```

```

rat      YVVEATGVYLSIEAASGHISSGARRVIVTAPSPDAPMLVMGVNEKDYNPGSMTVVSNASCTTNCLAPLAKVIHERFGIVEGLMTTVHAYTATQKTVDGSPSKKDWGRGGAHQNI I
souris  YVVECTGVYLSIEAASAHISSGARRVVVTAPSPDAPMFVMGVNEKDYNPGSMTIIVSNASCTTNCLAPLAKVIHENFGIVEGLMTTVHSHYTATQKTVDGSPSKKDWGRGGAHQNI I
campagnol YVESTGVYLSMEASAHAITAGAQRVVVTAPSPDAPMLVMGVNEKREYNPGSMTIIVSNASCTTNCLAPLAKVIHERFGIVEGLMTTVHSHYTATQKT-----
homme   YVESTGVYLSIQAASDHI SAGAQRVVISAPSPDAPMFVMGVNEENDYNPGSMNIIVSNASCTTNCLAPLAKVIHERFGIVEGLMTTVHSHYTATQKTVDGSPSRKAWRDGRGGAHQNI I
chien   FVESTGVYLSLEEASGHIEAGALRVVISAPSPDAPMFVMGVNEKSYDPASMKVVSNASCTTNCLAPLAKVIHERFGIVEGLMTTVHSHYTATQKTVDGSPSKKAWRDGRGGAHQNI I
          *** ***** ** ** ** ** ***** ***** * * * *****
  
```



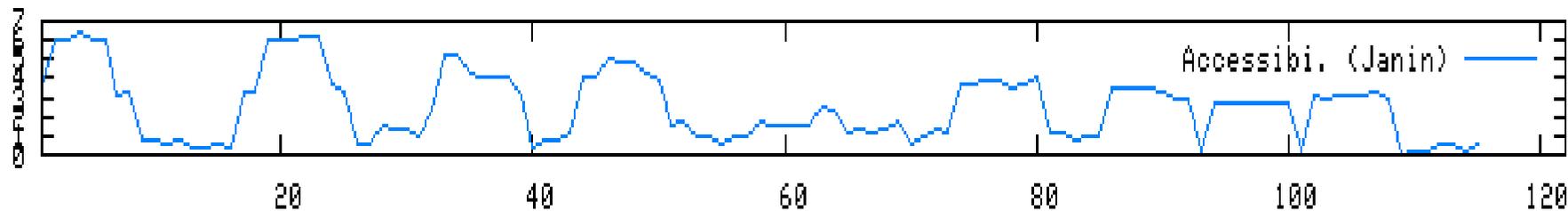
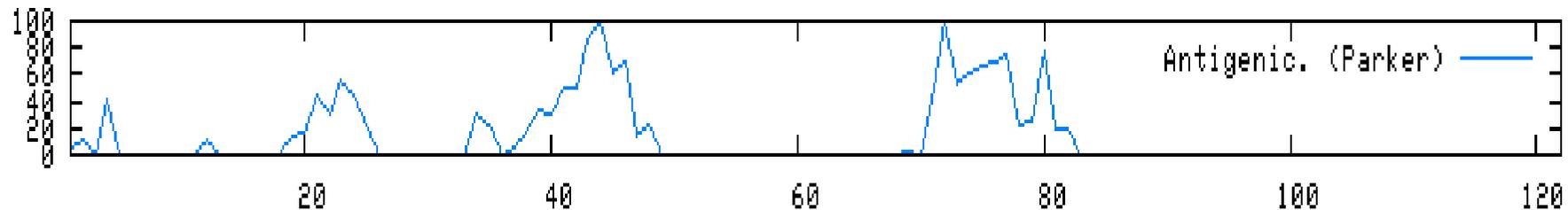
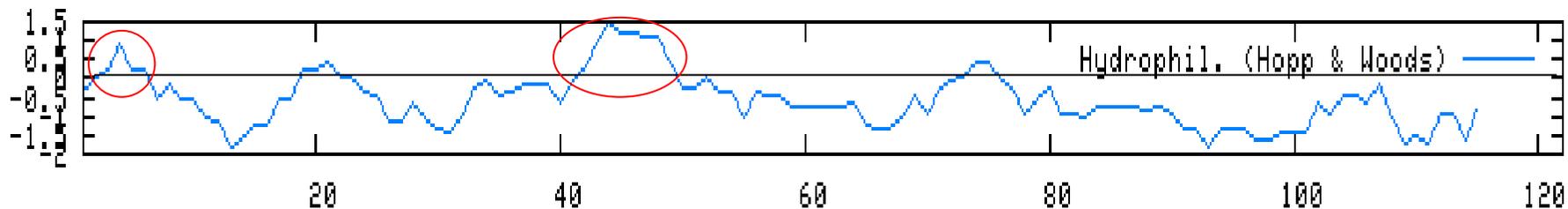
GST μ

```

souris  YEEKRYICGEAPDYDRSQWLDVVKFKLDLDFPNLPYLMGKNKITQSNAILRYIARKHNMCGDTEEEEKIRVDIMENQIMDFRMQLVRLCYNSNHENLKPQYLEQLPAQLKQFSLFL
rat     YEEKQYTCGEAPDYDRSQWLDVVKFKLDLDFPNLPYLMGKNKITQSNAILRYIARKHNMCGDTEEEEKIRVDIMENQIMDFRMQLVRLCYNSNHESLKPQYLEQLPAQLKQFSLFL
