



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>





Monsieur Franck BOUE a su diriger ce travail avec clairvoyance, et me faire partager ses connaissances avec rigueur et pédagogie. Qu'il trouve ici l'expression de mon toute amitié et de ma gratitude.

Je tiens à remercier sincèrement Madame le Docteur Catherine FINAZ et Monsieur le Professeur Joël DREVET pour avoir accepté de juger ce mémoire et d'en être les rapporteurs.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ pour m'avoir accueilli dans sa formation doctorale et pour avoir bien voulu juger ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Bernard FOLIGUET qui a accepté avec enthousiasme de participer à ce travail, et qui nous a aidé à réaliser les études de microscopie électronique et d'analyse de trajectoires. Sa présence dans ce jury de thèse me fait particulièrement plaisir.

Monsieur le Docteur Bernard GOBERT a souvent pris le temps de discuter de ce travail, et je le remercie chaleureusement d'avoir accepté de le juger.

Ce travail a été réalisé à l'AFSSA Nancy, au Laboratoire d'Études et de Recherches sur la Rage et la Pathologie des Animaux Sauvages. Je tiens à remercier Madame le Docteur Florence CLIQUET, Directrice du laboratoire, de m'avoir soutenu dans ce travail mais aussi de m'avoir donné le goût de la recherche. Je remercie également Monsieur le Docteur Michel AUBERT et Monsieur le Professeur Christian JANOT, qui l'ont précédée à la direction de ce laboratoire, ainsi que la DGAI qui a financé et soutenu ce projet. Mes remerciements s'adressent également à chacun des membres du laboratoire pour son aide et sa gentillesse, en particulier à Michel, Marie-José, Éric, Marc, Jacques, Jacqueline, Jean-Marc, Myriam, Stéphane, Marc, Gilles, Nathalie, Sandrine, Yves, Virginie, Chantal, Josiane...

Je tiens à souligner tout particulièrement la gentillesse et la compétence avec lesquelles Nelly ROUET et Guillaume FARRE m'ont aidé dans la réalisation de ce travail ainsi que dans celle de ce manuscrit. Le plaisir que j'ai eu à faire ce travail leur est dû en grande partie.

Une des richesses de ce travail résidait dans la qualité des rencontres qu'il m'a permis de réaliser. Je tiens à remercier Messieurs Franck SAULNIER et Gérard HUMBERT, du Service Commun de Séquençage des Protéines de l'Université de Nancy ; Madame le Docteur Nathalie MONHOVEN, du Service Commun de Biologie Moléculaire du CHU de Nancy ; Monsieur le Professeur Botond PENKE qui a réalisé les études de spectrométrie de masse au laboratoire de chimie des peptides de l'Université de Szeged (Hongrie) ; Madame Jacqueline CHANEL, du Laboratoire de Microscopie Électronique de la Faculté de Médecine ; ainsi que le personnel du CECOS de Nancy et toutes les personnes m'ayant aidé à récolter des spermatozoïdes de renards et d'autres espèces, en particulier le personnel de l'EIDLRCR et le Monsieur le Docteur vétérinaire Alain KIENZ.

Enfin, je remercie mes parents qui m'ont donné le goût de la vérité et m'ont toujours soutenu sans hésitation dans le choix et la réalisation de mes projets. Je remercie mes frères pour leur exemple, et Zsuzsa, qui non seulement m'a aidé dans ce travail, en particulier pour les tests statistiques et pour la rédaction des articles, mais qui m'a apporté joie et la sérénité en dehors du travail.

Qu'il me soit permis de dédier ce travail à ces personnes sans qui il n'aurait sans doute pas été réalisé.

# Sommaire

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>20</b>
<b>2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 : RAPPELS SUR LE SPERMATOZOÏDE .....</b>	<b>25</b>
2.1.1 DONNEES ANATOMIQUES .....	25
2.1.1.1 : Organes reproducteurs mâles.....	25
2.1.1.2 : Le testicule.....	25
2.1.1.2.1 : Tubes séminifères .....	26
2.1.1.2.2 : Espaces interstitiels testiculaires.....	26
2.1.1.3 : La barrière hémato-testiculaire .....	27
2.1.1.3.1 : Structure.....	27
2.1.1.3.2 : Barrière hémato-épididymaire et hémato-vas déférent.....	28
2.1.1.3.3 : Barrière immunologique .....	28
2.1.2 LA SPERMATOGENESE.....	29
2.1.2.1 : Différenciation du spermatozoïde.....	29
2.1.2.2 : Mécanismes de contrôle de la spermiogenèse .....	31
2.1.3 LE SPERMATOZOÏDE .....	32
2.1.3.1 : Aspect morphologique.....	32
2.1.3.2 : Maturation du spermatozoïde .....	34

2.1.3.3 : Biologie du spermatozoïde .....	35
2.1.3.3.1 : Mobilité.....	35
2.1.3.3.2 : Production.....	36
2.1.3.3.3 : Formes anormales .....	36
2.1.4 LA FECONDATION.....	37
2.1.4.1 : Capacitation .....	37
2.1.4.2 : Traversée du Cumulus oophorus .....	37
2.1.4.3 : Liaison à la Zone Pellucide.....	38
2.1.4.4 : Réaction acrosomique.....	39
2.1.4.5 : Liaison à la membrane ovocytaire et fusion .....	40
<b>2.2 : L'IMMUNOCONTRACEPTION .....</b>	<b>40</b>
2.2.1 QU'EST-CE QUE L'IMMUNOCONTRACEPTION ? .....	40
2.2.1.1/ Définition .....	40
2.2.1.2/ Rappels sur le système immunitaire .....	41
2.1.2.1 : Le Soi immunitaire .....	41
2.1.2.2 : Les immunoglobulines.....	42
2.1.2.3 : L'immunité locale.....	43
2.2.1.3/ Les différentes cibles des vaccins contraceptifs .....	44
2.1.3.1 : Mélatonine .....	44
2.1.3.2 : GnRH.....	45
2.1.3.3 : Gonadotropines.....	45
2.1.3.4 : Zone pellucide.....	46
2.1.3.5 : Antigènes ovocytaires.....	47
2.1.3.6 : Antigènes du plasma séminal.....	48
2.1.3.7 : Gonadotropine chorionique .....	48
2.1.3.8 : Protéine transporteur de la riboflavine.....	48
2.1.3.9 : Antigènes spermatiques .....	49
2.2.1.4/ Pourquoi choisir un vaccin dirigé contre les spermatozoïdes ? .....	49
2.2.2 IMMUNOCONTRACEPTION DIRIGEE CONTRE LES SPERMATOZOÏDES .....	49
2.2.2.1 Les anticorps anti-spermatozoïdes.....	49
2.2.2.2 Mécanismes d'action .....	51
2.2.2.3 Propriétés nécessaires des antigènes spermatiques.....	52
2.2.2.4 Stratégies utilisées.....	52
2.2.2.5 Principaux antigènes étudiés.....	54
2.2.2.6 Antigènes étudiés chez le renard.....	58
<b>2.3 OBJECTIFS DE CE TRAVAIL .....</b>	<b>59</b>
<b><u>3. MATERIELS ET METHODES .....</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b>3.1 : CONVENTIONS D'ECRITURE.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 : SELECTION DES ANTIGENES .....</b>	<b>61</b>
3.2.1 PRINCIPE.....	61
3.2.2 PRODUCTION DE SERUMS POLYCLONAUX ANTI-SPERMATOZOÏDES.....	61
3.2.2.1 Animaux.....	61

3.2.2.2	Extraction de protéines spermatiques .....	62
3.2.2.2.1	: Récolte des spermatozoïdes épидидymaires de renards .....	62
3.2.2.2.2	: Extraction des protéines .....	62
3.2.2.2.3	: Dosage des protéines .....	63
3.2.2.3	Immunisation de lapins .....	63
3.2.2.4	Immunisation de renards .....	63
3.2.2.5	Vasectomie de renards .....	63
3.2.3	SELECTION DES SERUMS DE RENARDS RECONNAISSANT DES ANTIGENES SITUES EN SURFACE DES SPERMATOZOÏDES .....	64
3.2.3.1	Récolte de spermatozoïdes éjaculés de renards .....	64
3.2.3.2	Fixation des spermatozoïdes pour l'immunofluorescence .....	64
3.2.3.3	Immunolocalisation des protéines en FITC .....	64
3.2.4	IDENTIFICATION DES ANTIGENES PAR WESTERN BLOT .....	64
3.2.4.1	Préparation des antigènes .....	64
3.2.4.2	Séparation des protéines par SDS-PAGE .....	64
3.2.4.2.1	Préparation des gels .....	64
3.2.4.2.2	Electrophorèse .....	65
3.2.4.2.3	Séparation sur gels Tris-Tricine .....	65
3.2.4.3	Méthode de séparation des protéines en double dimension .....	65
3.2.4.3.1	Gel de première dimension : IsoElectroFocusing .....	65
3.2.4.3.2	Gel de deuxième dimension .....	66
3.2.4.4	Coloration des gels .....	66
3.2.4.4.1	Au bleu de Coomassie .....	66
3.2.4.4.2	Au nitrate d'argent .....	66
3.2.4.4.3	Séchage des gels .....	67
3.2.4.5	Western blot .....	67
3.2.4.5.1	Transfert .....	67
3.2.4.5.2	Western blotting .....	67
3.2.4.5.3	Révélation .....	68
3.2.4.5.3.1	Au DAB .....	68
3.2.4.5.3.2	En chimiluminescence .....	68
<b>3.3</b>	<b>: DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES ADNC CODANT LES ANTIGENES SELECTIONNES ....</b>	<b>68</b>
3.3.1	PRINCIPE .....	68
3.3.2	SEQUENÇAGE NH <sub>2</sub> -TERMINAL .....	69
3.3.2.1	Préparation des protéines .....	69
3.3.2.2	Séquençage .....	69
3.3.2.3	Analyse des séquences .....	69
3.3.3	AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT D'ADNC .....	70
3.3.3.1	Prélèvement de testicule et d'épididyme .....	70
3.3.3.2	Extraction et purification des ARNm .....	70
3.3.3.2.1	: Extraction des ARN totaux .....	70
3.3.3.2.2	: Vérification de la qualité des ARN .....	70
3.3.3.2.3	: Purification des ARNm .....	71
3.3.3.3	Synthèse d'un brin d'ADNc .....	71

3.3.3.3.1 : Reverse Transcription .....	71
3.3.3.3.2 : RACE PCR .....	71
3.3.3.4 PCR .....	71
3.3.3.4.1 : Choix des amorces .....	71
3.3.3.4.2 : Réaction de Polymérisation en Chaîne .....	72
3.3.3.4.3 : Migration des échantillons .....	72
3.3.3.5 Purification de l'ADN amplifié.....	72
3.3.3.6 Clonage .....	73
3.3.3.7 Séquençage .....	74
3.3.3.7.1 : Purification des plasmides .....	74
3.3.3.7.2 : Réaction de séquençage .....	74
3.3.3.7.3 : Lecture des séquences.....	76
3.3.3.7.4 : Analyse des séquences.....	76
3.3.4 REALISATION ET CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADNc DE TESTICULE DE RENARD .....	76
3.3.4.1 Prélèvement des tissus et extraction des ARN.....	76
3.3.4.2 Réalisation de la banque d'ADNc.....	77
3.3.4.2.1 : Principe .....	77
3.3.4.2.2 : Synthèse des premiers brins d'ADNc .....	77
3.3.4.2.3 : Synthèse des seconds brins d'ADNc .....	77
3.3.4.2.4 : Emoussage des extrémités de l'ADNc et précipitation.....	77
3.3.4.2.5 : Ligation des adaptateurs <i>EcoR I</i> .....	77
3.3.4.2.6 Phosphorilation des extrémités de <i>EcoR I</i> .....	78
3.3.4.2.7 : Digestion avec <i>Xho I</i> .....	78
3.3.4.2.8 : Purification de l'ADN.....	78
3.3.4.2.9 : Ligation de l'ADNc au vecteur ZAP Express.....	78
3.3.4.2.10 : Encapsidation.....	78
3.3.4.2.11 : Titrage de la banque.....	78
3.3.4.3 Amplification de la banque d'ADNc .....	79
3.3.4.3.1 : Préparation des bactéries .....	79
3.3.4.3.2 Amplification de la banque .....	79
3.3.4.4 Criblage de la banque par Southern blot.....	79
3.3.4.4.1 : Principe .....	79
3.3.4.4.2 : Transfert.....	80
3.3.4.4.3 : Marquage des sondes .....	80
3.3.4.4.4 : Hybridation .....	80
3.3.4.4.5 : Lavages .....	81
3.3.4.4.6 : Révélation .....	81
3.3.4.4.7 : Sous-criblage et interprétation .....	81
3.3.5 ANALYSE DE LA PROTEINE P13 EN SPECTROMETRIE DE MASSE .....	81
<b>3.4 : CARACTERISATION PARTIELLE DES ANTIGENES SELECTIONNES .....</b>	<b>82</b>
3.4.1 PRINCIPE.....	82
3.4.2 CARACTERISATION BIOCHIMIQUE.....	82
3.4.2.1 Digestion enzymatique des groupements glycosylés.....	82
3.4.2.2 Marquage des sucres par des lectines .....	82

3.4.3 CARACTERISATION BIOLOGIQUE.....	83
3.4.3.1 Production de sérum de souris monospécifiques .....	83
3.4.3.1.1 : Préparation des antigènes.....	83
3.4.3.1.1.1 Electroéluion des protéines.....	83
3.4.3.1.1.2 Lyophilisation .....	83
3.4.3.1.1.3 Purification des protéines en HPLC.....	84
3.4.3.1.2 : Immunisation des souris .....	84
3.4.3.2 Immunolocalisation.....	85
3.4.3.2.1 : En FITC .....	85
3.4.3.2.2 En microscopie électronique.....	85
3.4.3.3 Evaluation de la spécificité d'organe .....	86
3.4.3.4 Evaluation de la spécificité d'espèce .....	86
3.4.3.5 Test de liaison spermatozoïdes – Zone Pellucide chez le renard .....	87
3.4.3.5.1 : Préparation des spermatozoïdes.....	87
3.4.3.5.2 : Préparation des ovocytes .....	87
3.4.3.5.3 : Test de liaison spermatozoïdes-ovocytes.....	88
3.4.3.6 Etude de la mobilité des spermatozoïdes .....	88
<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>89</b>

<b>4.1 : SELECTION DES ANTIGENES .....</b>	<b>90</b>
4.1.1/ PRINCIPE .....	90
4.1.2/ PRODUCTION DE SERUMS POLYCLONAUX ANTI-SPERMATOZOÏDES.....	90
4.1.2.1 Réaction humorale anti-spermatozoïdes après l'immunisation de lapins .....	90
4.1.2.1.1 : Immunolocalisation d'antigènes reconnus en surface du spermatozoïde .....	90
4.1.2.1.2 : Poids Moléculaire des antigènes reconnus .....	91
4.1.2.2 Réaction humorale anti-spermatozoïdes après l'immunisation de renards.....	92
4.1.2.2.1 : Immunolocalisation d'antigènes reconnus en surface du spermatozoïde .....	92
4.1.2.2.2 : Cinétique d'apparition des anticorps .....	93
4.1.2.2.3 : Poids Moléculaire des antigènes reconnus .....	93
4.1.2.3 Réaction humorale anti-spermatozoïde après la vasectomie de renards.....	94
4.1.2.3.1 : Immunolocalisation d'antigènes reconnus en surface du spermatozoïde .....	94
4.1.2.3.2 : Cinétique d'apparition et de maintien des anticorps.....	95
4.1.2.3.3 : Poids Moléculaire des antigènes reconnus .....	97
4.1.3/ LOCALISATION SUR GEL EN 2 DIMENSIONS D'AIRES CONTENANT DES ANTIGENES FREQUEMMENT RECONNUS.....	98
4.1.3.1 Séparation des protéines spermatiques par électrophorèse en 2 dimensions .....	98
4.1.3.2 Antigènes fréquemment reconnus par les sérums de lapins immunisés .....	99
4.1.3.3 Antigènes fréquemment reconnus par les sérums de renards immunisés .....	100
4.1.3.4 Antigènes fréquemment reconnus par les sérums des renards vasectomisés.....	101
4.1.4/ IDENTIFICATION DE SEPT ANTIGENES RECONNUS .....	103
4.1.4.1 Antigène de la zone A.....	103
4.1.4.2 Antigènes de la zone B .....	104
4.1.5/ PM ET PI DES ANTIGENES SELECTIONNES .....	105

<b>4.2 : DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES ADNc CODANT LES ANTIGENES SELECTIONNES ...</b>	<b>105</b>
4.2.1/ MICROSEQUENÇAGE N-TERMINAL DES ANTIGENES SELECTIONNES.....	105
4.2.2/ AMPLIFICATION ET SEQUENÇAGE D'UN FRAGMENT D'ADNc CODANT CES ANTIGENES .....	107
4.2.2.1 Amplification d'un fragment d'ADNc à partir des ARNm .....	107
4.2.2.2 Clonage et séquençage des ADN .....	109
4.2.2.3 Réalisation et criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard.....	110
4.2.3/ SEQUENCES DES PROTEINES SELECTIONNEES .....	110
4.2.3.1 Protéine P3 .....	110
4.2.3.1.1 Séquence obtenue.....	110
4.2.3.1.2 Analyse de la séquence .....	111
4.2.3.1.2.1 Homologues .....	111
4.2.3.2 Protéine P4.....	112
4.2.3.2.1 Séquence obtenue.....	112
4.2.3.2.2 Analyse de la séquence .....	112
4.2.3.2.2.1 Homologues .....	112
4.2.3.3 Protéine P5 .....	113
4.2.3.3.1 Séquence obtenue.....	113
4.2.3.3.2 Analyse de la séquence .....	114
4.2.3.3.2.1 Homologues .....	114
4.2.3.4 Protéine P7 .....	115
4.2.3.4.1 Séquence obtenue.....	115
4.2.3.4.2 Analyse de la séquence .....	115
4.2.3.4.2.1 Homologues .....	115
4.2.3.5 Protéine P8 .....	116
4.2.3.5.1 Séquence obtenue.....	116
4.2.3.5.2 Analyse de la séquence .....	118
4.2.3.5.2.1 Homologues .....	118
4.2.3.6 Protéine P13 .....	119
4.2.3.6.1 Séquence obtenue.....	119
4.2.3.6.2 Analyse de la séquence .....	121
4.2.3.6.2.1 Homologues .....	121
<b>4.3 : CARACTERISATION PARTIELLE DES ANTIGENES SELECTIONNES .....</b>	<b>124</b>
4.3.1/ CARACTERISATION BIOCHIMIQUE.....	124
4.3.1.1 Digestion enzymatique des résidus glucidiques.....	124
4.3.1.2 Identification de certains sucres par marquage avec des lectines .....	124
4.3.2/ CARACTERISATION BIOLOGIQUE .....	125
4.3.2.1 Production de sérums monospécifiques chez la souris .....	125
4.3.2.2 Immunolocalisation des antigènes .....	126
4.3.2.3 Evaluation de la spécificité d'organe .....	127
4.3.2.4 Evaluation de la spécificité d'espèce .....	128
4.3.2.5 Evaluation de l'effet des anticorps sur la liaison spermatozoïdes-zone pellucide .....	130
4.3.2.6 Evaluation de l'effet des anticorps sur la mobilité des spermatozoïdes.....	131
<b><u>5. DISCUSSION .....</u></b>	<b><u>133</u></b>

**6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... 159**

**BIBLIOGRAPHIE..... 162**

**ANNEXES ..... 185**

**1. LISTE DES PUBLICATIONS SUSCITEES PAR CE TRAVAIL ..... 186**  
**2. ANNEXES TECHNIQUES : ..... 188**  
2.1 : CODE DES ACIDES AMINES ..... 188  
2.2 : CODE DES ACIDES NUCLEIQUES ..... 188  
2.3 : GLOSSAIRES DES PRINCIPAUX TERMES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE UTILISES ..... 189

## Résumé

L'objectif de ce travail est d'identifier des antigènes du spermatozoïde du renard (*Vulpes vulpes*), en vue de leur utilisation dans un vaccin contraceptif.

Pour cela, nous avons produit des sérums reconnaissant des protéines de surface du spermatozoïde par immunisation de lapins et de renards et par vasectomie de renards. Ces sérums nous ont permis de sélectionner par Western blot sept protéines particulièrement antigéniques, nommées P3, P4, P5, P8, P11 et P13. Le séquençage NH<sub>2</sub>-terminal de six de ces protéines a été réalisé, puis des fragments de l'ADN codant ces antigènes ont été amplifiés par RACE ou RT-PCR. Deux de ces fragments ont été utilisés comme sonde pour le criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard que nous avons réalisée, permettant le séquençage de l'ADN codant les antigènes P8 et P13. Afin de caractériser ces antigènes, des sérums polyclonaux monospécifiques ont été produits chez la souris, permettant pour la protéine P5 l'étude de la spécificité d'espèce, de la spécificité d'organe, de sa localisation, et l'évaluation de l'effet des anticorps sur la mobilité des spermatozoïdes et sur la liaison à la zone pellucide. D'autre part, la caractérisation biochimique (recherche de glycosylation) a été réalisée pour les sept antigènes.

Les protéines P4 et P8 présentent de fortes homologies avec des protéines mitochondriales, respectivement la NADH-deshydrogénase et la cytochrome-C oxydase. P13 présente une forte homologie avec la protéine spermatique humaine fibrousheatin 2. Les antigènes P3 et P7 sont des glycoprotéines dont la séquence déterminée par RACE PCR ne présente pas d'homologie importante avec des protéines connues, mais suggère qu'elles pourraient avoir une localisation membranaire. Le sérum dirigé contre la glycoprotéine P5 a permis d'établir que cette protéine inconnue ne semble pas spécifique d'espèce ou d'organe, mais que les anticorps dirigés contre cette protéine réduisent la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide.

Ce travail présente une stratégie ayant permis la sélection et l'identification d'antigènes spermatiques. Différentes études sont encore nécessaires pour déterminer la séquence et les propriétés de ces antigènes. La recherche d'épitopes spécifiques et d'une formulation vaccinale adaptée pourrait permettre leur utilisation dans un vaccin contraceptif.

## Abstract



### **Selection, identification and partial characterisation of fox (*Vulpes vulpes*) sperm antigen for use in a contraceptive vaccine**

The aim of this work was to identify antigenic proteins on fox (*Vulpes vulpes*) spermatozoa, in order to develop a contraceptive vaccine. First, we obtained antisera directed against sperm surface proteins by rabbit and fox immunisation, and by fox vasectomy. Using this sera for Western blotting, 7 highly antigenic proteins were selected. They were named P3, P4, P5, P8, P11 and P13. Out of these 7 proteins, 6 were microsequenced by using Edman chemistry. Then, we obtained the cDNA encoding the 6 antigens by using RACE PCR or RT-PCR. Two PCR products were used as probes for the screening of a fox testis cDNA library realised in our lab. This allowed us to identify, clone and sequence the cDNA encoding P8 and P13. In order to characterise the selected antigens, we produced mouse polyclonal sera. This allowed us, for the protein P5, to assess the species and organ specificity, to localise them on the spermatozoa, and to assess the effect of these antisera on the zona pellucida-sperm binding, and on the sperm mobility. The glycosylation was equally studied for the 7 antigens.

P4 and P8 have homology with mitochondria proteins, NADH deshydrogenase and cytochrome-C oxydase respectively. P13 has homology with the human sperm protein *fibrousheatin 2*. The sequence of the glycoproteins P3 and P7, determined using RACE PCR, does not show similarity with any protein, and suggest that they are transmembrane proteins. P5 is a new protein which is not fox-specific and not sperm-specific. However, the antisera directed against P5 decrease the sperm-zona pellucida binding.

This manuscript describe a strategy which allowed the selection and the identification of sperm antigens. Many studies are necessary in order to determine the full sequence and properties of these antigens. The determination of specific epitopes and of adapted delivery system could allows their use in a contraceptive vaccine.

## Liste des abréviations

2D	deux dimensions
AA	acide aminé
ABP	<i>androgen binding protein</i>
AC	code d'accèsion
ACTA	association de coordination technique agricole
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AFSSA	agence française de sécurité sanitaire des aliments
AKAP	<i>A-kinase anchoring protein</i>
ALH	amplitude latérale de battement
AMH	hormone anti-mullerienne
AMPC	adénosine 3'-5' monophosphate cyclique
ANOVA	analyse de variance
AP	amorce adaptatrice ( <i>adaptator primer</i> )
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine tri phosphate
AUAP	amorce universelle abrégée d'amplification
BSA	sérum albumine bovine
CECOS	centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humains
CHRU	centre hospitalier régional universitaire
CNEVA	centre national d'études vétérinaires et alimentaires
DAB	3,3'-diaminobenzidine
dATP	desoxyadénosine triphosphate
dCTP	desoxycytidine triphosphate
ddATP	didesoxyadénosine triphosphate
ddCTP	didesoxycytidine triphosphate
ddGTP	didesoxyguanosine triphosphate
ddNTP	didesoxynucléotide triphosphate
ddTTP	didesoxythymidine triphosphate
DEPC	diethyl pyrocarbonate
dGTP	desoxyguanosine triphosphate
DIG	digoxigenine
dNTP	desoxynucléotide triphosphate
DO <sub>600</sub>	densité optique à 600 nm
DTT	dithiotréitol
dTTP	desoxythymidine triphosphate

---

ECL	<i>enhanced chimiluminescence</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
EIDLCR	entente interdépartementale de lutte contre la rage
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Library</i>
EP1, EP3	<i>epididymal protein1, epididymal protein3</i>
FA-1	<i>fertilization antigen-1</i>
FITC	fluoresceine isothiocyanate
FS2	<i>fibrousheatin 2</i>
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i>
FSP95	<i>fibrousheatin protein 95</i>
Fuc	fucose
Gal	Galactose
Gal-Nac	N acetyl galactosamine
Glc	Glucose
Glc-Nac	N acetyl glucosamine
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
HCG	hormone gonadotropine chorionique
HPLC	chromatographie en phase liquide haute pression
IEF	<i>iso electric focusing</i>
IgA	immunoglobuline de type A
IgG	immunoglobuline de type G
IgM	immunoglobuline de type M
IM	intra musculaire
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
LB	(milieu de) Luria-Bertani
LDH-C4	<i>lactate deshydrogenase C4</i>
LH	<i>lutinising hormone</i>
LIN	linéarité
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>
Man	mannose
M-MLV RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
MOPS	3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid
NADH	nicotinamine-adénine-dinucléotide hydrogéné
nt	non testé
NZY	Milieu NZ amine contenant des extraits de levure
p/v	poids / volume
pb	paire de bases
PBS	tampon phosphate salin

---

---

PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PFU	unité formant plages
PI	point isoélectrique
PM	poids moléculaire
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidenedifluoride
RACE PCR	amplification rapide des extrémités de l'ADNc
RCP	protéine transporteur de la riboflavine
RNase	ribonucléase
RSA	<i>rabbit sperm antigen</i>
RT PCR	réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la technique de Laemmli (1970)
SI	système immunitaire
SM	Milieu de stockage
SMCP	protéine spermatique riche en cystéine associée aux mitochondries
SSC	tampon <i>Saline sodium citrate</i>
SOB	antigène spermatique se liant à l'ovocyte
TBE	tampon tris-acide borique-EDTA
TBS	tampon tris-sodium
TEMED	N N N' N' tetraméthyl ethylene diamine
TFA	trifluoroacetyl
Tm	température de fusion
TRIS	Tris-[hydroxyméthyl]-aminométhane
Triton X-100	t-octylphenoxyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UV	ultra-violet
VAP	vitesse moyenne
VCL	vitesse curvilinéaire
VSL	vitesse progressive
WB	Western blot
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyli- $\beta$ -d-glucopyranoside
ZP	Zone pellucide

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Diagramme théorique de la variation de la population de renards sur une période de 3 ans et proportion des individus ayant accès aux vaccins oraux anti-rabiques (TC+) et n'y ayant pas accès (TC-) (Masson <i>et al.</i> , 1999). .....	21
<b>Figure 2</b> : Glandes annexes présentes chez l'homme et chez le chien (Fournier-Delpech et Thibault, 1991). .....	25
<b>Figure 3</b> : Schéma de l'ultrastructure d'une cellule de Sertoli (Dadoune et Demoulin, 1991). .....	27
<b>Figure 4</b> : Schéma récapitulatif de l'évolution de la lignée germinale mâle chez le renard bleu <i>Alopex lagopus</i> (Andersen, 1978). .....	30
<b>Figure 5</b> : Régulation hormonale de la fonction testiculaire (d'après Dadoune et Desmoulin, 1991). .....	32
<b>Figure 6</b> : Morphologie du spermatozoïde de renard observé en microscopie électronique à balayage (photos : Pr Foliguet / Verdier). .....	33
<b>Figure 7</b> : Schéma d'un spermatozoïde de renard et localisation possible des plans de coupes d'observations réalisées en microscopie électronique en transmission dans la région de la tête (A), du col (B) et du flagelle (C-D) (photos : Pr Foliguet / Verdier). .....	34
<b>Figure 8</b> : Schéma du déplacement du spermatozoïde et définition des différents paramètres de la vitesse. Exemple de valeurs obtenues chez un renard .....	35
<b>Figure 9</b> : Exemples de formes anormales de spermatozoïdes de renard observées en microscopie électronique. (Photos : Pr. Foliguet / Verdier). .....	37
<b>Figure 10</b> : Représentations schématiques des dernières étapes de la fécondation (Snell et White, 1993). .....	38
<b>Figure 11</b> : Schéma de la réaction acrosomique (à gauche, d'après Yanagimachi, 1994) et observation en microscopie électronique en transmission chez le renard (à droite, photo Pr. Foliguet / Verdier) .....	39
<b>Figure 12</b> : Données générales sur le renard (d'après Farstad, 1998). .....	41
<b>Figure 13</b> : position des différentes amorces utilisées pour le séquençage des fragments de RACE PCR ou des clones isolés à partir de la banque d'ADNc de testicule de renard. ..	75
<b>Figure 14</b> : Démarche expérimentale suivie pour la sélection des antigènes spermatiques....	90
<b>Figure 15</b> : Immunolocalisation des antigènes reconnus par les sérums des lapins sur des spermatozoïdes éjaculés de renard. ....	91
<b>Figure 16</b> : Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec les sérums des lapins immunisés L1-3. ....	91
<b>Figure 17</b> : Immunolocalisation d'antigènes reconnus par les sérums des renards immunisés R1-6 sur des spermatozoïdes éjaculés de renard. ....	92
<b>Figure 18</b> : Cinétique d'apparition des anticorps anti-spermatozoïdes révélés par Western blot chez les renards immunisés. ....	93

<b>Figure 19</b> : Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec les sérums des renards immunisés R1-6 prélevés à J0 et au moment où ces sérums reconnaissent le maximum de bandes.....	94
<b>Figure 20</b> : Immunolocalisation sur des spermatozoïdes de renard des antigènes reconnus par les sérums des renards vasectomisés R7-11, prélevés à J0 et à J120.....	95
<b>Figure 21</b> : Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec le sérum du renard vasectomisé R7 prélevé à J0, J30, J60, J90, J120 et J150.....	96
<b>Figure 22</b> : Cinétique d'apparition des anticorps anti-spermatozoïdes produits par les renards vasectomisés révélés par Western blot. ....	96
<b>Figure 23</b> : Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec le sérum du renard vasectomisé R8 prélevé toutes les deux semaines, deux ans après la vasectomie.....	97
<b>Figure 24</b> : Protéines du spermatozoïde de renard séparées par électrophorèse en deux dimensions, sur un gel à 12% d'acrylamide coloré à l'argent. ....	99
<b>Figure 25</b> : Localisation des 3 zones sélectionnées sur gel d'électrophorèse en 2D coloré au bleu de Coomassie et identification de 13 protéines contenues dans 2 aires principales. Immunoréactivité de ces aires après Western blot réalisés avec le sérum des lapins immunisés prélevé à J42 .....	100
<b>Figure 26</b> : Localisation des 2 zones sélectionnées sur gel d'électrophorèse en 2D coloré au bleu de Coomassie, et identification de 13 protéines contenues dans 2 aires principales. Immunoréactivité de ces aires après Western blot réalisés avec les sérums de renards immunisés prélevés à J90 .....	101
<b>Figure 27</b> : Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard séparés par électrophorèse en 2D révélés avec les sérums des renards vasectomisés R7, J120 (A) ; R8, J150 (B) ; R9 , J120 (C) et R10, J150 (D).....	102
<b>Figure 28</b> : Localisation des 8 zones sélectionnées sur gel d'électrophorèse en 2D révélées en Western blot réalisés avec les sérums des renards vasectomisés.....	102
<b>Figure 29</b> : Western blot de la protéine P13 purifiée révélé avec le sérum des lapins immunisés L1 et L3, des renards immunisés R2 et R3 et des renards vasectomisés R7-9. ....	103
<b>Figure 30</b> : Western blot des protéines P1, P4, P7 et P8 purifiées révélé avec le sérum des lapins (L1-3, J42) et renards (R1-6, J90) immunisés.....	104
<b>Figure 31</b> : Principe de la 5' RACE PCR : choix des amorces (A), démarche expérimentale (B) et ajustement des conditions de PCR (C). ....	107
<b>Figure 32</b> : Résultats obtenus par 5' RACE PCR (A-E) et par RT-PCR (F). ....	1088
<b>Figure 33</b> : Homologie entre la séquence de la protéine P4 et celle du précurseur mitochondrial de la NADH ubiquinone oxydoreductase.....	113
<b>Figure 34</b> : Homologie entre la protéine P7 et la proacrosine de porc (P08001).....	116
<b>Figure 35</b> : Homologie entre la protéine P8 et le polypeptide Vb de la cytochrome-C oxydase bovine (P00428).....	118

<b>Figure 36 :</b> Homologie entre la protéine P13 et les protéines spermatiques humaines fibrousheatin 2 (075952) et calcium binding protein 86 (fragment 6) spécifique du testicule (Q9HCY9).	122
<b>Figure 37 :</b> Homologie entre la protéine P13 et la RSA (ou SP17) décrite chez l’opossum (062771).	122
<b>Figure 38 :</b> immunofluorescence de spermatozoïdes épидидymaires de renards incubés avec des sérums d’une souris naïve (A), d’une souris immunisée contre P5 (B) et d’une souris immunisée contre P13 (C).	126
<b>Figure 39 :</b> Immunolocalisation de la protéine P5 sur des spermatozoïdes éjaculés de renard observés en microscopie électronique à transmission (X40000).	127
<b>Figure 40 :</b> Evaluation de la spécificité d’organe par Western blot d’extraits protéiques provenant de différents organes de renard révélés avec les sérums de souris immunisées contre P3 (à gauche), P5 (au centre) et P8 (à droite).	128
<b>Figure 41 :</b> Evaluation de la spécificité d’espèce par Western blot d’extraits protéiques provenant de spermatozoïdes de différents espèces révélés avec le sérum de la souris immunisée contre P5.	129
<b>Figure 42 :</b> Evaluation de la spécificité d’espèce par Western blot d’extraits protéiques provenant de spermatozoïdes de différents espèces révélés avec le sérum de la souris immunisée contre P8.	130
<b>Figure 43 :</b> Test de liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide. En présence d’anticorps anti-P5, le nombre de spermatozoïdes se fixant sur l’ovocyte (colorés en bleu ; A) diminue de façon significative ( $p < 0,01$ ) par rapport au témoin (sérum de souris non immunisée).	131
<b>Figure 44 :</b> Test de liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide. En présence d’anticorps anti-P13, le nombre de spermatozoïdes se fixant sur l’ovocyte (colorés en bleu ; A) diminue de façon significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin (sérum de souris non immunisée).	131

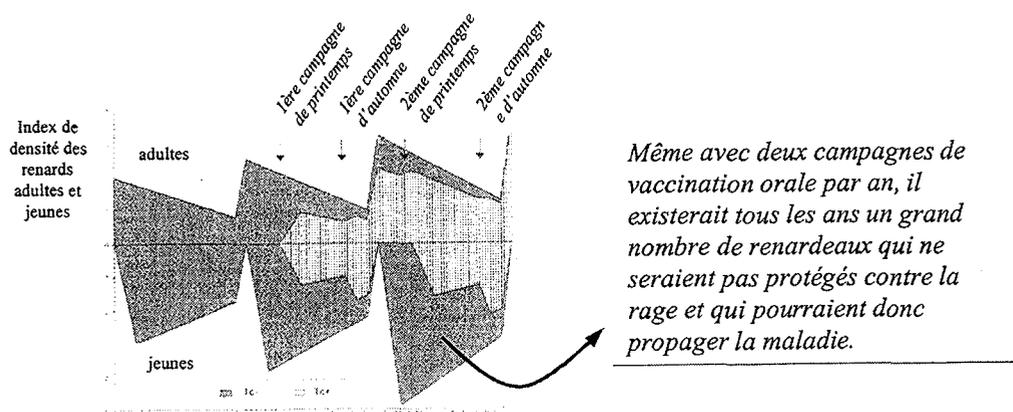
---

# 1. Introduction

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la prophylaxie de la rage vulpine, zoonose dont les conséquences sanitaires et économiques sont particulièrement graves sans traitement approprié (Blancou *et al.*, 1991). Si la prévalence de la maladie a diminué en France depuis les campagnes de vaccination orale, aboutissant à la reconnaissance de la France comme territoire indemne de rage (arrêté ministériel du 30 avril 2001), différentes données ont montré l'utilité d'une méthode de stérilisation dans le cadre d'une situation de ré-émergence de la maladie.

Une revue des données disponibles en Europe suggère une augmentation des densités de populations de renards dans plusieurs régions européennes, dont la France (Chautan *et al.*, 2000). Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer cette augmentation ont été émises, parmi lesquelles les conséquences de l'éradication de la rage sur la survie des renards et les conséquences des modifications des activités humaines sur la survie et la fécondité animaux semblent les plus pertinentes (Chautan *et al.*, 2000). Or, l'analyse du suivi de la vaccination orale du renard montre que 20 à 50% des animaux restent non-immunisés après les campagnes de vaccination. Si les effectifs des renards sensibles au virus atteignaient un niveau assez élevé, le virus de la rage pourrait se propager rapidement en cas de ré-émergence de l'épizootie. De plus, ces fortes densités de renards pourraient faciliter la propagation d'autres zoonoses dont il est le vecteur, comme l'échinococcose alvéolaire (Gloor *et al.*, 2001).

D'autre part, des études ont montré qu'il est difficile de vacciner efficacement les jeunes renards par les méthodes classiques (4% de séroconversion chez des renardeaux provenant d'une zone vaccinée par largage de vaccin oral par hélicoptère, Vuillaume *et al.*, 1997), soit qu'ils aient du mal à accéder aux appâts vaccinaux, soit qu'ils n'aient pas encore un statut immunitaire leur permettant d'être protégés efficacement. La conséquence est l'existence d'une population sensible au virus rabique, qui pourrait là aussi être un facteur favorisant une ré-émergence de la maladie (Figure 1).



**Figure 1 :** Diagramme théorique de la variation de la population de renards sur une période de 3 ans et proportion des individus ayant accès aux vaccins oraux anti-rabiques (TC+) et n'y ayant pas accès (TC-) (Masson *et al.*, 1999).

Pour prévenir ce risque, plusieurs mesures ont été envisagées, comme une seconde campagne de vaccination en automne (Masson *et al.*, 1999), le dépôt des appâts vaccinaux au terrier (Vuillaume *et al.*, 1997), ou la mise au point d'une méthode de stérilisation temporelle ou totale des renards utilisable par voie orale, permettant de réduire le renouvellement des effectifs sensibles au virus.

Différentes méthodes de stérilisation de populations d'animaux sauvages sont envisageables : chirurgicale (vasectomie ou ovariectomie), chimique, hormonale, ou immunologique. L'immunocontraception contrôle la fertilité en stimulant la production d'anticorps contre des protéines des gamètes, des hormones de la reproduction ou tout autre protéine essentielle à la reproduction. Ces anticorps vont interférer avec l'activité physiologique normale de ces agents, provoquant une infertilité (Miller *et al.*, 1998).

L'immunocontraception présente plusieurs avantages. Elle repose sur un processus naturel, dans le sens où les anticorps sont produits chez l'animal cible, ce qui ne nécessite pas un traitement répétitif chez l'animal avec des composés synthétiques. Cette méthode est compatible avec une administration par voie orale, et son action est réversible. De plus, les stratégies ciblant les antigènes spermatiques peuvent être spécifiques de l'espèce renard, sans effet sur son comportement social, et en particulier sur ses comportements territorial et de reproduction, et peuvent être efficaces chez les mâles comme chez les femelles. Ces qualités rendent cette méthode acceptable par le public, de plus en plus concerné par les questions de bien-être animal.

Cependant, si d'excellents résultats ont été obtenus sur divers modèles de laboratoire, prouvant la faisabilité de l'immunocontraception, aucun antigène n'est actuellement disponible pour le renard. D'une façon plus générale, le concept de l'immunocontraception doit encore faire ses preuves sur une large échelle. Différentes questions restent à résoudre, concernant notamment le choix de l'antigène, le choix d'une forme vaccinale utilisable sur le terrain et l'étude de l'effet de différents niveaux de stérilisation sur les populations de renards.

Le projet *Immunocontraception du renard* a été initié en 1996 par la Direction Générale de l'Alimentation, en collaboration avec l'AFSSA. Il comporte différents aspects, nécessaires pour répondre aux différentes questions que pose la mise au point d'un vaccin contraceptif : biologie des populations, maîtrise de la reproduction du renard en captivité, étude de l'immunologie du renard, choix de la méthode vaccinale et choix de l'antigène.

Dans un premier temps, l'utilité d'un fort taux de stérilisation dans le cadre de la lutte contre la rage a été démontrée (Suppo *et al.*, 2000). En effet, il peut exister des phénomènes de compensation comme une augmentation de la fécondité des animaux dominés lorsque les dominants deviennent stériles, ou une augmentation de la reproduction lorsque les populations diminuent en raison d'une plus grande disponibilité de nourriture.

D'autre part, différents outils ont été mis au point pour permettre d'évaluer l'effet d'un vaccin contraceptif, qu'il s'agisse de la maîtrise de la reproduction du renard en captivité (Boué *et al*, 2000) ou du perfectionnement de méthodes de suivi des populations de renards sauvages.

Concernant le choix de la méthode de vaccination, différents systèmes ont été évalués (peptide, protéine recombinante, vaccine recombinante, fantômes bactériens). Ces travaux ont montré la nécessité de mieux connaître l'immunologie humorale et cellulaire du renard.

Enfin, l'identification d'un ou de plusieurs antigènes spermatiques utilisables pour un vaccin contraceptif représente une partie intégrante de ce travail. Ce sont ces travaux qui sont présentés ici.

---

## **2. Etude bibliographique**

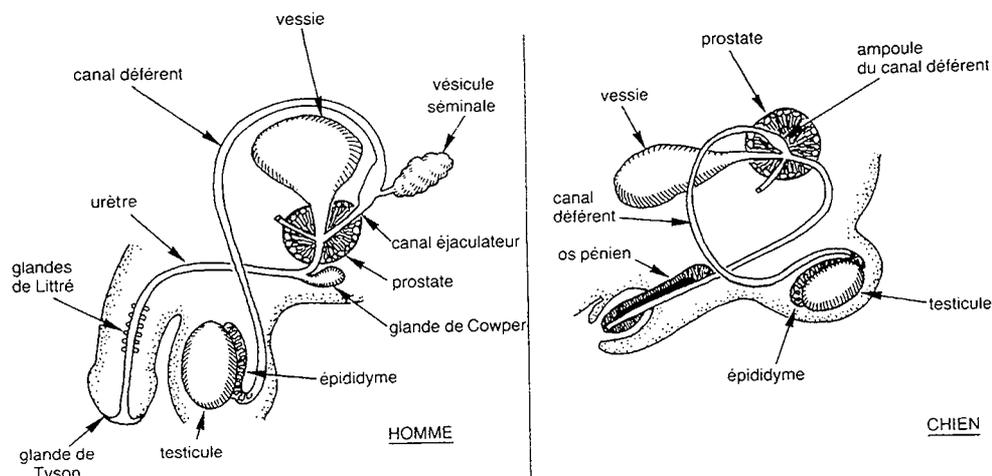
L'objectif de ce travail était l'identification de protéines spermatiques et leur évaluation en tant qu'antigène pour un vaccin contraceptif. Nous présenterons dans une première partie *le spermatozoïde*, puis dans une seconde partie *l'immunocontraception*. Sauf indication contraire, les rappels sur le spermatozoïde se basent sur le spermatozoïde humain, et les données sur le renard se rapportent à l'espèce *Vulpes vulpes*.

## 2.1 : Rappels sur le spermatozoïde

### 2.1.1 Données anatomiques

#### 2.1.1.1 : Organes reproducteurs mâles

Les spermatozoïdes sont produits dans le testicule, ils subissent une maturation dans l'épididyme et sont stockés dans la queue de l'épididyme avant l'éjaculation. Pendant l'éjaculation, les spermatozoïdes et le fluide environnant sont transportés à travers le canal déférent, mélangés avec les fluides provenant des glandes, pénètrent dans l'urètre par les canaux éjaculateur et sont finalement évacués. Le renard, comme le chien, ne possède pas de vésicules séminales, mais il est pourvu d'autres glandes accessoires, comme la prostate, dont les sécrétions se retrouvent dans la plasma séminal (Setchell *et al.*, 1994 ; Figure 2).



**Figure 2** : Glandes annexes présentes chez l'homme et chez le chien (Fournier-Delpech et Thibault, 1991).

#### 2.1.1.2 : Le testicule

Les testicules sont les organes responsables de la gamétogenèse et de la sécrétion d'hormones de la reproduction. Deux compartiments anatomiquement distincts assurent ces deux fonctions : les tubules séminifères, qui ont pour fonction de produire les spermatozoïdes, et le tissu interstitiel. Ce dernier est le tissu qui remplit les espaces entre les tubules : il contient entre autres les cellules de Leydig, synthétisant la testostérone, les nerfs, et les vaisseaux nerveux et lymphatiques.

Les testicules sont revêtus par une capsule fibreuse, l'albuginée. Elle est constituée de fibres de collagène et renferme, dans le cas du chien, des cellules musculaires lisses. L'albuginée présente une activité contractile spontanée et rythmique qui contribue à propulser les spermatozoïdes et le liquide testiculaire hors du testicule. Des projections de l'albuginée forment des cloisons ou *septa* qui délimitent des compartiments appelés lobules testiculaires. Chaque lobule renferme de 1 à 4 tubules séminifères contournés.

L'ensemble des tubules séminifères contournés convergent vers un tubule séminifère droit qui transporte les spermatozoïdes jusqu'au *rete testis*. Les spermatozoïdes quittent le testicule par le canal efférent et pénètrent dans l'épididyme (Dadoune et Demoulin, 1991).

#### 2.1.1.2.1 : Tubes séminifères

Chez l'homme, ces tubules pelotonnés sont nombreux (un millier par testicule), d'une longueur de 30 cm à 1,5 m et d'un diamètre de 150 à 300  $\mu\text{m}$ .

Ils sont formés de 2 parties. En périphérie, il existe une membrane basale fibreuse, riche en collagène, qui est entourée de deux couches de cellules aplaties : une couche superficielle irriguée par des vaisseaux sanguins et une couche profonde constituée de cellules myoïdes aplaties qui ont une fonction contractile. La partie intérieure du tubule comprend les cellules germinales intercalées entre les cellules de Sertoli, qui les nourrissent et les soutiennent au cours de leur développement. Chez l'humain, les cellules de Sertoli représentent 17% du volume testiculaire, et les cellules germinales 32%.

Les cellules de Sertoli achèvent leur multiplication et leur différenciation à la puberté. Leurs rôles sont multiples : nutrition des cellules germinales, mais aussi cohésion du tubule, filtration (contrôle le passage d'éléments nutritifs et de déchets cellulaires), nettoyage de la lumière du tubule (phagocytose des cellules avortives et d'éléments cytoplasmiques éliminés par les spermatozoïdes), coordination de la spermatogenèse et enfin sécrétion du liquide tubulaire et de molécules telles que l'AMH et l'ABP.

#### 2.1.1.2.2 : Espaces interstitiels testiculaires

Les espaces compris entre les tubes séminifères sont occupés par un tissu conjonctif lâche riche en vaisseaux sanguins, permettant le transport des hormones secrétées, et en vaisseaux lymphatiques. Les cellules de Leydig situées dans cet espace assurent la biosynthèse des androgènes dont le plus important est la testostérone.