campagnol -----SQWLDDKFKLDLDFPNLPYLVDGKNKITQSNAILRYIARKHNMCGDTEEEKIRVDIMENQIMDFRMQLVRLCYNSDHENLKPQYLEQLPAQLKQFSLFL
homme   YEEKRYTCGEAPDYDRSQWLDVVKFKLDLDFPNLPYLLDGGKNKITQSNAILRYIARKHNMCGETEEEEKIRVDI IENQVMDFR TQLIRLCYSSDHEKLPQYLEELPGQLKQFSMFL
          *****
  
```

```

souris  GKFTWFAGEKLTfVDFLTyDVLdQNRIFEPKCLD
rat     GKFTWFAGEKLTfVDFLTyDVLdQNRMFEPKCLD
campagnol GKFSWFAGEKLTfVDFLTyDVL-----
homme   GKFSWFAGEKLTfVDFLTyDILdQNRIFDPKCLD
          ***
  
```

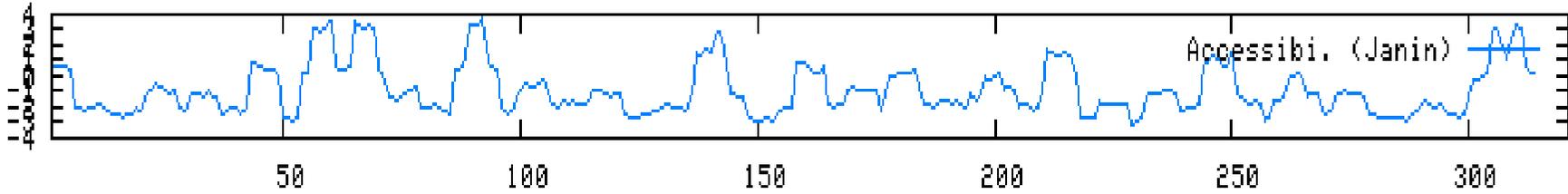
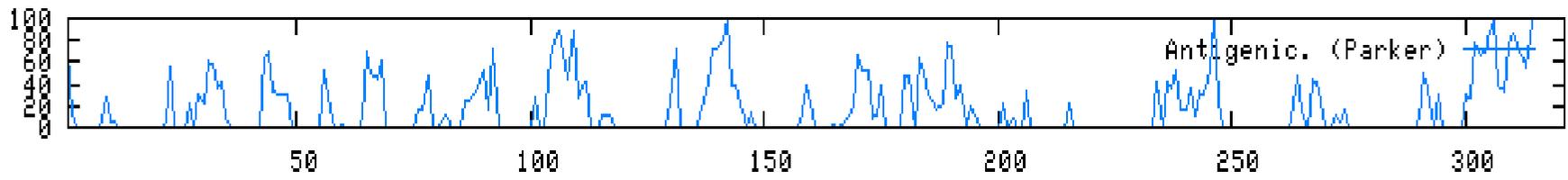
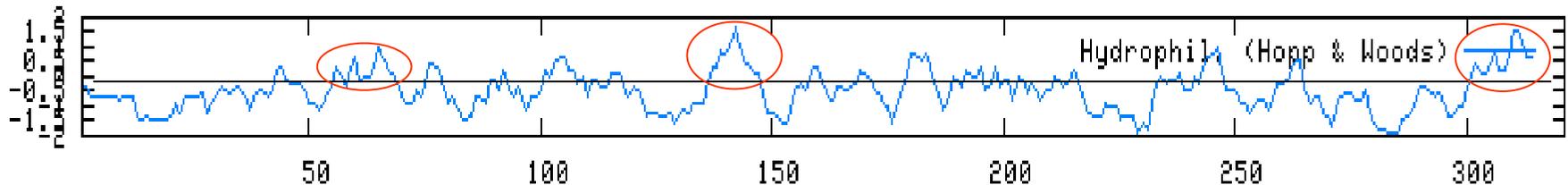


Spot 12

rat	MTATQKHNLF	TPEPHYIPGYAGFY	QRLRYQVGNTYGR	TTAQLLTDP	SVQKSP	SVLSPMSKPKFIED	FSKSKPPWMP	CDLTEPYIPHYT	NLKPYNFEILGK	LPRQEVDT	-GGMPQVE
campagnol	MTATQKHNLF	TPEPHYIPGYAGFY	QRLRYQVGNTYGR	TTAQLLTDP	SVQKSP	SVLSPMSKPKFIED	FSKSKPPWIP	CDLTEPYIPHYT	SLKPYKNFEILG	QLPRQEVDT	-QGPPQVE
souris	MTATQKHNLF	TPEPHYIPGYAGFY	QRLRYQVGNTYGR	TTAQLLTDP	SVQKSP	SVLSPMTKPKFIED	FSKSKPPWIP	CDLREPYIPHYT	SLKPYKNFEILG	QLPRQDVT	-QGPPQVE