Le développement et la fonction des cellules de Leydig sont sous le contrôle de l'hormone gonadotrope chorionique pendant la vie fœtale, puis de la LH. La régulation de la synthèse des androgènes par la LH semble être modulée par de multiples facteurs sécrétés au sein du testicule par les cellules de Sertoli et les cellules germinales. La sécrétion de ces facteurs varie au cours de l'ontogenèse, mais aussi selon le stade du cycle spermatogénétique dans le tubule voisin.

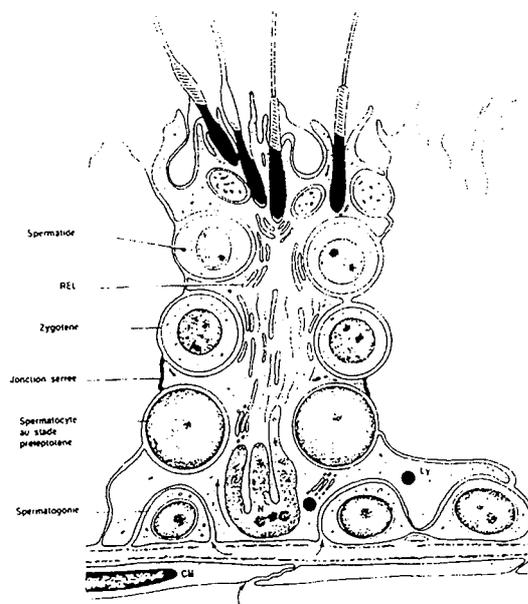
Les structures scrotales sont desservies par des neurofibres sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome qui suivent l'artère testiculaire le long du

cordon spermatique. La vasomotricité des cellules musculaires lisses de la gaine périvitulaire est contrôlée par des terminaisons adrénergiques. Des terminaisons cholinergiques ont aussi été mises en évidence dans le testicule. Chez le chien, trois types de récepteurs sensoriels ont été montrés au niveau testiculaire : des mécanorécepteurs, des récepteurs chimiques et des thermorécepteurs. Des fibres afférentes sensibles transmettent des influx associés aux traumatismes testiculaires (Boué et Chaffaux, 1998).

### 2.1.1.3 : La barrière hémato-testiculaire

#### 2.1.1.3.1 : Structure

L'épithélium séminifère du testicule contient deux types de cellules : les cellules germinales et les cellules de Sertoli (Figure 3). Celles-ci sont les seules à s'étendre de la base à l'apex de l'épithélium et sont engagées dans de nombreuses interactions cellulaires avec les autres cellules de Sertoli et les cellules germinales. Des études en microscopie électronique ont montré l'existence de jonctions cellulaires sur les trois côtés de ces cellules : des hémidesmosomes sur la membrane basale, et des jonctions de type *adherans*, *gap*, *tight* et *occlurans* sur les membranes latérales et apicales, situées respectivement au-dessous et au-dessus de la barrière hémato-testiculaire (Pelletier, 1998).



**Figure 3** : Schéma de l'ultrastructure d'une cellule de Sertoli (Dadoune et Demoulin, 1991).

Celle-ci est constituée des jonctions *occlurans* continues, associées dans une zone entourant les corps cellulaires, nommée *occluding zonule*. Cette zone est imperméable à l'entrée des traceurs : elle sépare les fluides apicaux et basolatéraux, ce qui permet l'établissement de gradients nécessaires aux transports actifs. Elle est donc imperméable aux lymphocytes et aux anticorps. Cette barrière étant située à la hauteur du tiers basal des cellules

de Sertoli, les spermatogonies et les spermatocytes au stade leptotène et zygotène se retrouvent dans le compartiment basal.

Cette barrière devient fonctionnelle à la puberté, au moment de la formation de la lumière des tubules, et en même temps que l'apparition de spermatocytes du stade zygotène. Ceux-ci sont donc séparés du système immunitaire. Cette barrière se maintient lorsque les cellules germinales migrent vers la lumière du tubule, pendant leur maturation. Si les mécanismes permettant le passage des cellules et le maintien de l'imperméabilité sont encore discutés, certaines protéines spermatiques de la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) pourraient intervenir (Zhu *et al.*, 1999).

La spermatogenèse n'est apparemment pas affectée par les anticorps anti-spermatozoïdes (Meinertz, 1992).

#### 2.1.1.3.2 : Barrière hémato-épididymaire et hémato-vas déférent

La barrière hémato-testiculaire est prolongée par une barrière hémato-épididymaire puis par la barrière hémato-vas déférent. Des études en microscopie électronique ont montré que ces barrières possédaient moins de jonctions *occlurans* que la barrière hémato-testiculaire. Cependant des travaux avec des traceurs de perméabilité (nitrate de lanthanum) ont montré qu'elles étaient tout aussi imperméables, même s'il existe des variations selon l'âge et le segment de l'épididyme (Levy et Robaire, 1999). Par rapport à la barrière hémato-testiculaire, leur développement est asynchrone, puisqu'elles se mettent en place plus tôt. Leur fonctionnement est également asynchrone. Ainsi, chez le vison, qui est caractérisé par un phénomène de régression testiculaire en-dehors de la saison de reproduction, la barrière hémato-testiculaire devient perméable lors de la régression testiculaire, tandis que les barrières hémato-épididymaire et hémato-vas déférent conservent leur imperméabilité (Pelletier, 1998).

#### 2.1.1.3.3 : Barrière immunologique

Les cellules germinales contiennent des antigènes qui sont exprimés à la puberté. Ces antigènes sont tolérés tant qu'ils restent *in situ*, mais des auto-anticorps sont générés s'ils entrent en contact avec le système immunitaire au niveau d'autres sites (expérience d'immunisation par exemple). Ainsi, chez le vison, la régression testiculaire saisonnière provoque une augmentation de 85% du taux d'anticorps anti-spermatozoïdes, mais très peu d'orchitis auto-immune ou d'infiltration de lymphocytes ont été observés. Cette donnée soutient l'hypothèse que non seulement les cellules de Sertoli ont un rôle dans la séquestration des antigènes, mais qu'elles ont également une action immunosuppressive. Il a en effet été montré que certains auto-antigènes, situés sous la barrière hémato-testiculaire, sont accessibles pour les auto-anticorps, et peuvent réagir avec des lymphocytes T et B. Les lymphocytes T expriment à haut niveau le récepteur Fas, qui induit l'apoptose des lymphocytes et des thymocytes lorsqu'il est activé par son ligand ou par un anticorps anti-Fas. Or, il a été montré que les cellules de Sertoli expriment le ligand Fas, provoquant ainsi

l'apoptose des lymphocytes. Ce mécanisme limite ainsi l'accès des immunoglobulines et des lymphocytes aux antigènes intra-testiculaires.

D'autres mécanismes immuno-suppresseurs ont été mis en évidence. Il a été montré que dans les cellules épithéliales du *rete testis*, il existe une forte production de prostaglandines par les prostaglandine-H2-synthases, induisant un chimiotactisme des cellules suppressives de lymphocytes T. La présence de ces cellules a également été mise en évidence dans le tissu sub-épithelial de l'épididyme. Enfin, le niveau des interleukines-6, qui jouent un rôle dans la croissance et la différenciation des lymphocytes B, est faible dans le plasma séminal d'hommes fertiles (Luckas *et al.*, 1998).

### 2.1.2 La spermatogenèse

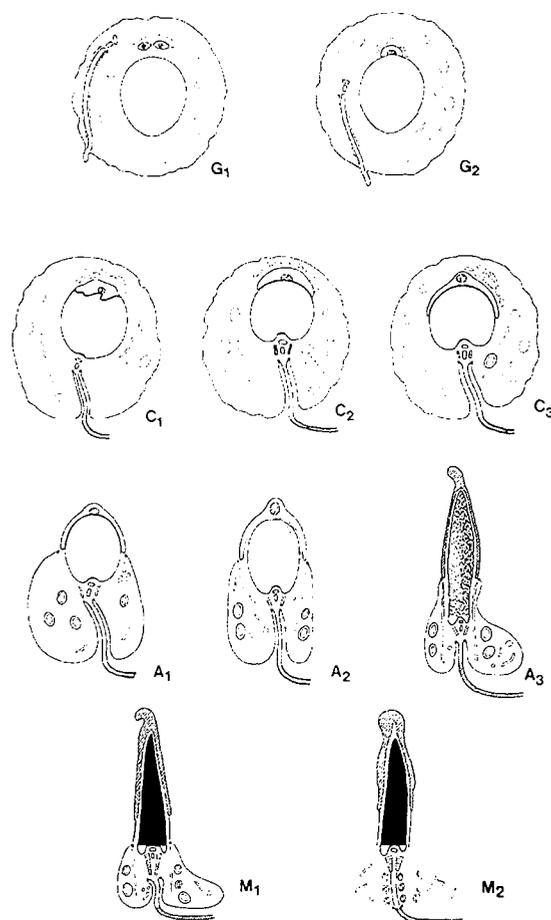
#### 2.1.2.1 : Différenciation du spermatozoïde

La spermatogenèse est composée d'une succession d'étapes correspondant à des modifications cytoplasmiques et nucléaires (Figure 4). Elle se déroule de la même façon chez le renard roux (*Vulpes vulpes*) que chez le renard bleu (*Alopex lagopus*) et chez le chien, mis à part la durée de certains stades du cycle de production (Andersen-Berg *et al.*, 1998). La spermatogenèse se déroule de façon continue dans les tubules séminifères du testicule, à partir de la puberté, mais la mise en place de la lignée germinale démarre dès le développement embryonnaire (Dadoune et Demoulin, 1991).

Elle débute par une *phase de multiplication* des cellules souches, les spermatogonies, qui se déroule pendant plusieurs périodes : embryonnaire et foetale (divisions très rapides), juvénile (ralentissement des divisions) et après la puberté (les divisions sont de nouveau plus rapides). Les spermatogonies sont disposées à la périphérie des tubes séminifères, entre les cellules de Sertoli. On en distingue plusieurs types, trois chez l'Homme (A sombre, A pâle, B) issues de divisions mitotiques. Elles sont connectées par des ponts intercellulaires de sorte qu'un groupe de cellules de même génération évolue de façon synchrone.

Les spermatogonies de type B subissent un accroissement cytoplasmique et une différenciation en spermatocytes I. Au terme de cette *phase d'accroissement*, l'ADN va se dupliquer, et les spermatocytes vont rentrer en phase S pré-méiotique.

La *phase de maturation*, ou méiose, commence par la division réductionnelle qui fait que chaque spermatocyte I diploïde va donner deux spermatocytes II haploïdes. Cette division se poursuit par la deuxième division méiotique, ou division équationnelle, qui donne deux spermatides pour chaque spermatocyte II. Le stade spermatide marque la fin des divisions cellulaires. Les spermatides sont généralement tous différents les uns des autres, ayant subi des *crossing-over*.



**Figure 4 :** Schéma récapitulatif de l'évolution de la lignée germinale mâle chez le renard bleu *Alopex lagopus* (Andersen, 1978).

La phase de cytodifférenciation, ou spermiogenèse, est composée de modifications cytoplasmiques et nucléaires faisant passer les cellules d'un état dépendant et immobile à un état autonome et mobile. L'appareil de Golgi du spermatide, situé entre le noyau et la région apicale de la cellule, sécrète un grand nombre de vésicules golgiennes qui fusionnent pour constituer la vacuole proacrosomique. Cette énorme vésicule va progressivement coiffer le noyau, aux deux tiers de sa surface, et va donner l'acrosome. Pour cela, des modifications membranaires auront lieu (accolement des membranes, disparition des pores nucléaires), ainsi que la sécrétion d'enzymes : acrosine, hyaluronidase, neurominidase, phosphatase acide, corona penetrating enzyme et d'autres enzymes protéolitiques. Les deux *centrioles* vont se séparer et se placer du côté opposé à l'acrosome. Le centriole proximal va rester proche du noyau, alors que le centriole distal va se placer plus en périphérie pour organiser la différenciation du flagelle, en donnant naissance aux microtubules du complexe axonémal. Ceci permettra la rotation du spermatide dans sa logette, de telle façon que le flagelle soit dans la lumière du tubule. Le cytoplasme va s'écouler en arrière de la cellule entraînant l'appareil de Golgi et les *mitochondries*. Celles-ci vont se disposer en spirale, entre le centriole distal et l'anneau de Jensen, déterminant la pièce intermédiaire du spermatozoïde. A cette hauteur, une hernie cytoplasmique va se former. Le noyau va changer de morphologie,

devenant de plus en plus ovale. Il y aura disparition des pores nucléaires au contact de la membrane interne de l'acrosome. Le noyau va se déshydrater progressivement et la chromatine va se condenser jusqu'à représenter 85% du noyau. Cette condensation se fait par un changement d'histones : les histones normales riches en lysine vont être remplacées par des spermhistones riches en arginine. D'autres protéines nucléaires de type kératinoïde et riches en cystine interviendraient dans la protection de l'ADN.

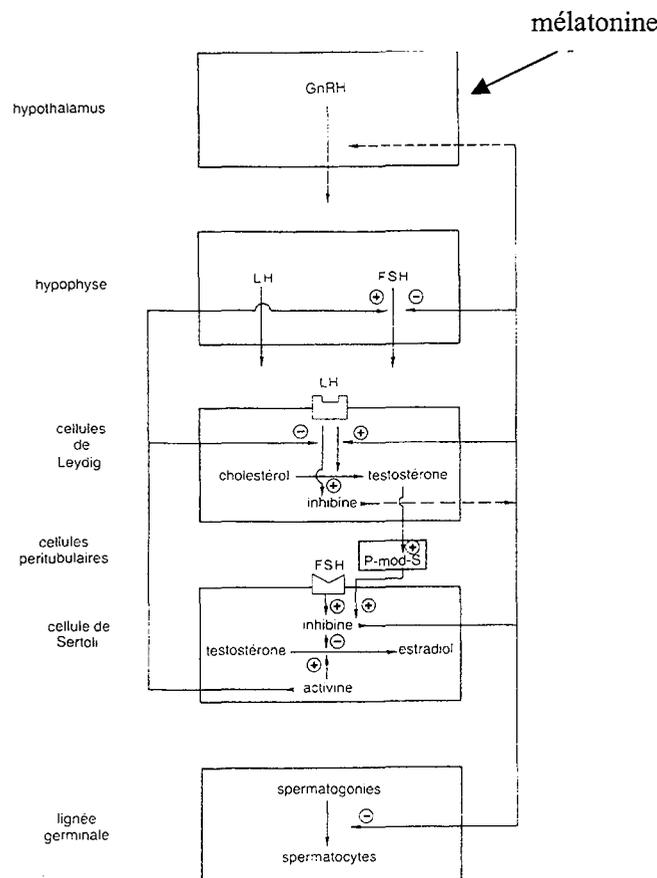
### 2.1.2.2 : Mécanismes de contrôle de la spermiogenèse

La spermiogenèse est régulée par des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et par des hormones gonadiques (Figure 5). Durant l'enfance, les hormones hypophysaires, le FSH et la LH, sont secrétées à un taux bas. A la puberté, la sécrétion de ces hormones sera activée par des facteurs hypothalamiques, la GnRH. Ces sécrétions permettront la production de FSH et de LH à une forte concentration dans le sang. La LH va stimuler la production de testostérone par les cellules de Leydig tandis que la FSH augmente la production de spermatozoïdes en agissant sur les tubules séminifères, en stimulant notamment les cellules de Sertoli qui sécrètent l'ABP (androgen binding protein). Celle-ci se lie à la testostérone ce qui permet le maintien d'une concentration élevée de cette hormone dans les tubules séminifères. Le complexe ABP-testostérone agit sur les cellules germinales.

L'hypothalamus et l'adénohypophyse subissent l'action inhibitrice de la testostérone (cellule de Leydig) et de l'inhibine (cellule de Sertoli).

Chez de nombreuses espèces de mammifères, les concentrations hormonales suivent un cycle annuel en fonction de la saison de reproduction, ce qui est par exemple le cas chez certains carnivores sauvages comme le renard (Lefebvre *et al.*, 1999). Chez le renard, la concentration plasmatique de LH et de FSH augmente fin novembre (en Europe) et atteint un maximum fin décembre, juste avant la saison de reproduction, puis diminue. La LH atteint également un pic secondaire en juin, tandis que le taux de FSH reste bas. Le taux de testostérone augmente également en novembre et en décembre, et montre un second pic en juin (Maurel *et al.*, 1984 ; Forsberg *et al.*, 1989 ; Andersen Berg *et al.*, 2001).

Chez le renard, les taux d'hormones plasmatiques peuvent également varier suivant les interactions sociales. Par exemple, pendant la saison de reproduction, les mâles d'élevage réagissent à l'introduction des femelles dans leur cage par une augmentation des taux plasmatiques de testostérone et d'oestradiol si la femelle est en anoestrus, tandis que le taux de ces hormones ne varie pas lorsqu'ils rencontrent une femelle réceptive (Osadchuk, 1996). Une conséquence pratique de ce phénomène est qu'il n'est pas possible d'élever des mâles et des femelles dans les mêmes cages lorsque les femelles sont en anoestrus, en raison de l'agressivité des mâles.



**Figure 5** : Régulation hormonale de la fonction testiculaire (d'après Dadoune et Desmoulin, 1991).

### 2.1.3 Le spermatozoïde

#### 2.1.3.1 : Aspect morphologique

Le spermatozoïde est constitué de trois parties : la tête, le col et le flagelle (Dadoune et Demoulin, 1991 ; Figures 6 et 7).

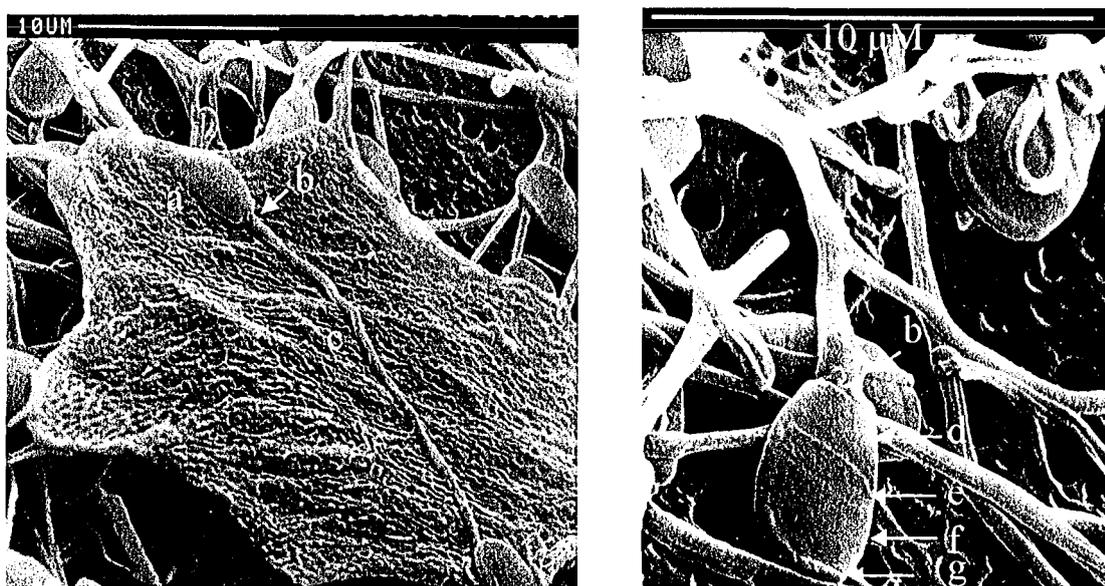
Chez le renard, la tête est en forme de raquette, ovale vue de face et aplatie vue de profil. A son extrémité apicale, le noyau est coiffé par l'acrosome dont on distingue, tant sur le plan morphologique que fonctionnel, les segments antérieur, équatorial et postérieur. L'acrosome est assimilé à un granule de sécrétion, il est limité par une membrane et contient des enzymes hydrolitiques.

Le *col* est une région complexe, où l'on retrouve la lame basale, mince couche amorphe dense aux électrons, ainsi que la pièce connective et ses colonnes segmentées qui abritent le centriole distal et qui sont doublées, sur leur face interne, par neuf fibres denses rigides et non contractiles. L'axonème central est constitué de deux microtubules isolés, entourés de 9 doublets de microtubules.

Le *flagelle* est constitué de trois parties. La *pièce intermédiaire*, qui poursuit le col, est caractérisée par la présence d'un ensemble de fibrilles de types différents : au centre, une

paire de microtubules entourée de 9 paires de microtubules et, plus extérieurement, de 9 paires de fibres denses. Les microtubules constituent l'axonème, elles sont constituées de protéines contractiles : tubuline, dynéine, nexine. Ces structures sont entourées de mitochondries allongées qui forment une gaine en hélice, grâce notamment à une protéine spécifique de la membrane externe des mitochondries du spermatozoïde, la SMCP (Herr et al., 1999). Cette pièce intermédiaire se finit au niveau de l'annulus, qui correspond à la terminaison du manchon mitochondrial. Le flagelle se poursuit par la *pièce principale* contenant une gaine fibreuse protéique hélicoïdale (composée d'une dizaine de protéines principales et de 15 protéines mineures, Petersen *et al.*, 1999) ainsi que l'axonème. Progressivement, les fibres denses, la gaine fibreuse ainsi que les paires de microfibrilles vont disparaître, donnant la *pièce terminale*.

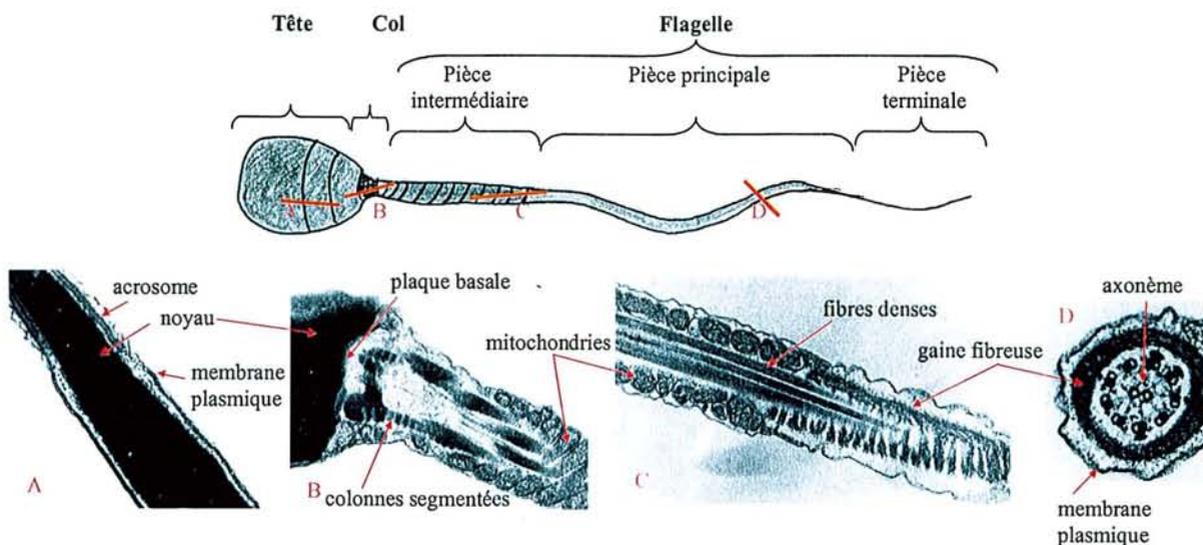
Ces caractéristiques morphologiques correspondent à des zones moléculaires spécifiques, intervenant à différents moments de l'interaction gamétique qui sera détaillée plus loin.



**Figure 6 :** Morphologie du spermatozoïde de renard observé en microscopie électronique à balayage (photos : Pr Foliguet / Verdier).

a : tête ; b : col ; c : flagelle ; d : région post-acrosomale ; e : segment équatorial ; f : segment principal (antérieur) de la tête ; g : segment apical.

Le spermatozoïde est largué dans la lumière du tube séminal lors de la spermiation, par contraction des microfilaments apicaux des cellules de Sertoli. A ce moment, il n'est ni mobile, ni fécondant. Etant dépourvu d'organites cellulaires permettant la synthèse protéique (appareil de Golgi, Reticulum Endoplasmique Granuleux, ...), il survit grâce au milieu dans lequel il se trouve.



**Figure 7 :** Schéma d'un spermatozoïde de renard et localisation possible des plans de coupes d'observations réalisées en microscopie électronique en transmission dans la région de la tête (A), du col (B) et du flagelle (C-D) (photos : Pr Foliguet / Verdier).

### 2.1.3.2 : Maturation du spermatozoïde

Au cours de son transit dans l'épididyme, le spermatozoïde va subir un processus de maturation correspondant à des modifications cellulaires et moléculaires, lui permettant de devenir mobile et fécondant.