chien	MTATQKHGLF	TPEPHYIPGYAGFY	QRLRYQVGNTYGR	TTAQLLTDP	GVQKSS	SVLSPISEPKFIED	FSKPKPPSIP	CLDLTEPYIPHYT	GMPYKFFEILGR	FPPQEVDAQK	GPPGVE
homme	MTTTTQKHDL	FTEPHYVPGYAGFF	QRLRYQVGNTYGR	TGQLLTD	PSVQKSP	SVLSPMSKPKFIED	FSQSKPPRVP	CQDLTEPYIPHYT	SLKPSKNFEILG	QLPPEVDA-Q	EPGVE
	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *

rat	NISRHVPL	PAGFMPYPP	YPPCPPGRK	GEARDLGH	PGLLLAYGEE	AWKNAAPLQET	TPGRYHQ	LYHCR	RD EYLPP	HPPPQETL	LDVGRYQ	RLPQLDHP	NLIQR	KAISGY	AGFVPR	FAWVMGMN		
campagnol	NISRQVPL	PAGFMPYPP	YPPCPPGRK	GEARDLGH	PGLLLAYGEE	AWKNAAPLQET	TPGRYHQ	LYHCR	RD EYLPP	HPPPQETL	LDVGRFQ	RLPQLDHP	NLIQR	KAISGY	AGFVPR	FAWVMGMN		
Souris	--NRQGL	TAGFMPYPP	YPACPPGRK	GEARDLGH	PGLLLAYGEE	AWKDAAPLQD	TPGKNNQ	LYHCR	RD EYLPP	HPPPQETL	LDVGRFQ	RLPQLDHP	NLIQR	KAISGY	AGFVPR	FAWVMGMN		
chien	NISRQVLL	PAGFMPYPP	YPPCPPGRK	GDSRNF	GHPGLR	STST-----	PVHEAP	GQ-DQ	LYHCR	KEYHPP	PAHQOETL	LDVGRF	HRLPQLD	HPNLIQR	KAISGY	AGFVPR	FAWVMGMN	
homme	NIPRQILL	PAGFTPD	THPPCPPGRK	GDSRDL	GHP---	VYGEE	AWKSATP	VCEAPR	HQ	LYHC	QREYPPP	PARRQOETL	LDVGSF	QRLPQLD	HPNLIQR	KAISGY	AGFI	PRFTWVMGLN
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *

rat	YRDGVIQ	AMDDFDKNQ	FVFKHP	VCTLGERL	PKTHWP	TTTTIYRSQ	GLIPFYM	GFIPSMQ	DNYAMTF	GNSTR	RAYQ	KE	LERR	SQTL
campagnol	YRDGVTQ	AMDDFDKNQ	FVFRHP	VCALGERL	PRTHWP	TTTTIYRSQ	GLIPFYM	GFIPSMQ	DNYAMTF	GNSTR	RAYQ	KE	LERR	SQTL
Souris	YRDGVTQ	AMDDFDKNQ	FVFRHP	VCALGERL	PRTHWP	NTTIYRSQ	GLIPFYM	GFIPSMQ	DNYALT	FGNSTR	RAYQ	KE	DRR	SHTL
chien	YREGVTQ	AMDEFDKNQ	FLFRNP	ICALGERL	PRTHWP	SNTTIYSSQ	GLIPFYM	GFIPSMQ	DNYAMTF	GNSTR	RAYQ	KE	MER	QHQL
homme	YRDGVMQ	AMDEFDKS	QFLFRN	PHCDL	GEKLP	GTHWPS	NHIYSSQ	GLIPFYM	GFIPAMQ	DNYALT	FGNSTR	RAYW	KE	WAKRNHTL
	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *	** ** ** *



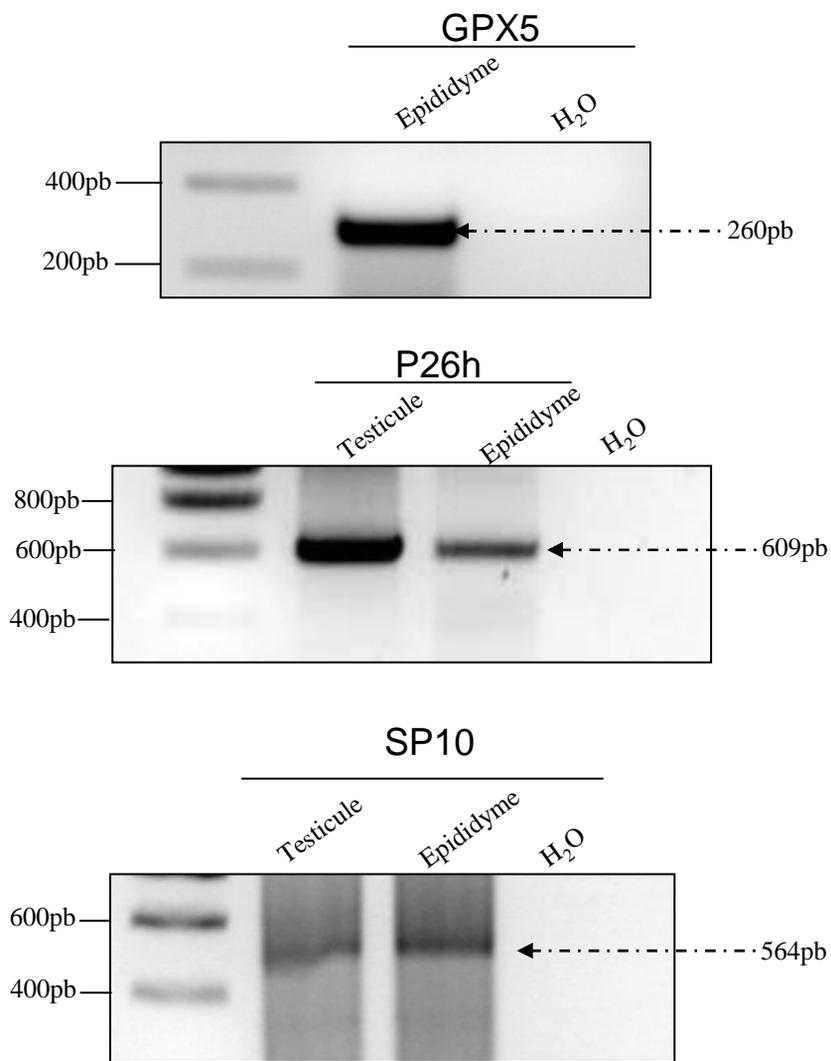


Fig 45: électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification des cibles « *a priori* »

Tableau 7 : séquences des peptides susceptibles d'être utilisés pour une immunocontraception

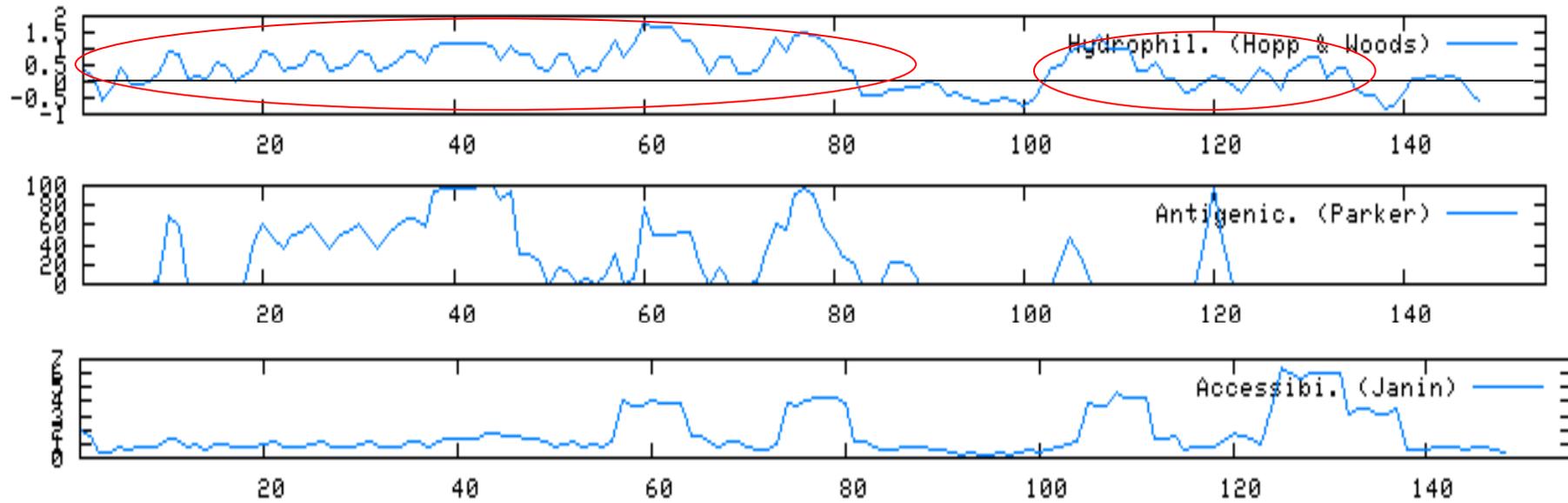
Cible	Peptide(s)
GPX5	NH ₂ -NFQLFAKGDVN-COOH
SP-10	NH ₂ - MEGHILSEHNTGEHITGEHTSGEHTSGEHTSGEHTSSEGSEQSSEQTSEVSSAEQVS GEKAAE AGEQAAAEATSGEKNCHTCSYMNDGKCLRG-COOH