Les transformations cellulaires correspondent à la fin de la différenciation du spermatozoïde : les mitochondries achèvent de se disposer en hélice, la chromatine finit de se condenser et la gouttelette cytoplasmique, présente chez le renard, est éliminée. Parallèlement, la perméabilité membranaire est modifiée, notamment par un changement du rapport cholestérol/phospholipides, pour modifier sa stabilité. Les protéines épидидymaires interagissent avec la surface du spermatozoïde, en étant incorporées à la membrane plasmique, en modifiant des résidus déjà présent, ou en agissant en tant que facteur capacitant. Ainsi, la protéine P34H se fixe sur le spermatozoïde et a un rôle dans l'acquisition du pouvoir fécondant (Boué *et al.*, 1994). D'autres protéines interviennent en ayant une action enzymatique, en régulant les niveaux calciques et en protégeant le spermatozoïde (Bedford, 1983). Par exemple, la protéine épидидymaire GPX5 se lie au spermatozoïde, notamment au niveau de l'acrosome (Vernet *et al.*, 1997). Cette glutathione peroxydase a une action antioxydante importante dans la maturation des spermatozoïdes (Schwaab *et al.*, 1998).

La mobilité apparaît au cours du transit dans l'épididyme, à partir du corps. Elle est liée à la fixation de protéines sécrétées par la tête épидидymaire (Serres et Kann, 1984) et à la présence de fructose dans les sécrétions épидидymaires, fournissant aux spermatozoïdes l'énergie permettant le battement des flagelles.

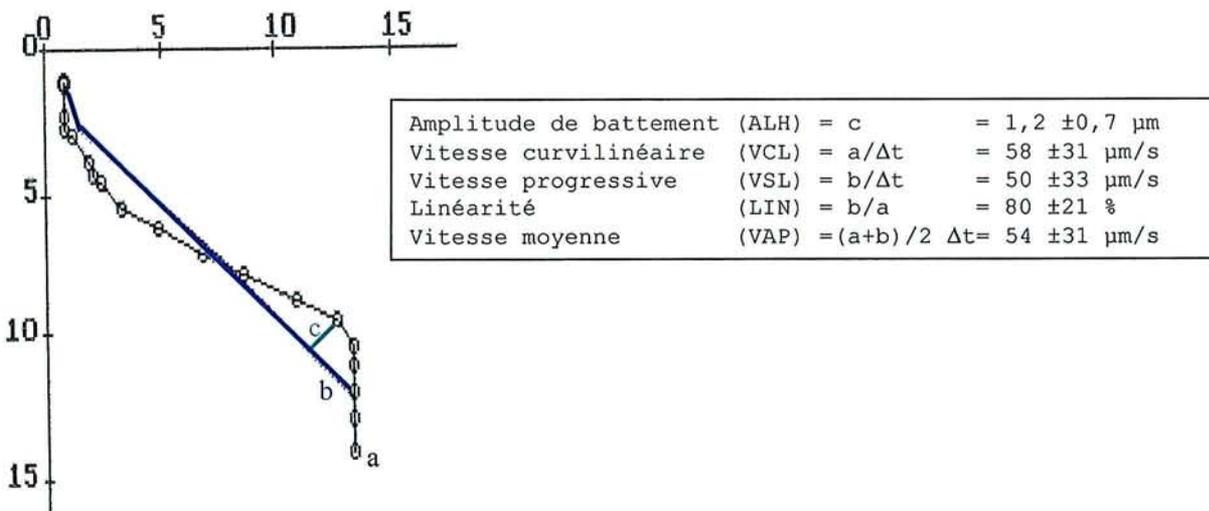
### 2.1.3.3 : Biologie du spermatozoïde

#### 2.1.3.3.1 : Mobilité

La mobilité est une caractéristique essentielle pour les spermatozoïdes, puisqu'elle permet la pénétration dans le mucus cervical, la remontée utérine et tubaire jusqu'au lieu de la fécondation, et enfin la traversée des enveloppes périovocytaires.

Ce mouvement est caractérisé par une onde flagellaire qui induit une rotation de 180° de la tête. A partir du mi-flagelle, une onde inverse est observée. Le flagelle est orienté (les mouvements sont toujours du même côté) en raison des structures périaxonémales. Le mouvement a pour origine un glissement des microtubules par action des bras de dynéine. Les liens de nexine et les ponts radiaires interviennent dans la courbure du flagelle. Ce mouvement serait initié et maintenu par la phosphorylation de protéines du flagelle par l'intermédiaire de l'AMPc. Différentes protéines ont été identifiées sur la gaine fibreuse, en particulier AKAP82 et de son précurseur, pro-AKAP82 (Turner *et al.*, 1999), AKAP3 et AKAP4 (Turner *et al.*, 2001). Le rôle dans la mobilité la protéine FSP95 qui pourrait être présente sur la gaine fibreuse n'est pas démontré (Mandal *et al.*, 1999), d'autant plus que cette protéine présente une homologie importante avec la protéine SOB1 qui serait impliquée dans l'interaction avec l'ovocyte (Lefèvre *et al.*, 1999).

Différents paramètres permettent de décrire le mouvement du spermatozoïde (Figure 8) : la vitesse progressive (VSL), la vitesse curvilinéaire (VCL), la linéarité (LIN), l'amplitude du battement (ALH) et la vitesse moyenne (VAP).



**Figure 8 :** Schéma du déplacement du spermatozoïde et définition des différents paramètres de la vitesse. Exemple de valeurs obtenues chez un renard (316 trajectoires analysées 2h après le prélèvement).

Ces mouvements ne sont pas constants à travers tout le tractus génital. Ils commencent dans la queue de l'épididyme, sont progressifs dans le liquide séminal, rectilignes dans le mucus cervical, et hyperactivés dans la cavité utérine. Ils subissent une

régulation mécanique (viscosité du milieu), mais également chimique (l'ATP et l'AMPc permettent l'initiation du mouvement, le calcium joue sur l'amplitude du mouvement, le pH, le bicarbonate et le fructose interviennent également). Les mouvements des spermatozoïdes peuvent être affectés par la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes, en particulier l'amplitude latérale (ALH) et de la vitesse de progression (VSL) (De Almeida *et al.*, 1991).

#### 2.1.3.3.2 : Production

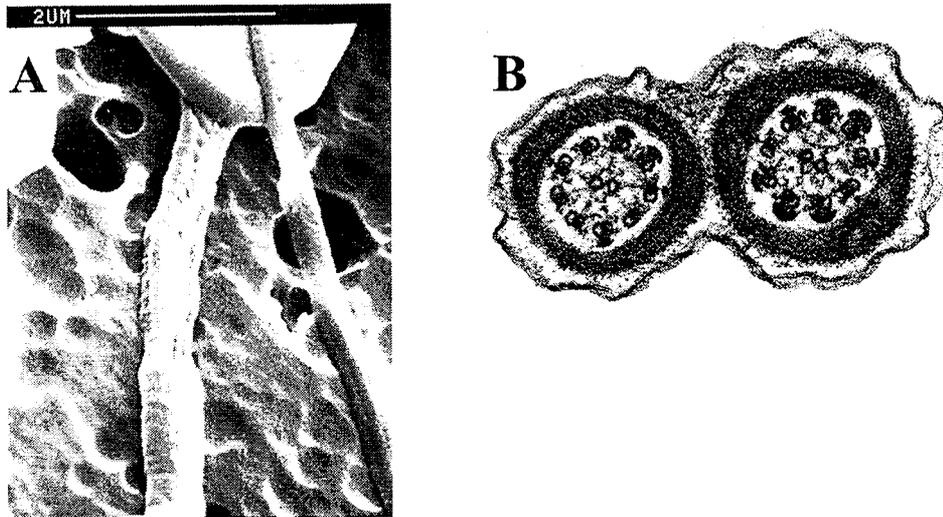
L'éjaculat de renard est composé de 3 fractions séparées. La première et la dernière fraction correspondent à des sécrétions prostatique, tandis que la seconde est riche en spermatozoïdes. Les caractéristiques de l'éjaculat du renard et d'autres carnivores sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Caractéristiques de l'éjaculat du renard et d'autres carnivores.

	<i>Canis familiaris</i>	<i>Canis rufus</i>	<i>Vulpes vulpes</i>			
	England et Allen, 1989	Koeler et al., 1998	Jalkanen, 1993	Osadchuk, 1999		Boué <i>et al.</i> , 2000
Condition de prélèvement		15 adultes, par électro-éjaculation	161 adultes sélectionnés pour la reproduction	3 adultes	26 jeunes	13 adultes
Volume (ml)	3 mL		0,93 mL	0,7 mL	1,3 mL	1 mL
Spermatozoïdes - concentration ( $\times 10^8$ /mL)	3	1,3	3,22	3,	1,6	0,8
- % mobiles	89%	70%	86%	90%	70%	70%
- % normaux	89%	65%	87%	91%	83%	67%

#### 2.1.3.3.3 : Formes anormales

Les anomalies des spermatozoïdes sont très variées : morphologiques (biflagellées, bicéphales, acéphales, microcéphales,...), anomalies de vitalité, anomalies génétiques (diploïdie, présence d'un chromosome sur-numéraire ou absence d'un chromosome). Il existerait moins de formes anormales chez le renard que chez l'humain (Jalkanen, 1993), ce que nous avons également observé par des observations en microscopie électronique (Figure 9).



**Figure 9 :** Exemples de formes anormales de spermatozoïdes de renard observées en microscopie électronique. A : déplacement de la pièce intermédiaire observé en microscopie électronique à balayage. B : biflagellé observé en microscopie électronique à transmission (Photos : Pr. Foliguet / Verdier).

#### ***2.1.4 La fécondation***

##### ***2.1.4.1 : Capacitation***

Les spermatozoïdes fraîchement éjaculés ne sont pas féconds, malgré leur apparente maturité structurelle et leur mobilité. Ils devront subir de nouvelles modifications au niveau de la membrane, de la mobilité et du métabolisme, ce qui leur permettra d'acquies un mouvement caractéristique, ainsi qu'une fluidité membranaire permettant la fécondation, et d'exposer les sites de reconnaissance de la zone pellucide. Ces modifications ont lieu dans les voies génitales femelles.

Pour permettre les remaniements membranaires, des composants d'origine épидидymaire ou provenant des glandes annexes, fixés sur le spermatozoïde de façon non covalente, sont relargués. D'autres protéines épидидymaires subissent des changements de masse moléculaire, probablement par perte de résidus glucidiques (Esbenhade et Clegg, 1980). Par ailleurs, des remaniements des protéines de la membrane plasmique entraînent la formation de zones dépourvues de protéines qui ont une capacité fusogène élevée (Friend *et al.*, 1977). La modification du rapport cholestérol/phospholipides induit une plus grande perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et modifie la fluidité membranaire, ce qui favorise la diffusion latérale des protéines membranaires (Singh *et al.*, 1978).

Cette étape de capacitation est réalisable *in vitro* et semble réversible (Oliphant 1976). Elle est complétée par la réaction acrosomique (pour revue, voir Lucas *et al.*, 1996).

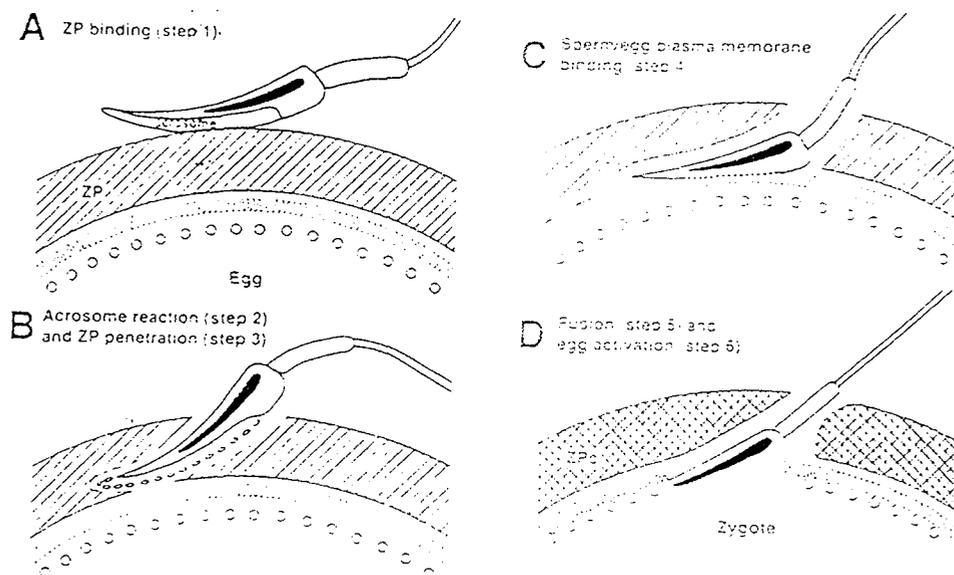
##### ***2.1.4.2 : Traversée du Cumulus oophorus***

Le cumulus oophorus qui entoure l'ovocyte est constituée de cellules de la granulosa et d'une matrice riche en acide hyaluronique. Seuls les spermatozoïdes capables mais avec

des acrosomes intacts pourront le traverser. Des hyaluronidases présentes sur la membrane externe du spermatozoïde, telle que la PH-20 identifiée chez le cobaye (Lin *et al.*, 1994), pourraient faciliter cette traversée. Il faut noter que cette protéine PH-20 a également été décrite chez le renard (ten Have *et al.*, 1998).

#### 2.1.4.3 : Liaison à la Zone Pellucide

La zone pellucide est une matrice riche en glycoprotéines qui entoure l'ovocyte. Elle est constituée de trois glycoprotéines, ZP1, ZP2 et ZP3, dont la partie peptidique présente de grandes analogies entre les espèces (Zhu et Naz, 1999, Kalaydjiev *et al.*, 2000). Cependant, la partie glycosylée présente de nombreuses variations qui pourraient avoir un rôle de barrière évitant les fécondations hétérosécifiques (Skutelsky *et al.*, 1994). En effet, la reconnaissance des spermatozoïdes et leur attachement primaire à la zone pellucide est principalement assurée par la partie glycosylée de la ZP3 (Oehninger, 2001).



**Figure 10 :** Représentations schématiques des dernières étapes de la fécondation (Snell et White, 1993). A : liaison à la zone pellucide. B : réaction acrosomique et pénétration de la zone pellucide. C : liaison à la membrane plasmique de l'ovocyte. D : fusion et initiation de la réaction corticale.

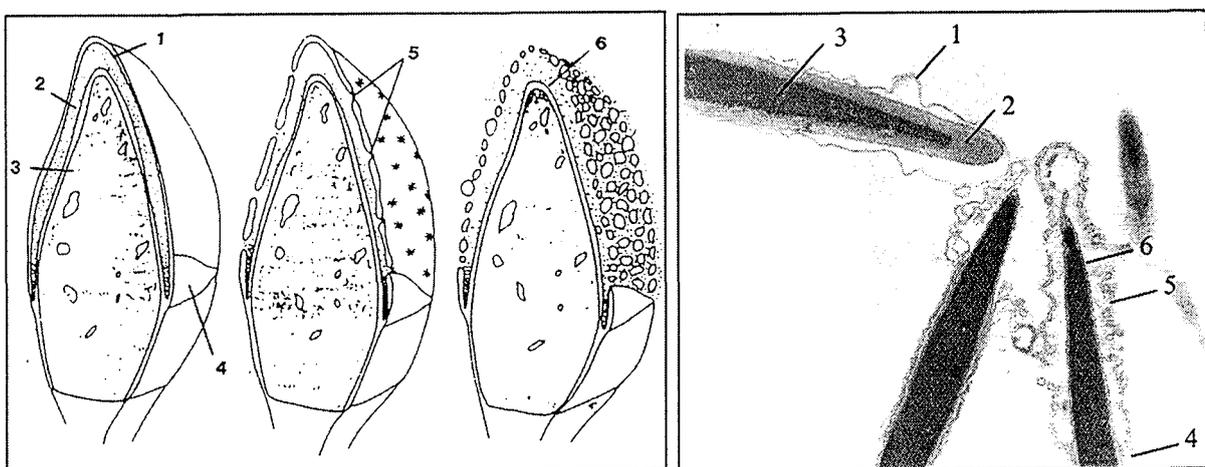
Au niveau du spermatozoïde, la reconnaissance et l'adhésion à la zone pellucide sont assurées par des protéines situées sur la membrane plasmique qui recouvre l'acrosome (Figure 10-A). Plusieurs protéines ont été décrites dans différentes espèces comme se liant à la zone pellucide. Chez la souris, différentes protéines ont été proposées : la  $\beta$ 1-4 galactosyl-transférase semble impliquée dans les processus de reconnaissance et d'adhésion à la zone pellucide (Miller *et al.*, 1992 ; Gong *et al.*, 1995); la tyrosine-kinase P95 (Leyton et Saling, 1989) et la sp56, qui se comporte comme une lectine, pourraient jouer un rôle de récepteur de ZP3 (Bleil et Wassarman, 1990). D'autres protéines situées sur la région acrosomique, la PH-

20 chez le cobaye (Primakoff *et al.*, 1985) et la P26h chez le hamster (Bérudé et Sullivan, 1994) semblent être impliquées dans la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide, ainsi que d'autres protéines, parmi lesquelles la P34H, l'homologue humain de la P26h (Boué et Sullivan, 1996) ; une famille de protéines de faible poids moléculaire, les RSA (O'Rand *et al.*, 1988) ; la proacrosine, la sp38, la sp56, les spermathésines (AQN-1, AQN-3, AWN : Veselsky *et al.*, 1999), les zonadhésines, la protéine ZRK (pour revue, voir McLeskey *et al.*, 1998 ; Brewis et Wong, 1999).

Actuellement, on ne sait pas si ce nombre important de protéines candidates à la fonction de récepteur est lié à des variations interspécifiques, à un mécanisme de liaison et de traversée de la ZP faisant intervenir de multiples protéines, ou à une combinaison de ces deux possibilités (Snell et White, 1996).

#### 2.1.4.4 : Réaction acrosomique

La réaction acrosomique est un phénomène d'exocytose caractérisée par la fusion progressive de la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe du spermatozoïde, suite à un influx de  $Ca^{2+}$  (Yanagimashi 1994 ; Florman 1994 ; Figures 10-B et Figure 11), sous l'action de progestérone sécrétée par les cellules du cumulus oophorus. La progestérone agit par l'intermédiaire d'un récepteur situé sur la membrane plasmique du spermatozoïde (identifié chez le chien, Sirivaidyapong *et al.*, 1999), qui est exosé graduellement pendant la capacitation (pour revue, Lucas *et al.*, 1996). Elle permet la libération des enzymes acrosomiales qui digèrent et rendent plus facile la pénétration de la ZP. Elle est provoquée par une agrégation suivie d'une auto-phosphorylation des récepteurs plasmiques, suite à leur liaison avec ZP3.



**Figure 11** : Schéma de la réaction acrosomique (à gauche, d'après Yanagimachi, 1994) et observation en microscopie électronique en transmission chez le renard (à droite, photo Pr. Foliguet / Verdier) .

1 : membrane plasmique ; 2 : acrosome ; 3 : noyau ; 4 : segment équatorial ; 5 : points de fusion ; 6 : membrane acrosomique interne.

Le spermatozoïde ayant fait sa réaction acrosomique expose sa membrane acrosomique interne, et une liaison s'établit entre cette membrane et les chaînes saccharidiques de ZP2, qui jouent un rôle de second ligand (Bleil *et al.*, 1988). Chez l'homme, c'est probablement la proacrosine, une protéase spermatique, qui est impliquée dans cette liaison secondaire, mais là aussi d'autres protéines ont été proposées : la SP10 chez l'humain (Coonrod *et al.*, 1996), la PH-20 chez le cobaye (Hunnicut *et al.*, 1996). Le spermatozoïde pénètre la ZP en utilisant l'action combinée d'une protéolyse limitée et de sa propre mobilité (pour revue, voir McLeskey *et al.*, 1998). Il faut noter que l'homologue de la SP10 a été identifié chez le renard (Beaton *et al.*, 1995).

#### 2.1.4.5 : Liaison à la membrane ovocytaire et fusion

Après la traversée de la ZP, le spermatozoïde entre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte avec laquelle il se lie et fusionne (Figure 10-C). La fusion est initiée dans la région du segment équatorial : la membrane plasmique est intégrée à celle de l'ovocyte et la membrane acrosomique interne est intégrée dans l'ovocyte en même temps que le noyau du spermatozoïde (Figure 10-D).

Le mécanisme de fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte s'apparente à celui de la fusion virale. Des protéines spermatiques, telles que le fertiline (décrite chez le cobaye comme PH30, Primakoff *et al.*, 1987) possèdent une double fonction d'adhésion et de fusion. D'autres protéines pourraient être engagées dans ces processus sans posséder cette double fonction. Ainsi, la fibronectine (Hoshi *et al.*, 1994) et la FLB1 (Boué *et al.*, 1995) seraient impliquées dans la liaison à l'ovocyte. A l'inverse, la protéine DE, protéine épидидymaire de rat, jouerait un rôle dans la fusion avec l'ovocyte (Perez Martinez *et al.*, 1995 ; Ellerman *et al.*, 1998).

## **2.2 : L'immunocontraception**

### **2.2.1 Qu'est-ce que l'immunocontraception ?**

#### 2.2.1.1/ Définition

Les vaccins contraceptifs contrôlent la fertilité en stimulant la production d'anticorps dirigés contre des molécules des gamètes, des hormones de la reproduction, ou d'autres protéines essentielles à la reproduction. Les anticorps interfèrent avec l'activité physiologique normale de ces agents, induisant une infertilité. Cette approche repose sur un processus naturel, dans le sens où les anticorps induits chez l'animal cible inhibent la reproduction sans nécessiter un traitement constant ou répétitif de l'animal avec un composé synthétique. Le traitement initial est réversible, son efficacité initiale étant de un à trois ans selon l'antigène, le modèle utilisé et la voie d'administration (Miller *et al.*, 1998).

Ces méthodes présentent différents avantages (Diekman et Herr, 1997) :

- elles ne font pas appel à des agents pharmaceutiques actifs ;
- elles sont facilement administrables, en particulier par voie orale, et ne nécessitent pas de fortes fréquences d'administration ;
- suivant l'antigène utilisé, elles peuvent être hautement spécifiques d'espèces : des effets souche-spécifiques ont même été obtenus chez la souris (Lea *et al.*, 1998-a) ;
- elles présentent peu d'effets secondaires par rapport aux traitements chimiques, en particulier sur les organes, sur le sex-ratio des jeunes et sur le comportement social des animaux (Nettles, 1997).

En raison de leurs avantages, ces vaccins sont étudiés en vue de différentes applications. Si la mise au point d'un vaccin contraceptif utilisable chez l'homme est très attractive (Primakoff 1994), cette stratégie est également étudiée pour la gestion des populations de différentes espèces sauvages pouvant poser des problèmes, telles que le cheval (Kirkpatrick *et al.*, 1997), l'éléphant (Fayrer-Hosken *et al.*, 2000-b), l'écureuil gris (Moore *et al.*, 1997), le chat (Jewgenow *et al.*, 2000), le chien (Barber et Fayrer-Hosken, 2000-a), le coyote (Miller *et al.*, 1998), le phoque (Brown *et al.*, 1997), l'élan (Garrott *et al.*, 1998), le lapin (Holland *et al.*, 1997), la gazelle (Kirkpatrick *et al.*, 1997), l'opossum (Sarre *et al.*, 2000) et le renard (Bradley *et al.*, 1997 ; Figure 12).

**Le renard :**

**Taxonomie :**

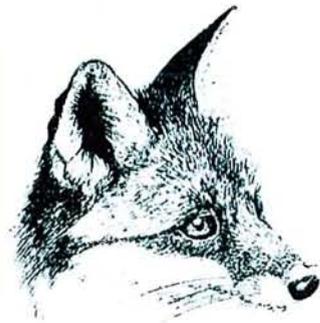
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Teleostomi; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Carnivora; Fissipedia; Canidae; *Vulpes vulpes*.