	NH ₂ -EGVCTTQNSQQCM LKKIFEGGKLQFM-COOH
P26h	NH ₂ -PFLEVTKEVFDRSFKN-COOH
	NH ₂ -VSXNPDFXKXLKERHPLRKFAEVEDVNSI-COOH

SP-10

renard AGENTLSEHTSGEHTSVEHFSAEHSSTEHTSGEHTSGEHTSGERATGEHTSSEH---ATSEHTSGEQPSGEQPSGE-----KSSGEQPSGEKSSGEQPS
 homme -----
 chien AGENTLSEHTSGEHTSVEHFSAEHSSTEHTSGEHTSGEHTSGERATGEHTSSEH---ATSEHTSGEQPSGEQPSGE-----KSSGEQPSGEKSSGEQPS
 lapin -----GENALIEHGSSEHGTSSEHTSGDQPSGDQPSGEKSAAEKPSGEH---TSTEQPSGEHGSGEQAVTSGEHTSGEPSAVPGEHGSGEQSAASGERGSGEQAVTSGEH
 souris LDEKTLSGHSSSEQESSEHAVAHAESAGEHSSGEQSSEHMSGDHMSGEHLSEHTS---EEHSSGEHTSTEHTSGE-----
 rat SSEKTLSGHSSSEHESESSEHTVTEHSAGEHSSGEQSSEHISSEHMSGEHLSEHTSGEHASTEHTSGEHTSSEHTSSE-----
 campagnol -ENR**FMEGHILSEHNTGEHITGEHTSGEHTSG**-----**EHTSGEHTSSEGEQSQS**-----

renard GEQSSGEKPSAEQTSGEQAVAEKPSGEQAVAEKPSGEQAVAE**RP**SGEQASNEKAYSEQASAEQASAEQASSEQASGEKPLGEGQPSGIPPSSTFSGPILM**CH**TCSYMNDQ**GK**CLRG
 homme -----GEQASGEQPSGEHASGEQASGAPISSTSTGTILM**CY**TCAYMNDQ**GK**CLRG
 chien GEQSSGEKPSAEQTSGEQAVAEKPSGEQAVAEKPSGEQAVAE**RP**SGEQASNEKAYSEQASAEQASAEQASSEQASGEKPLGEGQPSGIPPSSTFSGPILM**CH**TCSYMNDQ**GK**CLRG