**Morphologie :**

longueur tête-corps : 50 à 90 cm ; queue : 30 à 50 cm ; poids : 4-10 kg.  
pelage généralement roux-brun, coloration variable

**Milieus fréquentés :** très divers : plaines cultivées, landes découvertes, dunes, forêts, zones urbaines...

**Régime alimentaire :** petits rongeurs, lapins, lièvres, insectes, lombrics, oiseaux, œufs, charognes, ordures, fruits



En France, les renards s'accouplent en hiver. Les femelles ont un seul oestrus par saison, d'une durée de 2-3 jours. L'ovulation est spontanée et a lieu au début de l'oestrus, 1 jour après le pic de LH. 3 à 6 petits, parfois plus, naissent après une gestation de 52±3 jours, et la période de lactation est de 8 semaines. Le renard est surtout nocturne et crépusculaire, et chasse seul. Vecteur de la rage en Europe, il peut également participer à la transmission d'autres maladies (échinococcose alvéolaire). En Australie, son activité prédatrice sur les espèces indigènes le fait considérer comme un animal nuisible.

**Figure 12 :** Données générales sur le renard (d'après Farstad, 1998).

### 2.2.1.2/ Rappels sur le système immunitaire

#### 2.1.2.1 : Le Soi immunitaire

Le système immunitaire néo-natal développe une reconnaissance des protéines et des hormones du *Soi*, et ne produit pas d'anticorps contre ces molécules. Cette reconnaissance du

*Soi* est vitale, puisqu'elle permet la reconnaissance, et donc la protection, contre les agents infectieux. Cependant, des auto-anticorps se forment parfois, provoquant des processus anormaux et destructeurs, impliqués dans des maladies telles que les scléroses et différentes formes d'arthrites.

Le système immunitaire dans son ensemble doit pouvoir distinguer ce qui fait partie du *Soi* et ce qui fait partie du *Non-soi*. Lorsque le système immunitaire détecte une substance étrangère, il va attaquer cette substance avec des anticorps déjà présents ou de nouveaux anticorps. Cependant, si cette substance étrangère est reconnue comme étant sans danger, le système immunitaire peut ne pas répondre, en raison d'une tolérance développée lors des expositions précédentes. La tolérance peut se développer contre du matériel étranger en quantités minimales, ou au contraire en présence de matériel en grande quantité, comme les protéines contenues dans la nourriture. Ainsi, dans l'intestin grêle, il existe un groupe de cellules lymphoïdes, les plaques de Peyer, dont le rôle est d'échantillonner les micro-organismes et les protéines contenues dans la nourriture lorsqu'elles passent à travers le système digestif. Mobiliser ces cellules immunitaires ou des structures similaires contenues dans le pharynx peut être une clé de l'efficacité d'un vaccin immunocontraceptif délivré par voie orale (Miller *et al.*, 1998).

Les vaccins contraceptifs sont dirigés contre des antigènes faisant partie du *Soi*, envers lesquels le système immunitaire est normalement tolérant. Pour que ces antigènes soient reconnus comme faisant partie du *Non-Soi*, ils sont couplés à des protéines étrangères à l'animal. En reconnaissant ces protéines étrangères, l'organisme va produire des anticorps dirigés contre ses propres protéines ou hormones essentielles pour la reproduction. L'induction de cette réponse immunitaire est la clé de l'immunocontraception. Cependant, la reconnaissance de ces molécules comme faisant partie du *Non-Soi* peut être insuffisante pour permettre l'établissement d'une réponse immunitaire efficace (Pennisi, 1996). Différentes stratégies sont envisageables pour contourner ce problème, notamment le couplage à des protéines heat-shock (qui sont des marqueurs de détresse cellulaire), le choix d'un vecteur vivant (*Salmonella* par exemple), ou encore le choix des antigènes et des épitopes les plus antigéniques.

#### 2.1.2.2 : Les immunoglobulines

Une immunostérilisation va impliquer l'immunité cellulaire et humorale. Les différents idiotypes d'immunoglobulines présentent des affinités et des caractéristiques de liaison différentes. Les IgA sont habituellement impliquées dans l'immunité des muqueuses (sécrétions séminales et cervico-vaginales), et les IgE jouent un rôle dans l'hypersensibilité immédiate et l'immunité anti-helminthes. Les IgM et les IgG reconnaissent les antigènes protéiques, mais ont également une bonne affinité pour les glycoprotéines.

Les IgG présents dans la circulation systémique jouent différents rôles : activation du système du complément, augmentation de la phagocytose par opsonisation, et déclenchement de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps. D'un point de vue humoral,

les IgM interviennent dans la réponse immédiate, tandis que les IgG sont impliquées dans la réponse immunitaire à long terme (Barber et Fayrer-Hosken, 2000-b).

### 2.1.2.3 : L'immunité locale

Le système immunitaire (SI) est composé du système périphérique systémique, et du système local mucosal. Les tissus lymphoïdes du SI systémique sont responsables des types d'anticorps retrouvés dans la circulation sanguine. Quand un antigène entre en contact avec le SI, sa composante systémique est impliquée dans la neutralisation de cet antigène. Après un certain temps, des anticorps sont produits par les cellules-B activées. Ce temps diminue, et l'amplitude de la réponse augmente, lorsque le SI rencontre de nouveau le même antigène (Muller *et al.*, 1997).

Le *SI mucosal* fonctionne comme un composant distinct de ce SI systémique. Il comprend des tissus sécrétoires, en contact avec l'extérieur de l'organisme, comme le tractus respiratoire, les glandes salivaires et lacrimales et le tractus reproductif. Les anticorps trouvés dans les sécrétions de ces sites sont généralement de l'isotype IgA. Une des clés de l'immunocontraception est la possibilité d'induire une réaction immunitaire dans le mucus du tractus génital. D'une façon générale, la concentration d'anticorps nécessaire pour la neutralisation des spermatozoïdes est supérieure à celle nécessaire pour la neutralisation des ovocytes, qui sont moins nombreux (Naz, 1999).

Chez la femelle, les composants de l'immunité cellulaire ainsi que les immunoglobulines systémiques sont présents dans différentes proportions du vagin à l'ampoule ovarienne. La muqueuse vaginale est composée d'un épithélium squameux stratifié contenant peu de tissu lymphoïde organisé. Cependant, les cellules plasmiques sécrétant des IgA et des IgG sont présentes tout le long de cette muqueuse, et ces immunoglobulines sont détectées dans les sécrétions vaginales. La glaire cervicale est riche en IgG et en IgA. L'analyse endocervicale montre la présence de nombreuses cellules plasmiques IgA sécrétoire et des cellules sécrétant des IgG et IgM (qui pourraient être des progéniteurs des IgA, les anticorps IgM ne se retrouvant pas dans le mucus, Lippes *et al.*, 1970). Le système du complément est également présent à des niveaux permettant la réaction du complément. L'utérus apparaît dénué de tissu lymphoïde organisé, mais des cellules sécrétrices d'IgG et d'IgA entourent généralement les glandes endométriales. Ces immunoglobulines se retrouvent dans les sécrétions utérines (Collins *et al.*, 1979 ; Head et Billingham, 1986). Dans la plupart des cas, l'oviducte ne présente pas ou peu de cellules plasmiques dans le tissu sub-mucosal, bien que des IgG et des IgA aient été détectées dans les sécrétions, ce qui suggère que la majorité de ces immunoglobulines entrent par transudation depuis la circulation sanguine.

Chez le rat, certaines données suggèrent que la sécrétion d'anticorps pourrait avoir lieu en différents sites suivant la nature de l'antigène (pour revue, Naz 1999). La femelle sécrète des anticorps de type IgG et IgA dans le mucus du canal cervical, à des taux suffisants pour recouvrir les spermatozoïdes. De plus, de hauts titres sériques en anticorps (notamment

des IgG, Lea *et al.*, 1998-b) semblent permettre une inhibition de la fonction spermatique à l'intérieur de l'oviducte. Enfin, des IgA et des IgG ainsi que quelques IgM ont été retrouvées dans les fluides folliculaires (Naz, 1999).

Les sécrétions du SI sont *régulées* chez la femelle par la progestérone et l'oestradiol, qui contrôlerait la migration des IgA et des IgG du sang vers le tractus génital (Bradley, 1994). En particulier, pendant le pré-oestrus, les taux d'IgG et d'IgA augmentent dans l'utérus et diminuent dans les sécrétions cervico-vaginales. Une des conséquences est que le taux d'IgA dans le mucus cervical diminue au milieu du cycle, au moment où un haut titre en anticorps est nécessaire pour un effet immunocontraceptif (Anderson et Alexander, 1983).

Chez *le mâle*, l'endothélium microvasculaire testiculaire régule le transport des lymphocytes et des immunoglobulines. L'organisation du drainage lymphatique testiculaire varie selon les espèces, mais il semble qu'il existe des ganglions lymphatiques pour chaque espèce étudiée (Setchell *et al.*, 1994). Dans les conditions normales, peu ou prou de lymphocytes sont détectés dans le testicule. Cependant, dans des conditions pathologiques comme les orchites autoimmunes, le testicule subit une infiltration lymphocytaire, à des sites préférentiels, dont la capsule testiculaire adjacente au rete testis, et l'interstitium entourant le rete testis et le tube droit. A cet endroit, les lymphocytes peuvent accéder relativement facilement aux antigènes spermatiques (Itoh *et al.*, 1998). Les anticorps du pasma séminal constituent une combinaison d'anticorps produits localement et d'anticorps provenant de la circulation par transsudation. La concentration d'anticorps du pasma séminal est d'environ 1% de celle du sérum (Meinertz, 1992).

Dans le SI mucosal, il existe des *sites de capture* des antigènes permettant l'induction de la réponse immunitaire. Ces sites incluent les plaques de Peyer. Il s'agit de tissus lymphoréticulaires associés à l'intestin. Ainsi, Bradley (1994) a immunisé des renardes avec des spermatozoïdes entiers directement dans les plaques de Peyer, afin de mimer l'effet d'une immunisation par voie orale. Ces femelles ont produit des anticorps anti-spermatozoïdes (IgG, IgA) dans leur sérum et dans leurs sécrétions vaginales. Ce résultat signifie qu'une vaccination par voie orale contre des antigènes spermatiques pourrait permettre la production d'un taux d'anticorps suffisant pour induire un effet contraceptif (Bradley *et al.*, 1999).

### 2.2.1.3/ Les différentes cibles des vaccins contraceptifs

L'immunocontraception peut interférer avec différents processus menant à la reproduction, par exemple en interférant avec l'activité des hormones de la reproduction, avec l'interaction gamétique ou avec le développement de l'embryon. Ces dernières stratégies, provoquant une infertilité en interférant avec la gestation, sont appelées *contragestion*.

#### 2.1.3.1 : Mélatonine

Il est établi que chez certaines espèces possédant une saison de reproduction annuelle, comme le renard, la GnRH est activée par la libération de mélatonine par la glande

pinéale. La durée des jours et de la nuit influence la sécrétion de mélatonine, ce qui induit une augmentation des taux sanguins de GnRH, qui, à son tour, va stimuler l'activité reproductrice.

Des anticorps anti-mélatonine peuvent donc perturber le début de la saison de reproduction de ces animaux. Cependant, peu de recherches sont actuellement menées sur l'utilisation de la mélatonine comme antigène contraceptif, les multiples rôles de cette protéine n'étant pas tous connus (Miller, 1998).

#### 2.1.3.2 : GnRH

La GnRH est produite dans le cerveau par l'hypothalamus. Son rôle est de contrôler la libération par l'hypophyse des hormones de la reproduction, la LH (luteinizing hormone) et la FSH (follicule-stimulating hormone), dont le rôle est de contrôler la fonction des ovaires et des testicules. Les anticorps dirigés contre l'hormone hypothalamique vont réduire le taux circulant de GnRH biologiquement active, ce qui provoquera une réduction de la libération des hormones de la reproduction. Cette réduction ou absence des hormones reproductives induira une atrophie des gonades, conduisant à une infertilité.

La structure de cette hormone est bien connue, ce qui a permis de développer des vaccins dirigés contre différents épitopes dans différentes espèces. Chez le rat, Miller *et al.* (1997) ont montré l'efficacité d'un vaccin anti-GnRH pour induire une infertilité chez le mâle et chez la femelle. Chez la gazelle, cette méthode est testée depuis plus de quatre ans, ce qui a permis d'en étudier les effets à long terme (Miller *et al.*, 2000). L'immunisation avec GnRH s'est révélée être une méthode efficace et réversible de contraception (88% de baisse de la fécondité). Il faut cependant noter une baisse du comportement reproducteur chez les animaux traités, ce qui pourrait poser des problèmes de compensation chez le renard. En effet, pour cette espèce, seule une partie de la population est impliquée dans les comportements de reproduction (Farstad, 1998), et une baisse d'activité des animaux dominants pourrait être compensée par une augmentation d'activité des animaux dominés.

Il faut noter que si les mêmes effets peuvent, en principe, être obtenus en vaccinant contre les récepteurs de la GnRH, très peu d'études sont menées en utilisant ces récepteurs comme antigènes.

#### 2.1.3.3 : Gonadotropines

Les mécanismes de croissance des gamètes sont sous le contrôle d'hormones hypophysaires, la LH et la FSH, qui peuvent également être utilisées comme antigènes pour des vaccins contraceptifs efficaces chez le mâle comme chez la femelle.

Chez la femelle, il a été récemment établi que la FSH peut être un auto-antigène, reconnu par des auto-anticorps présents dans le sérum de patientes infertiles (Gobert *et al.*, 2001).

Chez le mâle, les vaccins dirigés contre la LH provoquent une azoospermie, tandis que les vaccins dirigés contre la FSH induisent la production de spermatozoïdes de mauvaise qualité et en faible nombre, qui sont incapables de féconder (Moudgal *et al.*, 1997-a).

Ces vaccins sont bien tolérés chez les primates non humains, qui ne montrent aucun symptôme de toxicité. Des essais préliminaires chez l'humain ont montré que ces vaccins sont bien tolérés. Un vaccin anti-FSH n'a pas provoqué de changement dans les concentrations hormonales, ni dans les marqueurs biochimiques sériques, mais a induit une réduction de l'activité Sertolienne (Moudgal *et al.*, 1997-b). Les vaccins dirigés contre la LH provoquent une baisse de la production de testostérone, ce qui induit des effets secondaires, notamment sur la libido (Westhoff *et al.*, 1997).

#### 2.1.3.4 : Zone pellucide

La zone pellucide est une couche acellulaire située entre l'ovocyte et les cellules de la zona granulosa. Elle est constituée de trois glycoprotéines, ZP1, ZP2 et ZP3. Pour pouvoir féconder un ovocyte, les spermatozoïdes doivent obligatoirement se lier à la zone pellucide. Cette liaison implique la partie glycosylée de ZP3, et en particulier des oligosaccharides O-liés à des résidus sérine ou thréonine (Barber et Fayerer-Hosken, 2000-b).

En raison de la forte homologie de la partie peptidique des glycoprotéines de la ZP qui existe entre les espèces (Zhu et Naz, 1999), de l'accessibilité des ces glycoprotéines aux anticorps (Haebenicht et Stock, 1996), de la facilité à les purifier en grandes quantités, et de la spécificité d'organe de ces antigènes (Barber et Fayerer Hosken, 2000-a), différents auteurs ont provoqué une infertilité chez différentes espèces animales en leur injectant de la ZP porcine complète : rongeurs, cheval, lapin, chien (Fayerer-Hosken *et al.*, 2000-a), éléphants (Fayerer-Hosken *et al.*, 1999), primates non-humains (babouins, cynomolgus, Martinez et Harris, 2000). Il y aurait approximativement 45 espèces animales pour lesquelles la zone pellucide porcine serait un antigène immunocontraceptif efficace (Barber et Fayerer-Hosken, 2000-b).

Les anticorps dirigés contre les glycoprotéines de la zone pellucide vont provoquer une infertilité selon différents mécanismes (Barber et Fayerer-Hosken, 2000-b) :

- en empêchant la *liaison* des spermatozoïdes par masquage ou par changement de conformation des récepteurs, ou par des phénomènes d'encombrement stériques ;
- en inhibant la *pénétration* des spermatozoïdes à travers la zone pellucide, par différents mécanismes : inhibition de la réaction acrosomique, encombrement stérique, masquage ou changement de conformation des récepteurs (cas des vaccins dirigés contre ZP2).

De plus, ces anticorps peuvent interférer avec la maturation des ovocytes, provoquant la mort de ces cellules. Des dysfonctions ovariennes ont également été décrites, notamment chez le chien (Fayerer-Hosken *et al.*, 2000-a) : diminution du volume ovarien, altération du développement et de la différenciation folliculaire, baisse du nombre de follicules primordiaux (Paterson *et al.*, 2000), diminution des taux d'œstrogène et absence d'ovulation (Barber et Fayerer-Hosken 2000-b). D'autre part, une interruption du cycle menstruel a été observée (Paterson *et al.*, 2000). Certains de ces effets sont réversibles. Il faut noter que la

présence des dommages ovariens est corrélée à différents facteurs, tels que la pureté de l'antigène, le modèle animal, l'adjuvant, la présence d'épitope cellules-B ou cellules-T (Afzalpurkar *et al.*, 1997, Shigeta *et al.*, 2000, Paterson *et al.*, 2000). Ce type d'effets secondaires, absolument indésirable pour les applications humaines, est toutefois plus facilement admissible dans le cas du renard (Bradley *et al.*, 1999).

La liaison spermatozoïdes-ZP implique des protéines hautement glycosylées. La structure peptidique des protéines de la zone pellucide étant fortement conservée entre les espèces, la spécificité d'espèce de la fécondation pourrait être contrôlée par des différences au niveau des carbohydrates de la zone pellucide. L'efficacité de la vaccination avec les glycoprotéines de la zone pellucide porcine chez de nombreuses espèces pourrait être expliquée par une liaison des anticorps à la partie peptidique des glycoprotéines, inhibant la liaison des spermatozoïdes et l'induction de la réaction acrosomique. Les perspectives des vaccinations dirigées contre les protéines de la zone pellucide passent, pour chaque espèce, par la caractérisation des mécanismes de reconnaissance qui permettraient la synthèse de courts peptides glycosylés pouvant être utilisés comme antigènes pour des vaccins contraceptifs spécifiques d'espèces. L'utilisation de plusieurs épitopes semble par ailleurs une stratégie valable pour augmenter l'efficacité de ces vaccins (Paterson *et al.*, 1999).

#### 2.1.3.5 : Antigènes ovocytaires

Après avoir traversé la zone pellucide, les spermatozoïdes doivent se lier à la membrane de l'ovocyte pour pouvoir fusionner. Cette liaison se fait par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, tant sur le spermatozoïde que sur l'ovocyte (pour revue, McLeskey *et al.*, 1998). Des anticorps dirigés contre les protéines ovocytaires impliquées dans cette reconnaissance sont donc théoriquement capables d'inhiber la fécondation, puisqu'il est établi que les anticorps peuvent traverser la zone pellucide (Diekman et Herr, 1997).

Peu d'études sont actuellement menées en ciblant ces protéines. Cependant, Naz *et al.* (2001) ont récemment identifié un antigène situé sur la membrane de l'ovocyte de souris et ont montré que les anticorps dirigés contre cet antigène sont capables de diminuer la fertilité, *in vitro* et *in vivo*. Cet antigène étant spécifique de l'ovocyte, il constitue un candidat attractif pour les vaccins contraceptifs, montrant la faisabilité de cette stratégie.

Un autre antigène ovocytaire, nommé TEC2, a été identifié. Cette glycoprotéine semble impliquée dans la fusion avec le spermatozoïde, et il a été montré que les anticorps dirigés contre cet antigène diminuent significativement le nombre d'ovocytes fécondés (Gougoulidis *et al.*, 1999).

Un effet contraceptif pourrait également être obtenu en activant la réaction corticale. Cette réaction, dont le but est d'empêcher la polyspermie, est permise par l'exocytose des granules corticaux due à différentes substances dont le calcium. Il serait possible par la liaison d'anticorps sur des ionophores d'induire cette réaction (Barber et Fayer-Hosken, 2000-b).

#### 2.1.3.6 : Antigènes du plasma séminal

Le plasma séminal permet la survie des spermatozoïdes. Il est composé de différents constituants, dont environ 250 protéines qui ont pu être isolées par électrophorèse en deux dimensions (Mortarino *et al.*, 1998). Certains de ces constituants peuvent être la cible de vaccins contraceptifs. Par exemple, les anticorps dirigés contre les prostasomes, qui sont sécrétés par la prostate et qui peuvent adhérer aux spermatozoïdes, provoquent l'agglutination des spermatozoïdes (Allegruci *et al.*, 2001).

Le plasma séminal contient également l'inhibine, qui a par ailleurs une fonction endocrine sur l'hypothalamus (figure 5). Il a été montré que l'immunisation de rats mâles adultes avec un peptide synthétique correspondant à un épitope de l'inhibine du plasma séminal humain provoque l'agglutination des spermatozoïdes épидидymaires, ce qui diminue de plus de 75% la fertilité de ces animaux. Cette immunisation provoque une augmentation de la FSH, mais pas de la LH ni de la testostérone, ce qui induit l'arrêt de la spermatogenèse. De plus, une agglutination des spermatozoïdes a été décrite chez ces animaux (Vanage *et al.*, 1992). L'histologie du testicule et des autres organes reproducteurs montre que ces organes ne sont pas altérés (Vanage *et al.*, 2000). Afin d'étudier la fonction de l'inhibine chez le renard, Andersen Berg *et al.* (2001) ont immunisé des renards contre cette hormone, sans obtenir d'effet sur la spermatogenèse.

#### 2.1.3.7 : Gonadotropine chorionique

Dans différentes espèces animales, l'hormone Gonadotropine Chorionique est sécrétée par l'embryon implanté. Elle induit la prolongation de la production de progestérone par le corps jaune de l'ovaire, permettant le maintien de la gestation. Les anticorps dirigés contre cette hormone réduisent le taux d'hormone active plasmatique, et empêchent le succès de l'implantation des zygotes. Il s'agit donc d'une méthode de *contragestion*.

Des essais cliniques de stade 2 sont actuellement en cours chez l'humain en utilisant cette stratégie (Talwar *et al.*, 1997). Ils montrent que peu d'effets secondaires sont produits par ce vaccin, qui est efficace et réversible. Lorsque des enfants ont été obtenus, ils n'ont montré aucune séquelle (Singh *et al.*, 1998)

#### 2.1.3.8 : Protéine transporteur de la riboflavine

Les besoins en riboflavine de l'embryon sont satisfaits par le transport actif de cette vitamine à travers le placenta. Ce transport est facilité par une protéine spécifique de la gestation, la *riboflavin carrier protein* (RCP). Cette protéine joue un rôle clé dans le développement de différentes espèces de mammifères et d'oiseaux. L'inhibition de son activité, par l'intermédiaire d'anticorps, représente une méthode efficace de contraception. Actuellement, des immunisations avec différents peptides, correspondants à différents épitopes de la RCP, ont été testés avec succès chez la ratte (Subramania *et al.*, 2000). Chez le singe, la RCP a une localisation uniquement sur des embryons et des ovocytes à des stades précoces.

D'autre part, la RCP est également produite dans le testicule. Elle est localisée en surface du spermatozoïde. Une immunisation active de rats et de singes mâles avec de la RCP dénaturée a diminué la fertilité en diminuant la capacité des spermatozoïdes à féconder, ce qui démontre que les vaccins anti-RCP peuvent être efficaces chez les deux sexes (Adiga *et al.*, 1997).

#### 2.1.3.9 : Antigènes spermatiques

Cette stratégie ciblant les antigènes spermatiques est celle que nous avons employée. Elle est présentée en détails plus bas.

#### 2.2.1.4/ Pourquoi choisir un vaccin dirigé contre les spermatozoïdes ?

L'objectif de ce travail est la mise au point d'un vaccin efficace chez les deux sexes, sans effet sur le comportement des renards, et utilisable par voie orale.

Différentes stratégies sont envisageables. Malgré leur efficacité, les stratégies visant les hormones (mélatonine, GnRH, LH/FSH) n'ont pas été retenues, en raison d'un manque de spécificité d'espèce, du risque de modification du comportement, et du fait qu'elles ne sont actuellement pas utilisables par voie orale (Tuytens et Macdonald, 1998). De même, la stratégie ciblant la RCP n'est pas spécifique d'espèce, et les stratégies ciblant les antigènes ovocytaires ou du plasma séminal ne sont potentiellement efficaces que dans un seul sexe. L'utilisation des protéines de la ZP porcine a également été envisagée, mais ces stratégies, bien qu'efficaces pour de nombreuses espèces (dans un seul sexe également), ne sont actuellement pas spécifiques. D'autre part, ce type de vaccin dirigé contre les protéines de la ZP ne sont aujourd'hui efficaces que par injection. Enfin, ces vaccins n'ont jamais prouvé leur efficacité sur des carnivores. Par exemple, l'immunisation de chiennes contre la ZP induit une augmentation de la concentration d'oestrogènes et un pro-oestrus prolongé, ce qui présente le risque de différents désordres (Tuytens et Macdonald, 1998).

Le choix s'est donc porté sur les vaccins dirigés contre les spermatozoïdes. Il ne s'agit pas là d'un choix par défaut, mais d'un choix réalisé en fonction des avantages particuliers des antigènes spermatiques, que nous allons présenter dans la partie suivante. L'étude des autres types de stratégie permet de comprendre beaucoup de questions qui sont communes à toutes les stratégies d'immunocontraception, en particulier sur l'aspect immunologique, par exemple sur la façon de produire et de maintenir des titres en anticorps efficaces sur de longues périodes, sur le choix de l'adjuvant et du vecteur, sur la façon de s'assurer de l'efficacité et de la réversibilité de l'infertilité induite, ou sur l'évaluation de l'effet rappel des molécules naturellement présentes (Primakoff, 1994).

### **2.2.2 Immunocontraception dirigée contre les spermatozoïdes**

#### 2.2.2.1 Les anticorps anti-spermatozoïdes

L'antigénicité des spermatozoïdes est prouvée depuis plus 'un siècle. En 1899, Landsteiner et Metchnikoff ont montré que l'injection intra-péritonéale de spermatozoïdes

hétérologues provoque la production d'anticorps. En 1900, Metalnokoff a décrit la formation d'anticorps immobilisant après l'injection de spermatozoïdes homologues chez le cochon d'Inde, puis Adler fut le premier à montrer que les spermatozoïdes autologues pouvaient induire une réponse immunitaire chez l'animal. En 1954, des auto-anticorps furent montrés chez l'homme par Rümke et Wilson, dans le sérum et le plasma séminal de patient infertiles (Meinertz, 1992)

Trois types d'expériences ont permis d'associer la présence de ces anticorps dirigés contre les spermatozoïdes avec des infertilités, chez le mâle comme chez la femelle, montrant la faisabilité de la mise au point d'un vaccin anti-spermatozoïdes.

D'une part, des études ont montré que, chez l'humain, la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes sériques était associée à 2-30% des cas d'infertilité (Naz, 2000). Ces anticorps peuvent se retrouver aussi bien chez l'homme que chez la femme. Leur origine n'est pas toujours expliquée. Elle est parfois associée, chez le mâle à un traumatisme du testicule ou de l'épididyme, à une inflammation locale ou à une infection (par exemple chez le chien, suite à une infection à *Brucella canis*, George et Carmichael, 1984, ou chez le bovin infecté expérimentalement avec *B. ovis*, Paolicchi *et al.*, 2000). Dans certains cas, ils peuvent apparaître suite à une rupture de l'équilibre des mécanismes immunosuppresseurs (Luckas *et al.*, 1998). Cette présence d'anticorps anti-spermatozoïdes (IgG et IgA principalement) a été montrée dans de nombreuses espèces, tant dans le sérum que dans le plasma séminal ou les sécrétions cervicales : homme (Luckas *et al.*, 1998), rat (Flickinger *et al.*, 1997), taureau et porc (Zraly *et al.*, 1998) et récemment chez le renard (Boué *et al.*, 2001).

D'autre part, il a été montré que 70% des hommes vasectomisés produisent des anticorps anti-spermatozoïdes (Naz, 2000), ce qui contribuerait à expliquer le fort taux d'échec des vaso-vasectomies (Naz *et al.*, 1989). La vasectomie induit en effet une réponse immunologique, caractérisée par une augmentation de l'immunité cellulaire et humorale dirigée contre les spermatozoïdes (Flickinger *et al.*, 1995, McDonald 2000). Ces auto-anticorps ont été décrits dans différentes espèces, et ont été utilisés avec succès pour identifier des antigènes spermatiques, tels que la protamine (Samuel *et al.*, 1978), la FA-1 (Naz *et al.*, 1989) et de nombreux autres antigènes (Primakoff *et al.*, 1990, Flickinger *et al.*, 1995, Flickinger *et al.*, 1999).

Enfin, des expériences directes d'immunisation ont été menées avec des spermatozoïdes (Duckworth *et al.*, 1998), des protéines spermatiques (Primakoff *et al.*, 1988), des peptides dérivés de protéines spermatiques (Naz, 2000) ou avec la partie glycosylée de glycoprotéines spermatiques (Diekman *et al.*, 1999). Ces expériences ont permis d'obtenir des anticorps anti-spermatozoïdes chez le mâle et chez la femelle. Ces anticorps peuvent provoquer un échec de la fécondation, tant *in vitro* que *in vivo* (pour revue, Primakoff 1994, Kerr 1995, Diekman et Herr, 1997, Naz 2000).

### 2.2.2.2 Mécanismes d'action

Les anticorps anti-spermatozoïdes peuvent être efficaces chez le mâle comme chez la femelle.

Chez le mâle, peu de modèles animaux existent pour mettre en évidence le site d'action de ces anticorps. Dans les conditions physiologiques normales, les antigènes situés sur le spermatozoïde sont protégés du système immunitaire par la barrière hémato-testiculaire, puis par les barrières hémato-épididymaire et hémato-vas déférent (Pelletier, 1998). Cependant, les données empiriques que nous avons rappelées montrent bien que les anticorps peuvent accéder aux spermatozoïdes, sans doute par le *rete testis* ou par le canal efférent, régions dans lesquelles les jonctions des cellules épithéliales semblent moins bien organisées que celles des cellules de Sertoli (Friberg, 1974 ; Soliman et Olesen 1976 ; Anderson et Alexander, 1983).

Chez la femelle, les perspectives de développement d'un vaccin anti-spermatozoïdes sont encore plus intéressantes. Le nombre de spermatozoïdes dans l'oviducte au moment de la fécondation est de quelques centaines, alors qu'il faudrait atteindre plus de  $10^8$  spermatozoïdes chez le mâle. Développer des titres efficaces d'anticorps anti-spermatozoïdes dans le mucus cervical ou le fluide de l'oviducte semble donc plus facilement réalisable.

Les anticorps anti-spermatozoïdes agissent généralement en se liant à la surface des spermatozoïdes. Les effets de cette liaison peuvent être multiples (Diekman et Herr, 1997) :

- formation d'orchite auto-immune responsable d'épididymite, ce qui conduit à une baisse de la production de spermatozoïdes normaux (Tung *et al.*, 1997),
- agglutination des spermatozoïdes (Castle *et al.*, 1997) ,
- altération des caractéristiques de la mobilité, telle que la VSL et l'ALH (De Almedia *et al.*, 1991), allant jusqu'à l'immobilisation,
- inhibition de la pénétration dans le mucus cervical, en raison notamment de la liaison des fragments Fc des IgA avec des micelles du mucus cervical (Hjort, 1999),
- déclenchement du système du complément provoquant la lyse des spermatozoïdes,
- induction de la phagocytose par les macrophages,
- inhibition de l'interaction gamétique : liaison primaire ou secondaire à la zone pellucide, pénétration de la zone pellucide, liaison et fusion à la membrane ovocytaire (la zone pellucide est en effet perméable aux anticorps, Herr 1996),
- inhibition de la capacitation (Myogo *et al.*, 2001),
- déclenchement (Bohring *et al.*, 2001-a) ou inhibition (Santhanam et Naz, 2001) de la réaction acrosomique
- action sur le développement embryonnaire, notamment sur le transport de l'ovocyte fécondé et sur les premiers clivages (Menge et Naz, 1988).

Il est admis de classer les vaccins dirigés contre les spermatozoïdes comme des vaccins “pré-fécondation”, puisque les mécanismes d'action décrits ont lieu avant la fécondation, ce qui les rend éthiquement acceptables par un plus grand nombre de personnes (Diekman *et al.*, 1999). Ceci est particulièrement important en ce qui concerne des méthodes de contrôle de naissances pour l'humain, mais n'est pas négligeable pour des vaccins vétérinaires.

Il faut aussi noter que la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes ne corrèle pas toujours avec une inhibition de la fonction spermatique ou de la fécondation. En effet, non seulement des anticorps anti-spermatozoïdes peuvent être détectés chez des sujets fertiles, mais aussi il a été établi que certains de ces anticorps augmentent la mobilité des spermatozoïdes et favorisent les interactions ovocyte-spermatozoïdes (Aitken *et al.*, 1988).

#### 2.2.2.3 Propriétés nécessaires des antigènes spermatiques

Les propriétés recherchées pour les antigènes spermatiques peuvent être différentes suivant l'utilisation finale et la voie d'administration (vaccin humain, vaccin utilisable sur le terrain, ...). Les caractéristiques suivantes sont souvent citées (Primakoff, 1994) :

- Spécificité de tissu, afin d'éviter les maladies auto-immunes ;
- Spécificité d'espèce, pour pouvoir être distribué par largage d'appât sur le terrain ;
- Implication dans l'interaction gamétique, pour augmenter l'efficacité ;
- Localisation en surface, pour être accessible pour les anticorps ;
- Antigénicité, pour être efficace ;
- Autres propriétés : stabilité biochimique des antigènes, la facilité à les purifier ou à construire des formes recombinantes.

#### 2.2.2.4 Stratégies utilisées

En fonction des priorités accordées à ces critères, différentes stratégies ont été établies pour identifier et sélectionner les antigènes spermatiques. Ces travaux ont été principalement menés en vue d'une application humaine.

La stratégie utilisée par le groupe du Pr. Naz (Département d'obstétrique, Ohio, USA) consiste à isoler et caractériser les antigènes spermatiques impliqués dans l'interaction gamétique. Deux approches sont suivies. La première consiste à utiliser la technologie des hybridomes pour construire des anticorps monoclonaux spécifiques du spermatozoïde, capables d'inhiber la fécondation. Ces anticorps monoclonaux sont utilisés comme sonde pour isoler et caractériser les antigènes cibles apparentés, et pour cribler une banque d'expression d'ADNc testiculaire contenant ces antigènes. La seconde approche consiste à construire une banque d'expression testiculaire soustraite (ne contenant que les ADNc spécifiques du testicule), et de la cribler avec des protéines de la zone pellucide humaine solubilisées pour sélectionner les clones spécifiques du spermatozoïde se liant à la zone pellucide. Les ADNc sont isolés, sous-clonés, séquencés et exprimés dans un système vecteur-cellules hôtes

approprié, permettant d'isoler les molécules recombinantes qui pourront être utilisées pour un vaccin contraceptif (Naz, 1999). En utilisant ces stratégies, 12 clones ont été sélectionnés, dont 6 sont actuellement caractérisés (par exemple NZ-1, NZ-2, NZ-3, voir tableau 2). Il faut noter que cette stratégie ne permet pas d'identifier des antigènes d'origine épидидymaires, et qui pourraient cependant se révéler d'excellents antigènes contraceptifs. Plusieurs protéines d'origine épидидymaire, telles que la P34H (Boué *et al.*, 1995) ou la FLB1 (Boué *et al.*, 1995) ont en effet des rôles clés dans les processus menant à la fécondation (capacitation, reconnaissance de la zone pellucide, ...). D'autre part, nous avons vu que des antigènes qui ne sont pas impliqués dans l'interaction gamétique peuvent être efficaces.

La stratégie développée par le *Center for Recombinant Gamete Contraceptive Vaccinogens* (Virginie, USA) consiste à identifier directement les antigènes de surface du spermatozoïde. Pour cela, une base de données de protéines de surface du spermatozoïde humain de 8 individus a été créée par électrophorèse en 2 dimensions (Naaby-Hansen et Herr, 1995). Un répertoire consensus de 1 397 protéines colorées à l'argent, avec des points isoélectriques variant entre 4 et 10 a été établi, permettant d'attribuer à chaque protéine des coordonnées, un poids moléculaire, un point isoélectrique et une forme du spot. Un marquage vectoriel des protéines de surface par biotinylation et iodination a permis d'identifier 98 protéines de surface, qui sont doublement marquées (Naaby-Hansen *et al.*, 1997). Pour examiner le potentiel de ces protéines comme antigène contraceptif, les auteurs travaillent au microséquençage des protéines de surface par spectrométrie de masse, avant d'étudier leur spécificité de tissu (Diekman et Herr, 1997 ; Shetty *et al.*, 2001). Il faut noter que cette stratégie, qui est également lourde, n'a pour le moment permis de proposer qu'un seul antigène, le CD52 (Diekman *et al.*, 1999).

Un autre type de stratégies, pratiquée par différentes équipes, consiste à générer des anticorps polyclonaux dirigés contre des protéines de surface du spermatozoïde. Pour cela, des sérums de patients infertiles sont utilisés (pour LDH-C4 par exemple), ainsi que des sérums de patients vasectomisés (par exemple, pour l'identification de la protéine FA-1) et des sérums d'animaux immunisés avec des protéines spermatiques (par exemple pour la protéine SAGA-1, pour revue, Diekman et Herr, 1997). Les modalités d'identification des protéines reconnues ont été plus variées dans ces cas que dans le cas des deux premières stratégies décrites. D'une façon générale, les antigènes reconnus ont été précipités, caractérisés puis identifiés selon la technique d'Edman, par spectrométrie de masse, ou par criblage de banques d'expression d'ADNc. Par exemple, l'antigène humain HSA80 a été identifié par Western blot avec des sérums de patients infertiles. La protéine a été purifiée puis utilisée pour immuniser des lapins, dont les sérums ont permis de localiser l'antigène (par immunofluorescence) et d'en évaluer la spécificité d'organe (par immunohistochimie). Une immunisation active de rats contre cet antigène a provoqué 100% d'infertilité. Enfin, la séquence NH<sub>2</sub>-terminale a été déterminée selon la technique d'Edman (Bandivdekar *et al.*, 2001). Un autre exemple est celui des travaux de Adoyo *et al.*, (1995). Cette équipe, qui cherchait à identifier des protéines bien conservées entre les espèces, a immunisé des lapins

avec la fraction acrosomale de spermatozoïdes de hamster, puis a utilisé les antisérums pour cribler une banque de testicule humain, ce qui leur a permis de retrouver la protéine LDH-C4. Dans le soucis d'obtenir des antigènes membranaires, différentes stratégies ont pu être utilisées, comme l'absorption-élution des anticorps sur le spermatozoïde avant leur utilisation pour des études de Western blot (Auer *et al.*, 1997), ou l'enrichissement par centrifugation de la proportion de protéines membranaires parmi les protéines utilisées pour des études en Western blot menées avec des sérums de patients infertiles (Bohring *et al.*, 2001-b).

Des anticorps monoclonaux ont également été utilisés, ce qui a permis la sélection des anticorps se liant à l'acrosome, puis de ceux inhibant la liaison des spermatozoïdes à l'ovocyte. Les antigènes SOB2 et SOB3 ont été identifiés ainsi (Lefèvre *et al.*, 1997, Levèvre *et al.*, 1999).

#### 2.2.2.5 Principaux antigènes étudiés

Les différentes stratégies utilisées ont permis l'identification d'antigènes dont l'intérêt contraceptif est plus ou moins bien précisé. Le tableau 2 récapitule quelques-uns des principaux antigènes spermatiques proposés.

Cependant, les résultats obtenus avec certains de ces antigènes se sont révélés décevants *in vivo*. Ceci pourrait être dû au fait qu'il n'existe pas toujours de corrélation entre le taux d'anticorps sérique et les effets inhibiteurs de la fécondation (Frayne et Hall, 1999). Une autre explication serait qu'il n'y aurait pas de relation directe entre le taux d'anticorps sérique et celui dans les sécrétions au niveau du tractus génital (Kerr, 1995), et que les immunisations par voie systémique ne peuvent pas toujours induire une réponse antigénique suffisante au niveau du tractus génital. D'autre part, la neutralisation d'un seul antigène gamétique pourrait ne pas être suffisante pour provoquer un effet contraceptif, rendant nécessaire l'association de différents antigènes pour stimuler le système immunitaire (Diekman et Herr, 1997 ; Bradley *et al.*, 2001).

**Tableau 2** : Récapitulatif des principaux antigènes spermatiques proposés pour un vaccin immunocontraceptif.

Antigène	Espèce étudiée	PM/PI	Autres espèces	Rôle	Effet des anticorps dirigés contre ces antigènes	Observation	Référence
1F10	porc	68/70 kDa PI 3,5	homme	Liaison à zone pellucide	Inhibe la fécondation <i>in vitro</i>		Mollova <i>et al.</i> , 1999
80HSA	homme	80 kDa	lapin		Immunisation active provoque 100% d'infertilité <i>in vivo</i>	Localisé sur acrosome Spécifique du testicule et de l'épididyme	Bandivdekar <i>et al.</i> , 2001
CS-1	homme	33 kDa	souris	Clivages du zygote	Inhibition des premiers clivages du zygote	Présent dans le sérum de patients infertiles	Naz, 1999
DE	rat			Fusion à ovocyte	Effet <i>in vitro</i> sur fusion à ovocyte	Pas d'effet sur la mobilité, la viabilité, la capacitation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes	Ellerman <i>et al.</i> 1998
FA-1	homme/souris	Monomère : 23 kDa Dimère : 51 kDa	lapin, taureau, singe	Liaison à ZP3 Capacitation Réaction acrosomique	Inhibe de façon réversible la fécondation <i>in vitro</i> (souris) et la fécondation <i>in vivo</i> (lapin)	Présent dans sérums de patients infertiles et d'hommes vasectomisés	Zhu et Naz, 1997
LDH-C4	homme souris		primates renard	Métabolisme lactate	Agglutination Cytotoxicité pour les spermatozoïdes Inhibition de 75% de la fertilité chez primates immunisés	Pas d'action connue dans l'interaction gamétique ; Localisation dans cytoplasme et extracellulaire Spécifique du testicule	Primakoff, 1994
NZ1	souris	14-18 kDa	homme	Liaison à zone pellucide	Inhibition <i>in vitro</i> de la liaison à la zone pellucide	Phosphorilée Spécifique d'organe (interrogation Genebank)	Naz, 1999

Antigène	Espèce étudiée	PM/PI	Autres espèces	Rôle	Effet des anticorps dirigés contre ces antigènes	Observation	Référence
NZ2	Homme	20 kDa			Inhibition <i>in vitro</i> de la liaison à la zone pellucide	Spécifique d'organe (interrogation Genebank)	Zhu et Naz, 1998
NZ3	Homme	63 kDa			Inhibe la réaction acrosomique et la capacitation	Localisé sur l'acrosome et le flagelle	Naz et Zhu, 2001
P26h	Hamster	26 kDa	souris, taureau, chien...	Liaison à la zone pellucide	Effet <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Lié aux protasomes épидидymaires	Bérudé et Sullivan, 1994
Peptide YLP12	Homme	Composant d'une protéine de 72 kDa		Liaison à la zone pellucide ?		Spécifique du testicule présent dans sérum de patients infertiles	Naz et al., 2000
PH-20	Cochon d'Inde	64 kDa	souris, rat, hamster, lapin, homme, renard	Hyaluronidase Liaison à ZP3	Inhibe <i>in vivo</i> la fécondation après immunisation de mâle et de femelle ; effet réversible Formes recombinantes étudiées	Présent dans sérums de patients infertiles	Primakoff <i>et al.</i> , 1987 Primakoff <i>et al.</i> , 1997
PH-30 (fertiline $\alpha/\beta$ )	Cochon d'Inde	18-34 kDa	babouin homme	Fusion	Anticorps monoclonaux bloquent la pénétration et inhibent <i>in vivo</i> la fécondation après immunisation de mâle et de femelle		Diekman et Herr, 1997
RSMP-b YWK	Homme		souris		YWK inhibe la fécondation et arrête la croissance du zygote SMB immobilise les spermatozoïdes, inhibe la fécondation mais pas la croissance des zygotes	SMP présent dans le sérums de femmes infertiles	Kamada <i>et al.</i> , 1999 Takikawa <i>et al.</i> , 2001

Antigène	Espèce étudiée	PM/PI	Autres espèces	Rôle	Effet des anticorps dirigés contre ces antigènes	Observation	Référence
SAGA-1 CD52 S19 H6-3C4	Homme	15-25 kDa (PI : 2,5-3)	souris	Liaison à zone pellucide ?	Agglutination Cytotoxicité pour les spermatozoïdes Inhibe : pénétration du mucus cervical, liaison à ZP, fécondation <i>in vitro</i> (souris)	Présent dans le sérum de patients infertiles Origine épидидymaire	Diekman <i>et al.</i> , 1999
SOB2	homme	17,5 kDa (PI : 6,2)		Fusion ovocyte	Effet <i>in vitro</i> sur la liaison à l'ovocyte	Pas d'effet sur la mobilité	Lefèvre <i>et al.</i> , 1997
SP-10	homme	18-34 kDa	babouin	Liaison secondaire à zone pellucide	Inhibe fécondation <i>in vitro</i>	A l'intérieur acrosome Spécifique du testicule mais pas d'espèce Etudes en cours avec forme recombinante	Diekman et Herr, 1997
Sp-17	lapin	17 kDa	homme, souris	Liaison à Zone pellucide	Infertilité réversible et souche-spécifique chez la souris	Fait partie de la famille des RSA Spécifique du tissu	Lea <i>et al.</i> , 1998-a
Sp56	souris	56 kDa		Liaison à zone pellucide	Effet <i>in vivo</i> chez la femelle	Localisé sur l'acrosome, spécifique d'espèce et de tissu	Hardy et Mobbs, 1999
TSA-1	homme	17,4 kDa			Inhibition dose-dépendante de la réaction acrosomique	Spécifique du testicule	Santhanam et Naz, 2001

### 2.2.2.6 Antigènes étudiés chez le renard

Deux approches ont été adoptées pour l'identification de protéines spermatiques de renard utilisables comme antigène pour un vaccin contraceptif (Bradley, 1994).

La première approche consiste à identifier chez le renard des protéines spermatiques déjà caractérisées dans d'autres espèces, en utilisant les séquences d'ADN connues comme sonde pour cribler une banque d'ADN de testicule de renard. Les protéines LDH-C4, PH-20 et PH-30 ont ainsi été identifiées. Une immunisation avec un peptide correspondant à l'épitope antigénique de la LDH-C4, utilisé chez le babouin par O'Hern *et al.*, (1995), a réduit la fertilité de renardes de 53% par rapport à un groupe témoin (Bradley *et al.*, 1997). Cependant, ce résultat pose des problèmes de répétabilité (Bradley *et al.*, 1999). L'homologue vulpin de PH-20 a également été testé en tant que vaccin contraceptif mais les résultats ont été décevants, sans doute en raison d'un problème d'immunogénicité (Xu, 1998). De plus, cette protéine est très conservée entre les espèces (ten Have *et al.*, 1998).

La seconde approche consistait à identifier des protéines inconnues en produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les spermatozoïdes de renard. Cette stratégie a permis de séquencer la fSP-10, l'homologue vulpin de la protéine spermatique humaine SP-10 (Beaton *et al.*, 1995). Des essais de contraception avec cette protéine ont montré qu'elle ne peut pas être utilisée comme antigène pour un vaccin contraceptif chez le renard, en raison notamment de sa faible antigénicité qui n'a pas pu être compensée par le choix d'un vecteur approprié (de Jersey *et al.*, 1999). L'ADNc d'une autre protéine spermatique de renard, nommée FSA-1, a également été isolé et caractérisé (Beaton *et al.* 1994). Cependant, l'anticorps monoclonal dirigé contre cette antigène donne une réaction croisée avec des spermatozoïdes de chiens, chats, lapins, souris et d'hommes. De plus, il n'est pas spécifique du spermatozoïde (il présente 86% d'homologie avec un ADNc de cerveau fœtal), et n'a pas d'effet sur la fertilité des renards (Beaton *et al.*, 1994). Il ne peut donc pas être utilisé comme antigène pour un vaccin contraceptif.

Les travaux menés pour l'identification et la caractérisation d'antigènes spermatiques de renard n'ont pas encore permis d'obtenir un antigène efficace. Les protéines spermatiques comme la LDH-C4, la SP-10, la PH-20 et la PH-30 ayant un potentiel immunocontraceptif ne sont pas spécifiques d'espèce, et la recherche d'épitopes spécifiques du renard s'est révélée infructueuse (Xu, 1998 ; Bradley *et al.*, 1999). De plus, des immunisations avec des protéines recombinantes contenant des épitopes communs avec d'autres espèces (LDH-C4) ou avec les protéines entières (LDH-C4, SP-10, PH-20) n'ont pas eu d'effets aussi intéressants que dans d'autres espèces (Bradley *et al.*, 1997 ; Xu, 1998 ; Bradley *et al.*, 1999).