 lapin ASDEQAAASGEHGSGEQAA**TSA**EHGSGEQAVTSGEHGSGEQAA**TSG**EHGSGEQAVVTLGEHGSGEQAAASGEQASAEKPTMEQPSAPSASTSSG-AVN**CH**TCAF**MND**Q**GK**CLRG
 souris -----QPATEQSSSDQPSSEASSGEVSGDEAGEQV**SSE**TN--DKEN**DAM**STPLPSTSA**AI**TLM**CH**TCA**YMND**DA**K**CLRG
 rat -----QLTTEQSSSDQSSDVSSGEQVSGEKL**EE**AGEQVSGEDK**NE**VISTPLPSTSSGGI**IN**CH**TCA**YM**NED**AK**CL**RG
 Campagnol -----**SE**QTSEVSSAEQVSGEK**AEE**EAG-----**EQ**AAA**EAT**SGEK**N**EQGMSTFPSTSSG**VA**IN**CH**TCS**YMND**D**GK**CLRG
 * * * * *

renard EGV**CST**QNSQ**QC**ML**KK**IFEGG**KL**QFMV**Q**GCEN**MC**PS**MN**LF**SH**G**TR**MQ**II**CCRN**Q**S**FC**NK**I**
 homme E**GT**C**IT**QNSQ**QC**ML**KK**IFEGG**KL**QFMV**Q**GCEN**MC**PS**MN**LF**SH**G**TR**MQ**II**CCRN**Q**S**FC**NK**I**
 chien EGV**CST**QNSQ**QC**ML**KK**IFEGG**KL**QFMV**Q**GCEN**MC**PS**MN**LF**SH**G**TR**MQ**II**CCRN**Q**S**FC**NK**I**
 lapin EGV**CT**I**EN**SQ**QC**ML**KK**IFEGG**KL**QFMV**Q**GCEN**LC**PS**MN**LF**SH**G**TR**MQ**IV**CCRN**Q**S**FC**NK**V**
 souris EGV**CT**T**Q**NSQ**QC**ML**KK**IFEGG**KL**QFMV**Q**GCEN**MC**PS**MN**LF**SH**G**TR**MQ**IM**CCRN**E**PL**C**NK**V**
 rat E**GI**C**TT**QNSQ**QC**ML**KK**I**Y**EGG**KL**QFMV**Q**GCEN**MC**PS**MN**LF**SH**G**TR**MQ**IM**CCRN**E**AL**C**N**K**A
 campagnol **EGV****CT**T**Q**NSQ**QC**ML**KK**I**F**EGG**KL**QFMV**Q**GCEN**MC**PS**MN**L-----
 ** * ***** ***** ***** *****



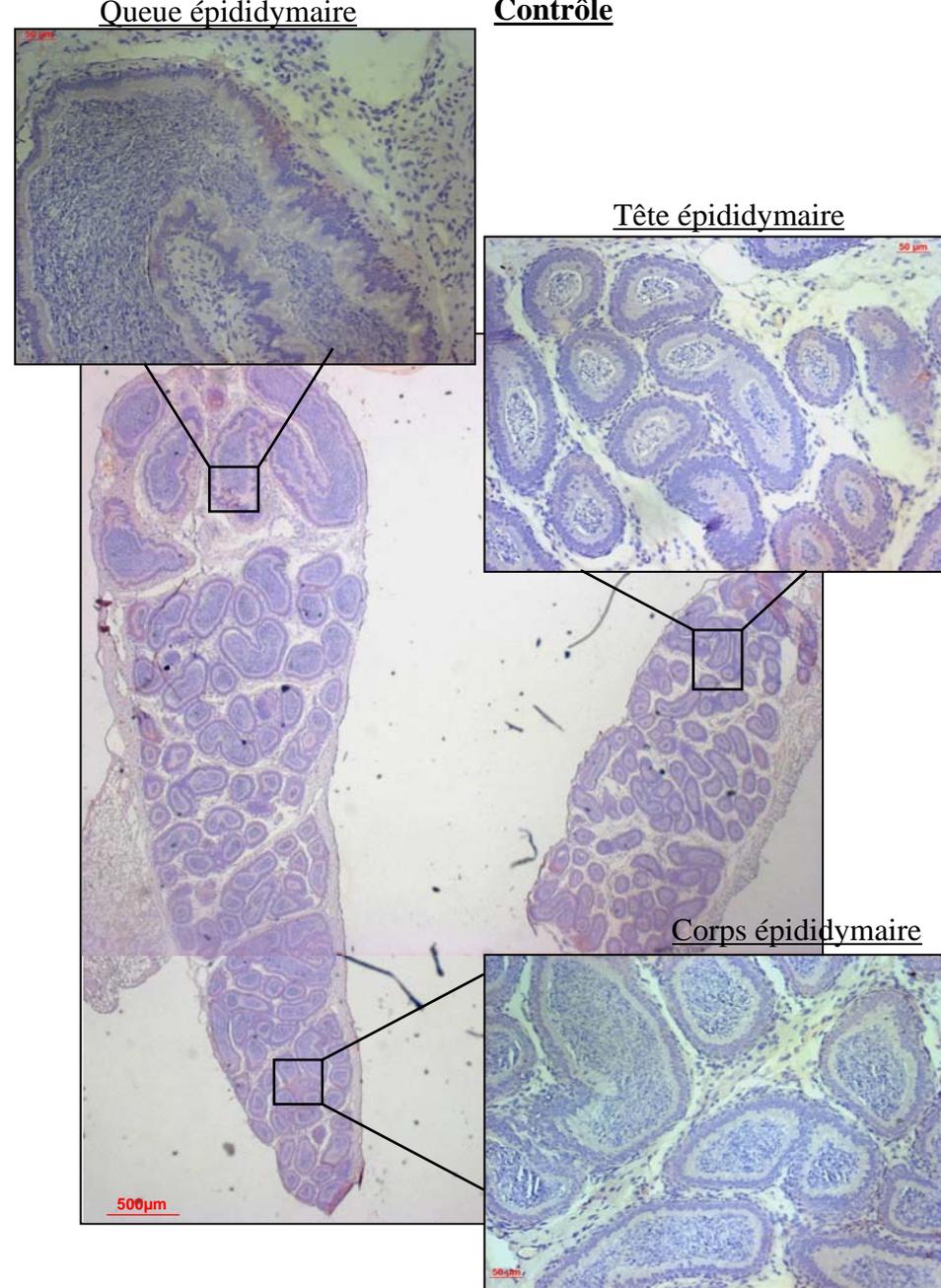
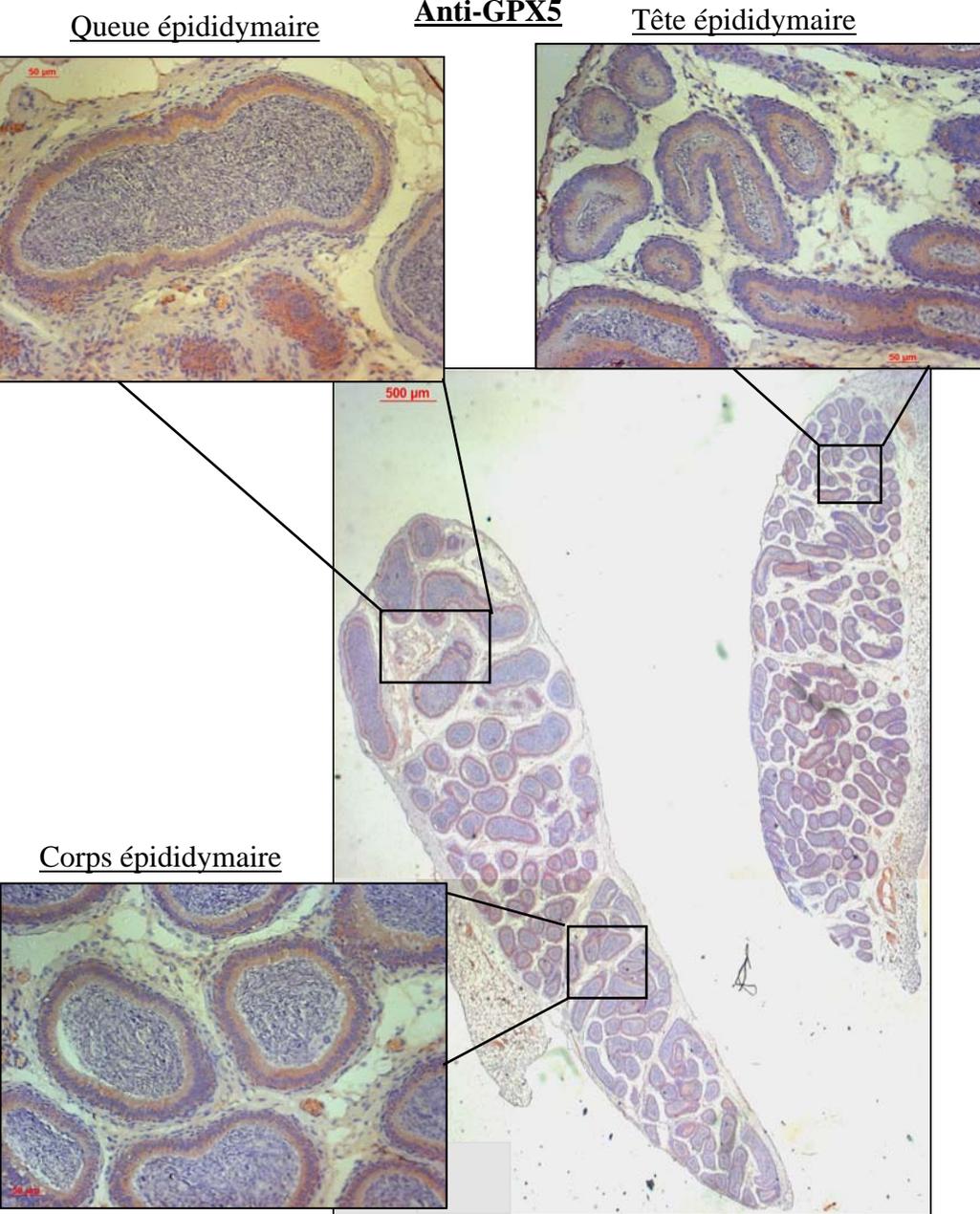


Fig 47: détection immunohistologique de GPX5 dans l'épididyme de campagnol

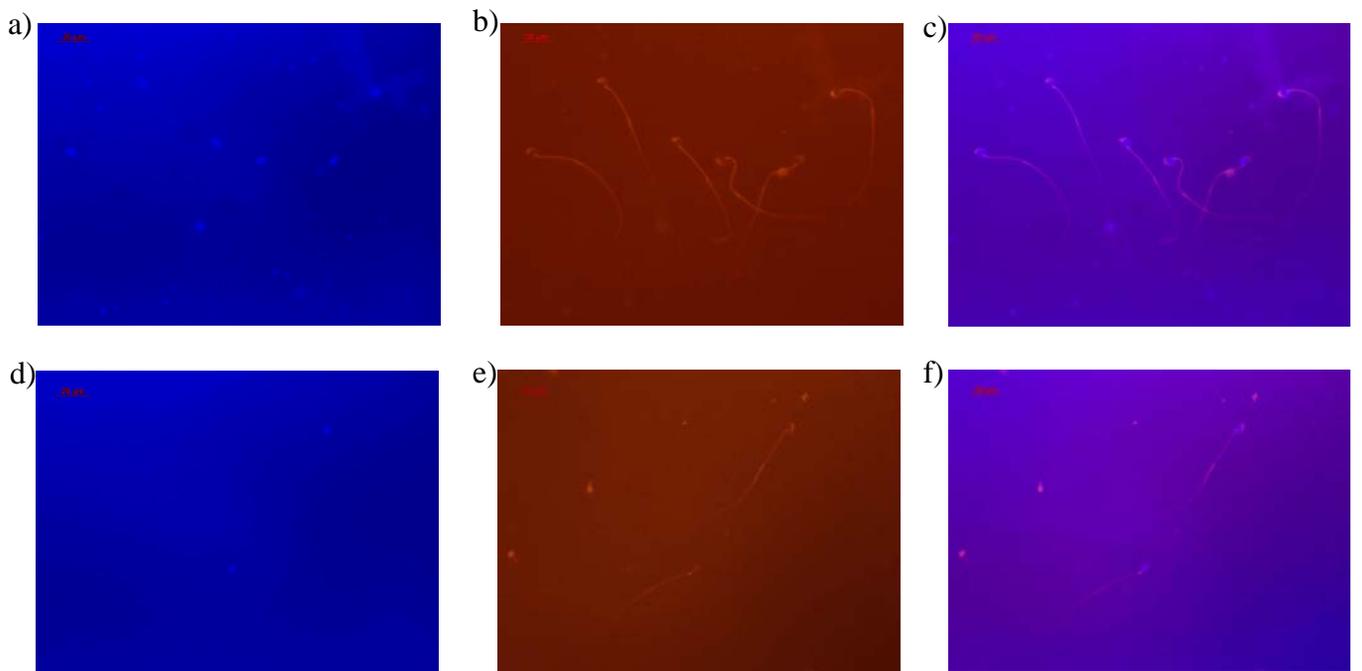


Fig 48: immunolocalisation de la protéine GPX5 sur des spermatozoïdes de campagnol, par des anticorps interspécifiques (a, b, c), ou par un sérum préimmun (d, e, f)

a, d: détection des noyaux au DAPI

b, e: marquage des antigènes au TRITC

c, f: superposition des deux signaux

Schéma des dépôts effectués sur chaque membrane:

Peptide 3µg	Peptide 5µg	BSA 3µg	BSA 5µg	Peptide couplé 3µg	Peptide couplé 5µg	BSA 3µg	BSA 5µg
----------------	----------------	------------	------------	-----------------------	-----------------------	------------	------------