Selon l'équipe australienne ayant identifiée ces antigènes chez le renard, il est nécessaire de ré-évaluer les approches utilisées pour l'identification des antigènes spermatiques (Bradley *et al.*, 1999). Il n'existe actuellement pas d'antigène spermatique utilisable chez le renard.

## **2.3 Objectifs de ce travail**

L'objectif de ce travail est d'identifier des antigènes spermatiques utilisables pour un vaccin contraceptif du renard. Les travaux préalables à cette thèse comprenaient le choix de la stratégie et la production de sérums reconnaissant des antigènes spermatiques.

La démarche que nous avons suivie consistait dans un premier temps à identifier et à sélectionner les antigènes spermatiques, en utilisant 3 types de sérums : des sérums de lapins et de renards immunisés avec des protéines spermatiques, et des sérums de renards vasectomisés. Nous avons ensuite cherché la séquence de ces protéines, en réalisant leur microséquencage NH<sub>2</sub>-terminal, puis en utilisant ces séquences pour amplifier par PCR un fragment de l'ADNc codant ces protéines. Deux de ces fragments ont été utilisés pour cribler une banque d'ADNc de testicule de renard que nous avons réalisée. Enfin, nous avons caractérisé certains antigènes sélectionnés, d'un point de vue biochimique en étudiant les glycosylations, et d'un point de vue biologique en utilisant un antisérum spécifique de certaines de ces protéines pour évaluer différentes propriétés de ces antigènes.

---

## **3. Matériels et méthodes**

## 3.1 : Conventions d'écriture

Sauf indication contraire, les réactifs et les anticorps sont fournis par Sigma.

Le nom des solutions est en italique. Les solutions commerciales dont la composition n'est pas connue sont signalées par une étoile (par exemple : *solution de lavage\**). Sauf indication contraire, les pourcentages sont donnés volume à volume.

Les abréviations utilisées sont récapitulées dans la liste des abréviations.

## 3.2 : Sélection des antigènes

### 3.2.1 Principe

Dans un premier temps, nous avons produit des sérums reconnaissant des antigènes spermatiques de renard, en immunisant des lapins et des renards avec des protéines extraites de spermatozoïdes de renards, et en étudiant la réponse humorale anti-spermatozoïdes de renards vasectomisés. Nous avons vérifié si ces sérums reconnaissaient des protéines de surface et établi par Western blot le catalogue des antigènes reconnus.

Après avoir cherché parmi les antigènes spermatiques ceux qui sont reconnus le plus fréquemment par les sérums produits, nous avons déterminé sur un gel d'électrophorèse en deux dimensions (2D) les aires les contenant. Enfin, nous avons testé par Western blot chacune des protéines contenues dans deux de ces aires pour identifier les plus antigéniques.

### 3.2.2 Production de sérums polyclonaux anti-spermatozoïdes

#### 3.2.2.1 Animaux

Pour la récolte de spermatozoïdes, une centaine de renards sauvages, tuée pour le suivi de la vaccination orale, est utilisée.

Pour les protocoles d'immunisation de renards, 6 renards (*Vulpes vulpes*) adultes sont utilisés. Ces animaux (3 femelles, 3 mâles) proviennent de la Norwegian Fur Breeders Association (Eidsvoll, Norvège). Ils sont logés individuellement dans des cages extérieures, en accord avec les directives vétérinaires. Ces animaux sont nourris avec une ration quotidienne de 120 g de nourriture pour chiens (27 g protéines, 16 g lipides, 37 g de glucides pour 100 g de nourriture) et ont de l'eau *ad libitum*.

Pour les expériences de vasectomie, 6 renards mâles âgés de 2 ans sont utilisés. Ils proviennent du même fournisseur, et sont élevés comme décrit précédemment.

Pour la production d'anticorps polyclonaux anti-spermatozoïde, 3 lapines adultes New-Zealand (Elevage scientifiques des Dombes, France) sont utilisées.

Ces animaux sont élevés en accord avec les recommandations du *Conseil Canadien de Protection des Animaux*.

### 3.2.2.2 Extraction de protéines spermatiques

#### 3.2.2.2.1 : Récolte des spermatozoïdes épидидymaires de renards

Les spermatozoïdes sont collectés pendant la saison d'activité testiculaire (de janvier à mars), par perfusion rétrograde de la queue de l'épididyme de renards sauvages. Après dissection du testicule, l'épididyme est isolé, et une incision est effectuée dans la queue de l'épididyme. Une perfusion est alors réalisée par le canal déférent avec 1 mL de *PBS* (140,0 mM chlorure de sodium ; 6,7 mM chlorure de potassium; 1,4 mM phosphate de potassium ; 6,7 mM phosphate de sodium ; 1,0 mM chlorure de magnésium ; pH 7,3). Le fluide épидидymaire contenant les spermatozoïdes est collecté. Une goutte est déposée sur une lame afin de vérifier au microscope la qualité des spermatozoïdes. Si celle-ci est satisfaisante (nombre, mobilité, faible présence d'autres cellules), un lavage est effectué avec du *PBS* par centrifugation 5 min à 2 000 g. Pendant ce temps, une numération est réalisée à l'aide d'une cellule de Malassez.

Les spermatozoïdes sont dilués dans un volume donné de *PBS*, afin de pouvoir réaliser des aliquots de  $10^8$  spermatozoïdes, qui sont centrifugés 5 min à 14 000 g. Certains culots sont congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , ils seront utilisés pour l'extraction des protéines servant aux Western blots. D'autres sont directement utilisés pour l'extraction des protéines servant à immuniser les animaux, ou sont repris dans un faible volume de *PBS* et fixés pour l'immunofluorescence et pour les études en microscopie électronique.

#### 3.2.2.2.2 : Extraction des protéines

Pour les protocoles d'immunisation, les protéines spermatiques sont extraites avec 100  $\mu\text{L}$  de l'une de ces solutions à partir de spermatozoïdes frais (non congelés) lavés :

- solution A : 0,1% triton X100,
- solution B : 30 mM n-octyl glucoside,
- solution C : 0,05 % igepal,

et pour chaque solution (A, B et C) nous avons ajouté : 0,15 mM aprotinine, 0,2 mM PMSF et 0,1 mM benzamidine.

Après agitation 5 min sur une roue, les échantillons sont centrifugés 5 min à 14 000 g, et le surnageant contenant les protéines est récupéré.

Pour les électrophorèses en une ou deux dimensions, 200  $\mu\text{L}$  de *tampon échantillon* (10% glycérol ; 6,25 mM tris-HCl pH 6,8 ; 2% (p/v) SDS ; 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol ; 0,005% bleu de bromophénol) ou de *tampon 2D* (9,5 M urée ; 2% igepal ; 2% ampholines 3,5-9,5 (Pharmacia) ; 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol ; 0,005% bleu de bromophénol) sont ajoutés aux aliquots contenant  $10^8$  spermatozoïdes. Après agitation 5 min sur une roue, les échantillons sont centrifugés 5 min à 14 000 g et les surnageants contenant les protéines sont récupérés et

regroupés. Ils sont ensuite chauffés 5 min à 95°C pour l'électrophorèse en 1 dimension, ou 1h à 37°C pour l'électrophorèse en 2 dimensions.

#### 3.2.2.2.3 : Dosage des protéines

Ce dosage est réalisé en microplaque avec une méthode commerciale insensible à la présence de détergent (D<sub>C</sub> Protein Assay, BioRad), dont le principe est adapté de la méthode de Lowry *et al.* (1951). Trente-deux µL d'un *inhibiteur\** de l'effet de détergents sont ajoutés à 1,6 mL d'une *solution de cuivre\**, et 25 µL de cette préparation sont ajoutés dans les puits contenant 15 µL des échantillons à quantifier, purs ou dilués dans du *PBS*. Deux cents µL du *réactif de Folin\** dilué sont alors ajoutés à chaque puit, et après 15 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 690 nm. La gamme étalon est établie par dilution de BSA (fraction V) dans la solution détergent utilisée pour les protéines à doser. Chaque échantillon est testé en triple.

#### 3.2.2.3 Immunisation de lapins

Deux cent µg de protéines extraites avec les *solutions A, B ou C* sont émulsifiés séparément avec de l'adjuvant complet de Freund et injectés par voie sous-cutanée à 3 lapines (dénommées respectivement L1 à L3). Après 3 semaines, une injection de la même préparation protéique émulsifiée dans de l'adjuvant incomplet de Freund est réalisée. Les sérums sont collectés au 42<sup>ème</sup> jour.

#### 3.2.2.4 Immunisation de renards

Trois cent µg de protéines extraites avec les *solutions A, B ou C*, sont émulsifiés séparément avec de l'adjuvant complet de Freund et injectés par voie sous-cutanée à 3 renards mâles (nommés respectivement R1, R3, R5) et à 3 femelles (nommés R2, R4, R6), au début de la saison de reproduction (en janvier). Deux rappels avec la même préparation protéique, émulsifiée dans de l'adjuvant incomplet de Freund, sont réalisés à 1 mois d'intervalle. Les sérums sont collectés à J0, J60, J75, J90 et J120.

#### 3.2.2.5 Vasectomie de renards

Six renards adultes, nommés R27 à R32, sont vasectomisés bilatéralement à travers une incision inguinale, sous anesthésie réalisée avec un mélange d'acépromazine (0,2 mg/kg) – kétamine (15 mg/kg). Les vas déférents sont ligaturés en 2 sites séparés de 5 mm avec un fil de Prolène (Polypropylène, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France), et puis coupés aux ciseaux. L'ouverture est refermée en utilisant du fil résorbable en Vicryl (Polyglactine, Ethicon). Les sérums sont prélevés le jour de l'opération (J0), et à intervalle de 30 jours pendant 150 jours. Pour le renard R28, le sérum est également récolté 2 ans plus tard, pendant la saison de reproduction, toutes les semaines.

### ***3.2.3 Sélection des sérums de renards reconnaissant des antigènes situés en surface des spermatozoïdes***

#### ***3.2.3.1 Récolte de spermatozoïdes éjaculés de renards***

Des spermatozoïdes de renards sont obtenus par manipulation digitale d'animaux sélectionnés, qui sont habitués à ce type de prélèvement. La qualité des spermatozoïdes est vérifiée au microscope.

#### ***3.2.3.2 Fixation des spermatozoïdes pour l'immunofluorescence***

Les spermatozoïdes éjaculés sont lavés dans du *PBS -1% BSA (fraction V)* (3 mL pour 1 mL d'éjaculat, centrifugation 8 min à 6000 g). Ils sont ensuite remis en suspension dans 500 µL de *PBS* et étalés sur des lames. Les frottis sont séchés à l'air, puis fixés 5 min avec du méthanol conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les lames sont enveloppées dans du papier absorbant et du papier aluminium, et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### ***3.2.3.3 Immunolocalisation des protéines en FITC***

Les lames sont saturées 40 min sous atmosphère humide avec du *PBS-BSA*, avant d'être incubées 1 h avec les sérums des renards immunisés R1 à R6 prélevés à J90 et des renards vasectomisés (R27 à R32, prélevés à J0 et J120) dilués au 1/500 dans du *PBS-BSA*. Après 3 lavages de 5 min dans du *PBS*, elles sont incubées 1 h avec un anticorps de lapin anti-IgG de chien (Tebu) dilué au 1/500, lavées 3 fois au *PBS*, et finalement incubées 1 h dans l'obscurité avec un anticorps de chèvre anti-lapin marqué au FITC (Sigma), dilué à 1/80.

Après 3 lavages dans le *PBS*, les lames sont montées dans une solution de *Glycérol-PBS* (1 :1), avec une lamelle, et observées au grossissement x400 à l'aide d'un microscope à fluorescence (Olympus Optical CO, Hambourg, Allemagne). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra numérique (DP50, Olympus).

### ***3.2.4 Identification des antigènes par Western blot***

#### ***3.2.4.1 Préparation des antigènes***

Les protéines spermatiques sont préparées comme décrit dans la section 3.2.2.2.

#### ***3.2.4.2 Séparation des protéines par SDS-PAGE***

##### ***3.2.4.2.1 Préparation des gels***

Les électrophorèses sont réalisées dans des conditions réductrices d'après la méthode de Laemmli (1970). Les gels, de teneur variable en acrylamide (10 à 15%) sont coulés entre deux plaques de verre séparées de 1 mm, et sont montés dans une cuve Protean™ II (BioRad).

Pour la réalisation des gels, les réactifs suivants sont mélangés dans l'ordre du tableau 3.

**Tableau 3 :** Composition des gels de concentration et de séparation utilisés pour la séparation des gels en SDS-PAGE, volumes utilisés pour 2 gels à 13,5% d'acrylamide.

	Gel de séparation (13,5%)	Gel de concentration (4%)
acrylamide/bis 37,5:1, 30%	27 mL	6,8 mL
eau distillée	16,8 mL	1,7 mL
tris-HCl 1,5 M pH=8,8	15 mL	-
tris-HCl 1,0 M, pH=6.8	-	1,25 mL
	dégazage sous vide	
SDS 10%	0,6 mL	0,1 mL
ammonium persulfate 10%	0,6 mL	0,1 mL
TEMED	0,024 mL	0,01 mL
Volume final	60 mL	10 mL

#### 3.2.4.2.2 Electrophorèse

Les gels polymérisés sont placés dans la cuve à électrophorèse contenant le *tampon de migration* (25 mM trizabase; 192 mM glycine). Les échantillons (10 µL d'antigènes spermatiques ou d'extraits de différents organes de renard) sont dilués dans le *tampon échantillon*, chauffés 5 min à 95°C puis déposés dans les puits des gels. Un marqueur de poids moléculaire est déposé dans un puits. La migration est réalisée à courant constant de 30 mA par plaque pour les grands gels, et à voltage constant pour les minigels (15 min à 80V, 1h15 à 130V) ; à une température constante de 14°C. Lorsque le front de migration arrive près du bas du gel (environ 4 h pour les grands gels), la migration est stoppée et les gels sont délicatement décollés des plaques. Ils sont alors colorés (section 3.2.4.4) ou utilisés pour un Western blot (section 3.2.4.5).

#### 3.2.4.2.3 Séparation sur gels Tris-Tricine

Afin de séparer les protéines de faible masse moléculaire, certaines électrophorèses sont réalisées à l'aide de gels tris-tricine (gel de séparation à 16,5%, gel de concentration à 4%). Dans ce cas, le protocole expérimental est le même que celui décrit plus haut, mais le gel, le *tampon de migration* (100 mM tris ; 100 mM tricine ; 0,1% (p/v) SDS ; pH 8,3) le *tampon échantillon* (200 mM tris-HCl pH 6,8; 40% glycérol ; 2% (p/v) SDS; 0,04% bleu de Coomassie G-250) et le marqueur de poids moléculaire sont préparés par le fournisseur (BioRad).

#### 3.2.4.3 Méthode de séparation des protéines en double dimension

Les électrophorèses en double dimension sont réalisées selon la méthode décrite par O'Farrell (1975).

##### 3.2.4.3.1 Gel de première dimension : IsoElectroFocusing

Le première dimension (IEF) est réalisée dans des tubes en verre de 1 mm de diamètre interne. Les tubes sont remplis par capillarité sur 12 cm par le *gel IEF* (11g urée ;

2,66 mL acrylamide/bis 17,5:1 ; 4 mL igepal 10% ; 1,5 mL ampholines 3,5-9,5 ; 20 µL persulfate d'ammonium 10% ; 14 µL TEMED ; dans un volume final de 12 mL), et laissés à polymériser 2h.

Après polymérisation, les gels sont placés en pré-migration, avec le *tampon cathodique 0,02M soude*, et le *tampon anodique 0,01 M acide phosphorique*. Chaque gel IEF est recouvert de 10 µL de *tampon 2D* et de 10 µL de *tampon 4M urée*. Les gels sont soumis à un voltage de 200 V pendant 15 min, puis 30 min à 300 V et 30 min à 400 V, à 20°C. Ceci permet d'établir un gradient de pH dans les gels.

La pré-migration terminée, le haut des tubes est rincé 2 fois avec de l'eau distillée, et les protéines spermatiques sont déposées, à raison de 75 µL de préparation spermatique par gel. Les échantillons sont recouverts de 10 µL de *tampon urée*, et une nouvelle préparation de *soude* dégazée est déposée sur la partie supérieure de la cuve. La migration a lieu à courant constant de 400 V pendant 16h, puis 1h à 800 V, à 4°C.

Les boudins IEF sont démoulés par pression à l'aide d'une seringue et équilibrés 30 min dans le *tampon d'équilibration* (10% glycérol ; 5% β-mercaptoéthanol ; 2,3% SDS ; 6,25 mM tris-HCl pH6,8). Ils sont utilisés immédiatement ou après congélation à -20°C. Afin de connaître le gradient de pH, deux boudins IEF ne sont pas équilibrés, mais sont découpés en fragments de 5 mm qui sont mis dans de l'eau distillée dégazée. Après passage 10 min dans un bain à ultra-sons, le pH de chaque fragment est mesuré.

#### 3.2.4.3.2 Gel de deuxième dimension

Les gels sont préparés selon la méthode décrite pour les électrophorèses SDS-PAGE en simple dimension. Les boudins sont décongelés à température ambiante et déposés sur les gels de concentration, puis soudés avec de l'*agarose 1%* (p/v) liquéfié par chauffage. L'électrophorèse est réalisée comme décrit dans la section 3.2.4.2.2.

#### 3.2.4.4 Coloration des gels

Les colorations sont réalisées à température ambiante sous agitation.

##### 3.2.4.4.1 Au bleu de Coomassie

Cette technique est dérivée de celle décrite par Wu et Welsh (1996). Les gels sont d'abord fixés 1h dans la *solution de décoloration* (10% acide acétique ; 40% méthanol), puis colorés 1h dans la *solution de coloration* (0,2% (p/v) bleu de Coomassie R-250 ; 10% acide acétique ; 40% méthanol) filtrée, avant d'être décolorés au moins 2h dans la *solution de décoloration*.

##### 3.2.4.4.2 Au nitrate d'argent

Cette technique est dérivée de celle décrite par Morrissey (1981). Après fixation au moins 2h dans la *solution de fixation* (50% méthanol ; 12% acide acétique ; 0,5 % formaldéhyde), les gels sont réhydratés 2 fois 20 min dans une solution à 50% d'éthanol, puis une fois 20 min dans une solution à 30% d'éthanol. Ils sont ensuite lavés 1 min avec la

*solution de prétraitement* (0,2% p/v thiosulfate de sodium), rincés 2 fois 20 sec à l'eau distillée, et incubés 20 min dans la *solution d'argent* (0,2% p/v nitrate d'argent; 0,75% formaldéhyde). Après 2 rinçages de 20 sec à l'eau distillée, les gels sont incubés dans la *solution de développement* (6% p/v carbonate de sodium ; 2% solution de prétraitement ; 0,5 % formaldéhyde) jusqu'à ce que la coloration soit satisfaisante (environ 10 min). A ce moment, la réaction est stoppée à l'acide acétique.

#### 3.2.4.4.3 Séchage des gels

Après une incubation de 15 min dans le *tampon de séchage* (2% glycérol ; 20% éthanol), les gels sont étalés entre 2 feuilles de cellophane humidifiées, et séchés verticalement pendant au moins 24h.

#### 3.2.4.5 Western blot

##### 3.2.4.5.1 Transfert

Le transfert est réalisé selon le protocole décrit par Towbin *et al.*, (1979). Après la migration, le gel est équilibré dans le *tampon de transfert* (20% méthanol ; 192 mM glycine; 25 mM tris) 2 fois 15 min. Dans le même temps, une membrane de nitrocellulose (BioRad) le papier Wattman ainsi que le papier fibre sont humidifiés dans ce même tampon. Le transfert des protéines du gel sur la membrane se fait dans un champ électrique, de l'anode vers la cathode. Le courant est maintenu constant à 0,45 A pendant 2h, à 4°C sous agitation pour les grands gels, et à 100 V pendant 1h pour les petits gels.

Pour vérifier la qualité du transfert, la membrane peut être colorée au rouge Ponceau par incubation 5 min dans le rouge Ponceau S (0,2% (p/v) dans une solution de 30% acide trichloroacétique ; 30% acide sulfoalicylique), puis rinçage à l'eau distillée.

##### 3.2.4.5.2 Western blotting

Le Western blot est réalisé à température ambiante et sous agitation. Après le transfert, la membrane est saturée pendant 1 h dans une solution de *PBS-5% (p/v) lait écrémé*. La membrane est ensuite rincée dans le *PBS*, et incubée toute la nuit (16h) avec l'anticorps primaire dilué dans du *PBS*.

Dans le cas où l'anticorps primaire provient des sérums de renards (sections 3.2.2.4 et 3.2.2.5), ceux-ci sont utilisés au 1/1 000. Après 3 lavages de 5 min dans le *PBS - 0,05% tween20* les membranes sont incubées 1 h avec un anticorps anti-IgG de chien produit chez le lapin (Tebu) dilué au 1/1000. Puis, après 3 lavages dans le *PBS-tween*, les membranes sont incubées 1 h avec un anticorps de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase (dilution : 1/30 000), avant d'être lavées 3 fois dans du *PBS-tween* et révélées au DAB ou en chimiluminescence.

Dans le cas où l'anticorps primaire provient d'un sérum de lapin à 1/1 000 (section 3.2.2.3), la membrane, après 3 lavages dans le *PBS-Tween*, est incubée 1 h avec un anticorps

de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase dilué au 1/30 000 puis, après 3 nouveaux lavages dans le *PBS-Tween*, les complexes sont révélés au DAB ou en chimiluminescence.

Enfin, dans le cas où nous utilisons comme anticorps primaire un sérum de souris dilué à 1/1000 (section 3.4.3.1.2), la membrane, après 3 lavages dans le *PBS-Tween*, est incubée 1 h avec un anticorps de chèvre anti-souris marqué à la peroxydase (dilution : 1/10 000), lavée 3 fois au PBS-Tween, et les complexes sont révélés au DAB ou en chimiluminescence.

### 3.2.4.5.3 Révélation

#### *3.2.4.5.3.1 Au DAB*

La membrane est révélée dans un bain de chromogène (*solution de DAB* : 0,7 % (p/v) de 3 3' diaminobenzidine ; 0,7 % de peroxyde d'hydrogène 30%) jusqu'à ce que le contraste soit satisfaisant. Elle est ensuite lavée à l'eau distillée et séchée à l'air, tandis que la solution de DAB est neutralisée à l'eau de Javel et éliminée.

#### *3.2.4.5.3.2 En chimiluminescence*

Pour la révélation par chimiluminescence, nous utilisons un kit commercial (Pierce) dont le principe est celui décrit par Walter *et al* (1995), en suivant les recommandations du fabricant. Après un rinçage dans le *PBS*, la membrane est recouverte pendant 5 min d'un mélange (1 :1) du substrat de la peroxydase, et de l'amplificateur du signal lumineux. La membrane recouverte d'un film plastique est ensuite mise en contact avec un film photo (Kodak BioMax) pendant un temps pouvant varier de 5 secondes à 15 min suivant l'intensité du signal. Le film est révélé après une incubation de 5 min dans une solution de développement et 10 min dans une solution de fixation photo.

## **3.3 : Détermination de la séquence des ADNc codant les antigènes sélectionnés**

### *3.3.1 Principe*

Nous avons établi la séquence NH<sub>2</sub>-terminale de 6 des 7 protéines sélectionnées. Pour cela, nous avons purifié par électrophorèse en 2 dimensions les protéines sélectionnées, puis nous avons fait réaliser leur microséquençage selon la technique d'Edman par le Service Commun de Séquençage des Protéines de l'Université Henri Poincaré. Nous nous sommes appuyés sur les séquences obtenues pour interroger les banques de données existantes et pour réaliser l'amplification par PCR d'un fragment de l'ADN codant ces protéines. Ces fragments ont été clonés et séquencés, et l'analyse des séquences a été réalisée. Deux fragments ainsi produits ont servi de sonde pour le criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard que nous avons réalisée.

Une banque d'ADNc regroupe les informations codées par les ARNm d'un tissu particulier. Les ARN étant très fragiles de nature, ils sont convertis en ADN double brin, plus stable, qui est inséré dans un vecteur phagique lambda auto-répliquant. Les clones sont ensuite criblés par Southern blot, en utilisant comme sonde les inserts des fragments de PCR clonés. Les clones positifs sont sous-clonés puis séquencés.