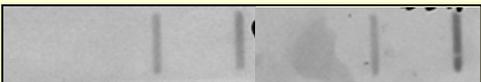
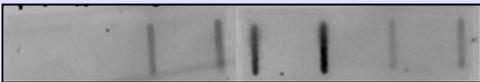
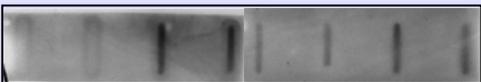
Voie d'immunisation	Antigène	Peptide couplé	BSA	Sécrétions étudiées
	nasale			
				utérines
gastrique				vaginales
				utérines

Fig 49: slot blot montrant la production d'IgA spécifiques dans le tractus génital femelle (vagin ou cornes utérines) après immunisation par voie nasale ou gastrique (n=3)

	Antigène	Peptide couplé	BSA	
	Voie d'immunisation	nasale		
				Queues épидидymaires
				Vésicules séminales
				Prostate
gastrique				Têtes épидидymaires
				Queues épидидymaires
				Vésicules séminales
				Prostate
				Sécrétions étudiées

Fig 50: slot blot montrant la production d'IgA spécifiques dans le tractus génital mâle (têtes, queues épидидymaires, vésicules séminales, prostate) après immunisation par voie nasale ou gastrique (n=3)

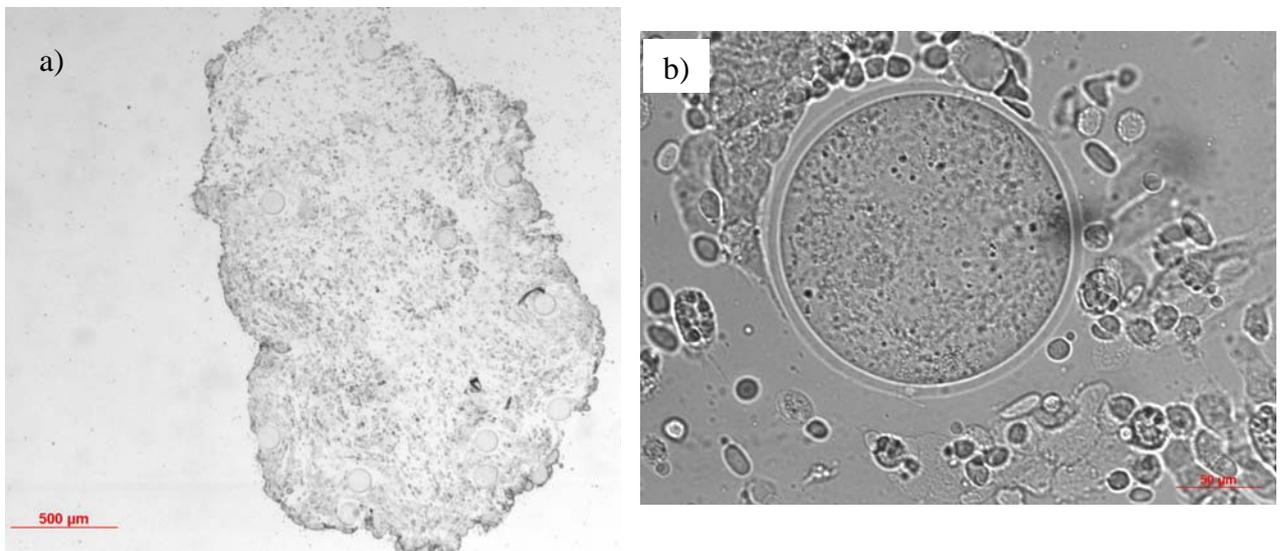


Fig 51: photos en microscopie optique d'un cumulus oophorus (a) et d'un ovocyte (b) d'*Arvicola terrestris* Scherman