### ***3.3.2 Séquençage NH<sub>2</sub>-terminal***

#### ***3.3.2.1 Préparation des protéines***

Vingt spots de chacune des protéines sélectionnées P3, P4, P5, P7, P8 et P13, correspondant à un minimum de 4 à 10 µg de protéines, sont purifiés par électrophorèse en 2 dimensions. Les spots sont découpés, puis broyés et chauffés 20 min à 95°C. Ils migrent de nouveau sur un gel de polyacrylamide, puis sont transférés sur une membrane de PVDF (Millipore) humidifiée au méthanol, qui est colorée au Bleu de Coomassie.

La quantité de la protéine P11 étant très faible, 40 spots de cette protéine sont électroélusés, puis le volume de l'éluat est réduit par lyophilisation. Nous avons vérifié sur la Lysosine provenant du marqueur de poids moléculaire que cette procédure n'interfère pas avec le microséquençage d'Edman.

#### ***3.3.2.2 Séquençage***

Les bandes colorées subissent une analyse de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale sur un microséquenceur 476A (Applied Biosystems, Applied Biosystems Corp, Foster City, USA), en suivant les recommandations du fabricant. Cet appareil utilise la chimie d'Edman, basée sur la dégradation séquentielle de la chaîne peptidique qui libère les acides aminés (Edman, 1956). Ceux-ci sont détectés par leur dérivé phénylthiohydantaine (Edman et Begg, 1967) après passage sur une colonne PTH (Applied Biosystems) et lecture à 269 nm.

#### ***3.3.2.3 Analyse des séquences***

Les séquences établies sont utilisées pour interroger les banques de données SwissProt et EMBL disponibles sur internet, à l'aide du logiciel *Blast 2.0* (Altschul *et al.*, 1997). Les comparaisons sont effectuées au niveau protéique (ce qui est plus adapté pour la recherche de protéines homologues que les alignements au niveau ADN) en utilisant le code à une lettre. Les recherches sont effectuées sans filtre ni matrice, afin d'obtenir une meilleure sensibilité (Brenner, 1998), avec les options suivantes : Expect (E)=1000, Description (V)=50, Alignement (B)=50, code génétique universel. Les homologues ayant la plus faible *E value* sont considérés.

### 3.3.3 Amplification d'un fragment d'ADNc

#### 3.3.3.1 Prélèvement de testicule et d'épididyme

Afin d'étudier l'expression des gènes par l'étude des ARNm, des testicules et des épидидymes sont rapidement prélevés sur des renards fertiles de notre station d'élevage, pendant la saison de reproduction. Immédiatement après la dissection, les tissus sont congelés dans de l'azote liquide puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.3.2 Extraction et purification des ARNm

##### 3.3.3.2.1 : Extraction des ARN totaux

Les ARN étant très sensibles aux ARNases, les précautions suivantes sont respectées (Sambrook *et al.*, 1989) :

- utilisation de matériel plastique à usage unique, certifié exempt de ARNase ;
- stérilisation par chauffage 8h à  $200^{\circ}\text{C}$  de la verrerie, pinces, spatules, feuilles d'aluminium, mortier et mandrins ;
- traitement de l'eau ultra-pure avec 0,1% de DEPC (24h à  $37^{\circ}\text{C}$  puis 1h à  $123^{\circ}\text{C}$ ) ;
- port de gants à usage unique.

Les ARN sont extraits à partir des fragments de testicule ou d'épididyme de renards conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ces fragments sont broyés mécaniquement sous vapeur d'azote liquide. La poudre obtenue est mélangée avec 1 mL de Trizol (Life Technologies) par gramme de tissu. L'homogénat subit alors une extraction au chloroforme (0,3 mL par mL d'homogénat), et après une centrifugation (10 min, 12000 g), la phase aqueuse est récupérée, et les ARN sont précipités par addition de 700  $\mu\text{L}$  d'isopropanol. Après centrifugation 10 min à 12000 g à  $4^{\circ}\text{C}$ , le surnageant est éliminé et un lavage à 75% d'éthanol (préparé avec de l'eau DEPC) est réalisé dans les mêmes conditions. Le culot est séché à température ambiante, puis les ARN sont dissous dans 50  $\mu\text{L}$  d'eau DEPC.

##### 3.3.3.2.2 : Vérification de la qualité des ARN

La pureté (contamination par des protéines) des ARN extraits et leur quantité sont estimés par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm, réalisée à l'aide d'un Biophotometer (Eppendorf). Afin de vérifier leur qualité (formes dégradées) les ARN subissent une migration en condition dénaturante. Pour cela, 10  $\mu\text{L}$  d'ARN sont mélangés avec 10  $\mu\text{L}$  de *tampon de dénaturation* (50% formamide ; 12% formaldéhyde ; 5mM EDTA pH 8) et 2  $\mu\text{L}$  de *tampon de charge* (50% glycérol ; 0,2% bleu de bromophénol), puis ils sont chauffés 3 min à  $80^{\circ}\text{C}$  et déposés sur un gel d'agarose (1% (p/v) agarose ; 5% formaldéhyde ; 0,1% GelStar (Tebu) dans du *tampon MOPS* : 0,2 M MOPS, 50 mM acétate de sodium, 5 mM EDTA). Après migration 2h à 48 V dans du tampon MOPS, les ARN sont visualisés par transillumination à 302 nm.

### 3.3.3.2.3 : Purification des ARNm

Les ARNm sont purifiés à l'aide d'un kit commercial (Oligotex mRNA purification kit, Qiagen) en respectant les consignes du fabricant. Les ARN sont dénaturés 3 min à 70°C, puis incubés 10 min à température ambiante avec des billes de silice recouvertes d'un oligonucléotide poly-dT qui va s'hybrider avec la queue poly-A des ARNm. Après une centrifugation 2 min à 14000 g, le surnageant est éliminé et le culot contenant les billes et les ARNm fixés sur les queues poly-dT est remis en suspension dans un *tampon OW2\**. Cette solution est placée sur une colonne qui retient les billes, et le tampon est éliminé par centrifugation. Après un second lavage dans le *tampon OW2\**, les ARNm fixés aux billes sont deshybridés des queues poly-dT des billes dans une solution de *tampon OEB\** à 70°C, et sont élués par une centrifugation 1 min à 14000 g.

### 3.3.3.3 Synthèse d'un brin d'ADNc

#### 3.3.3.3.1 : Reverse Transcription

Immédiatement après l'extraction, l'ARN est transcrit en ADNc. Pour cela, 5 µL d'ARN (environ 50 ng) sont ajoutés à 1 mM de déoxynucléotides triphosphate et à 1,6 µg d'amorces oligo-dT, puis dénaturés 5 min à 70°C. Ils sont ensuite ajoutés au *milieu réactionnel* (50 mM tris-HCl pH 8,3 ; 75 mM KCl ; 3 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM DTT ; 50 unités inhibiteur d'ARNase, 20 unités de M-MLV Reverse Transcriptase) dans un volume final de 20 µL. Ce mélange est placé dans le thermocycleur (Mastercycleur gradient, Eppendorf) et soumis au programme suivant : 60 min à 42°C (action de la Reverse Transcriptase), 5 min à 95°C (dénaturation de la Reverse Transcriptase) et 5 min à 4°C.

#### 3.3.3.3.2 : RACE PCR

Cette étape est réalisée à l'aide d'un kit fourni par Life technologies. Pour la synthèse d'un brin d'ADNc, 50 ng d'ARNm sont ajoutés à 500 nM d'amorces AP (Adaptator Primer) et dénaturés 10 min à 70°C. Ce mélange est ensuite ajouté au *milieu réactionnel* (20 mM tris-HCl pH 8,4 ; 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT et 500 µM de chaque oligonucléotide). Après équilibration 5 min à 42°C, 200 unités de l'enzyme *SuperScript II RT* sont ajoutés, et le tube est incubé 50 min à 42°C, 15 min à 70°C puis 1 min à 4°C. Deux unités d'ARNase H sont alors ajoutés pour détruire les ARN, et le tube est placé 20 min à 37°C.

#### 3.3.3.4 PCR

##### 3.3.3.4.1 : Choix des amorces

La séquence des amorces utilisée est présentée dans le tableau 4. Ces amorces sont synthétisées par Genome Express division (Montreuil, France).

**Tableau 4** : Amorces utilisées pour la PCR.

	Séquence Sens (5' - 3')	Séquence antisens (3' - 5')
P3	AAR gTN YTN CAR gAY TTY gg	amorce AUAP : ggC CAC gCg TCg ACT AgT AC
P4	TAY CAR ACN gAY gAR YTN gC	amorce AUAP : ggC CAC gCg TCg ACT AgT AC
P5	AAR gTN ggN gAY gCN ATH CC	amorce AUAP : ggC CAC gCg TCg ACT AgT AC
P7	Tgg ggN gAR YTN gAR gT	amorce AUAP : ggC CAC gCg TCg ACT AgT AC
P8	GTN CCN ACN gAY gAYgAR CAR g	amorce AUAP : ggC CAC gCg TCg ACT AgT AC
P13	TgC TTA TgA TCA AgC TCC TgA g	CCT TCT gCA TCC Agg AgT Tg

#### 3.3.3.4.2 : Réaction de Polymérisation en Chaîne

Le protocole de PCR est optimisé par chacune des séquences cibles, en faisant varier la température d'hybridation puis la concentration en  $MgCl_2$ . Deux  $\mu L$  d'ADNc sont ajoutés à 18  $\mu L$  de milieu réactionnel, dont la composition est donnée dans le tableau 5. Ce mélange est ensuite placé dans le thermocycleur et soumis au programme suivant : 5 min à 94°C (dénaturation initiale de l'ADN et activation de la *Taq Platinum* ; 30 cycles de 45 sec à 94°C, 1 min à la température d'hybridation et 1 min à 72°C (élongation) ; et à la fin de ces cycles une élongation finale de 10 min à 72°C est réalisée. La température d'hybridation est optimisée pour chaque PCR (tableau 5).

**Tableau 5** : Composition des milieux réactionnels utilisés pour la PCR et  $T_m$  utilisées.

	P3	P4	P5	P7	P8	P13
Tris HCl (pH 8,4)	20 mM	20 mM				
KCl	50 mM	50 mM				
$MgCl_2$	0,75 mM	1 mM	1 mM	0,75 mM	1 mM	1,5 mM
Amorce sens (tableau 4)	2 $\mu M$	1 $\mu M$				
Amorce antisens (tableau 4)	0,2 $\mu M$	1 $\mu M$				
dNTP	0,2 mM	0,2 mM				
Taq Platinum DNA polymerase	1 unité	1 unité				
Température d'hybridation	45°C	50°C	66°C	58°C	65°C	56°C

#### 3.3.3.4.3 : Migration des échantillons

Dix  $\mu L$  d'ADN amplifié sont mélangés à 2  $\mu L$  de *tampon de charge 6x* (0,03% bleu de bromophénol ; 0,03%, xylène cyanol ; 0,4% orange G, 15% Ficoll 400, 10 mM tris-HCl pH 7,5 ; 50 mM EDTA pH 8,0), puis analysés par électrophorèse en gel à 2% d'agarose (2% (p/v) agarose, 0,5  $\mu g/mL$  bromure d'éthidium ou GelStar dans du tampon *TBE 1x*). Après migration 1h30 à 100 mV dans du *tampon TBE 1x* (90 mM tris ; 90 mM acide borique ; 2 mM EDTA pH 8,0), les échantillons sont visualisés par transillumination à 302 nm.

#### 3.3.3.5 Purification de l'ADN amplifié

L'ADN amplifié est extrait des gels par centrifugation 20 min à 14000 g des fragments de gel sur une colonne commerciale, *Gene-Elut* (Supelco).

L'éluat (environ 100 µL) est ensuite précipité. Pour cela, 200 µL d'éthanol absolu froid, 35 µL de glycogène à 2 mg/ml, et 35 µL d'acétate d'ammonium 5M sont ajoutés, et le mélange est précipité toute la nuit à -20°C. Après une centrifugation 30 min à 14000 g, le culot est lavé 2 fois avec 100 µL d'éthanol à 70°, puis séché à température ambiante et repris dans 10 µL d'eau ultrapure. Il est ensuite dosé.

### 3.3.3.6 Clonage

Le clonage est réalisé à l'aide d'un kit commercial, SureClone™ Ligation kit (Amersham Pharmacia), en respectant les consignes du fabricant. Les fragments de PCR sont préparés pour la ligation en utilisant l'activité exonucléase 3'-5' du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, pour éliminer la base située en 3' (réaction d'émoussage), tandis qu'une phosphorylation est effectuée par une T4 polynucléotide kinase. Pour cela, de 100 à 150 ng de produit de PCR sont ajoutés à 1 µL de fragment de Klenow, 1 µL de polynucléotide kinase, dans du *tampon 1x\**, et incubés 30 min à 37°C. Le mélange subit ensuite une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) pH 8. L'éluat est récupéré par centrifugation 30s à 12000 g sur une colonne contenant une résine d'exclusion Sépharyl.

L'éluat est utilisé pour la réaction de ligation. Pour cela, 7 µL d'éfluent sont ajoutés à 50 ng de vecteur déphosphorylé pUC18/Sma, 1 µL de solution DTT, 1 µL de T4 DNA ligase, dans du *tampon de ligation\**, et le mélange est incubé 1h 45 à 16°C.

Dix µL de ce produit de ligation sont utilisés pour transformer 100 µL de bactéries DH5α, décongelées sur glace. Pour cela, le mélange est incubé 30 min sur glace, puis un choc thermique (20 sec à 37°C, puis 2 min sur glace) est réalisé et 950 µL de *milieu SOC* (2% (p/v) bactotryptone ; 0,55 % (p/v) extrait de levure ; 10 mM NaCl ; 10 mM KCl ; 20 mM MgCl<sub>2</sub> ; 20 mM glucose ; Life Technologies) sont ajoutés. Les bactéries sont incubées 1h à 37°C sous agitation orbitale. Elles sont ensuite centrifugées 5 min à 2500g, resuspendues dans 100µL de *milieu SOC*, et étalées sur une *gélase LB agarose* (1,5 % (p/v) d'agarose dans du *milieu LB* : 1% (p/v) peptone140 , 0,5 % (p/v) extrait de levure 5 g/L, 170 mM NaCl) contenant de l'ampicilline (100 mg/L), de l'XGal (50 mg/L) et 1 mM d'IPTG. Cette culture est incubée au moins 16h à 37°C pour permettre la croissance des colonies bactériennes.

Les colonies ayant incorporé le plasmide poussent, grâce au gène de résistance à l'ampicilline porté par le plasmide. L'insertion des inserts dans les vecteurs inhibe le gène de LacZ, produisant des colonies blanches. Au contraire, dans les vecteurs vides, le gène de LacZ est actif ce qui confère une coloration bleue à la colonie. Une PCR de criblage est réalisée sur les colonies blanches, avec des amorces spécifiques du vecteur pUC18 utilisé, choisies de part et d'autre du site d'insertion. Pour cela, 2 µL de suspension bactérienne sont ajoutés au *milieu réactionnel* (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris HCl (pH8,4), 50 mM KCl, 0,2 mM de chaque oligonucléotide, 1 pm de chaque amorce M13sens et M13antisens, et 2,5 unités d'enzyme *Taq Platinum*). Ce mélange est placé dans le thermocycleur et soumis au

programme suivant : 10 min à 94°C, 30 cycles de 30 sec à 94°C, 1 min à 50°C, 1 min à 72° ; puis 10 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite analysés sur un gel d'agarose comme décrit plus haut (section 3.3.3.4.3), les clones ayant incorporé un vecteur vide ont une taille de 137 pb.

Les clones positifs sont mis à pousser dans 5 mL de *milieu LB* contenant de l'ampicilline (100 mg/L de milieu), et incubés toute la nuit à 37°C. Après ajout de 15% de glycérol, les bactéries sont congelées pendant 1 h à -20°C puis conservées à -80°C.

### 3.3.3.7 Séquençage

#### 3.3.3.7.1 : Purification des plasmides

Cette purification est effectuée à l'aide d'un kit commercial, *Perfectprep plasmid mini* (Eppendorf), en respectant le protocole du fabricant.

Un mL de culture de bactéries contenant l'insert est centrifugé 20 s à 12000g, puis le surnageant est éliminé et 1 mL de cette même culture bactérienne est ajouté au culot. Une nouvelle centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions. Le culot est resuspendu dans 100 µL de *solution I\**, puis 100 µL de *solution II\** sont ajoutés pour lyser les bactéries. Cette solution est neutralisée par ajout de 100 µL de *solution III\**, qui permet également de précipiter les débris cellulaires. Après agitation vigoureuse et centrifugation 30 s à 12000g, le surnageant est transféré sur une colonne, et 450 µL de *DNA binding matrice\** sont ajoutés. La colonne est incubée 5 min à température ambiante, avant d'être centrifugée 30 s à 12000g. La résine est remise en suspension dans 400 µL de *solution DPS\**, et une centrifugation 1 min à 12000 g est effectuée. La colonne est ensuite fixée sur un nouveau tube de 1,5 mL, 70 µL d'eau ultrapure sont ajoutés, et la colonne est incubée 30 min à 37°C avant d'être centrifugée 1 min à 12000 g. Les plasmides sont contenus dans l'éluat.

Pour vérifier la qualité des plasmides, 5 µL d'éluat sont mélangés à 1 µL de *tampon de charge 6x* et subissent une électrophorèse sur *gel d'agarose à 1%*, comme décrit plus haut. La mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm permet de doser l'ADN et d'estimer la contamination par des protéines.

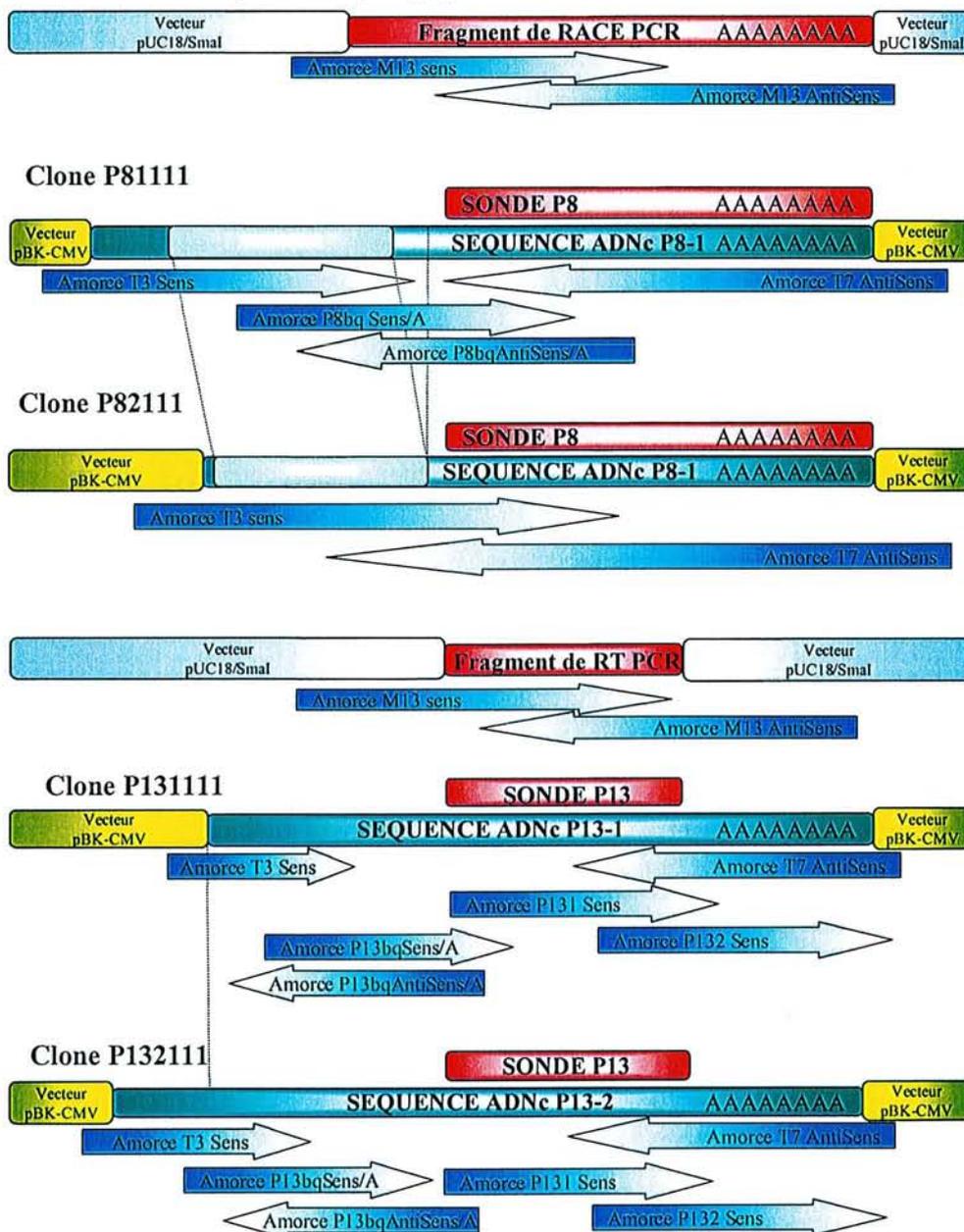
#### 3.3.3.7.2 : Réaction de séquençage

La réaction de séquençage a été effectuée à l'aide d'un kit commercial (ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer), en suivant les recommandations du fabricant mis à part pour la purification des produits de séquençage. Cette réaction de séquençage utilise des dideoxynucléotides triphosphates marqués avec des fluorochromes différents : Rox (jaune) pour le ddATP, FAM (vert) pour les ddCTP, JOE (rouge) pour les ddGTP et TAMRA (bleu) pour les ddTTP. La position des amorces utilisées pour le séquençage des fragments de RACE PCR ou des ADN de la banque d'ADNc de testicule de renard sont présentées dans la figure 13.

Pour le séquençage, 250 à 500 ng d'ADN plasmidique et 3,2 pmole d'amorce (tableau 6) sont ajoutés au *milieu réactionnel*\* (dNTP, ddNTP ; tris-HCl pH 9,0 ; MgCl<sub>2</sub> ; thermal stable pyrophosphatase, ampliTaq DNA Polymerase). Le mélange est placé dans le thermocycleur et soumis à 25 cycles de 10 s à 96°C, 5 s à 56°C, 4 min à 60°C.

Le produit de cette réaction est purifié sur une colonne DyeEx (Qiagen), par centrifugation. Le culot est séché à température ambiante.

**Amorces utilisées pour le séquençage de P3, P4, P5 et P7.**



**Figure 13 :** position des différentes amorces utilisées pour le séquençage des fragments de RACE PCR ou des clones isolés à partir de la banque d'ADNc de testicule de renard.

**Tableau 6 :** Nom et séquence des amorces utilisées pour le séquençage des fragments de RACE PCR et des clones issus de la banque d'ADNc de testicule de renard.

Nom de l'amorce	Séquence
T3 sens	AAT TAA CCC TCA CTA AAg gg
T 7 antisens	gTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg C
P8bq sens/A	TTC CgC ggA TCT TCC CCA gAA A
P8bqAntisens/A	TgT TCg CCT gCT CgT CAT CAg TA
P131sens	TgC TTA TgA TCA AgC TCC TgA g
P13bqSens/A	CAA gAA CCT ACA Cgg Atg
P132sens	CAA CTC CTg gAT gCA gAA gg
P13bqAntisens/A	CgA CAT AAg TTA CTC CTT C
M13sens	AgC ggA TAA CAA TTT CAC ACA gg
M13antisens	CCC AgT CAC gAC gTT gTA AAA Cg

### 3.3.3.7.3 : Lecture des séquences

Les échantillons sont transmis au Service Commun de Biologie Moléculaire du CHRU de Nancy.

Les culots sont remis en suspension dans 6  $\mu$ L de *loading buffer* (5 volumes de formamide pour 1 volume de 25 mM EDTA pH 8,0 ; 50 mg/mL bleu dextran), chauffés 2 min à 90°C, puis 1,5  $\mu$ L de ce mélange est déposé sur le séquenceur ABI PRISM 377 (Perkin Elmer). La migration et la lecture sont effectuées en accord avec les recommandations du fabricant.

### 3.3.3.7.4 : Analyse des séquences

Les séquences obtenues sont analysées à l'aide des logiciels suivants :

- pour l'alignement des séquences : GeneDoc 2.6.002 (Nicholas et Nicholas, distribué par les auteurs) ;
- pour la conversion des séquences ADN en séquences en acides aminés : DNA Club (Chen , distribué par l'auteur);
- pour la prédiction des structures secondaires (modèle de Garnier, 1990), la recherche des régions transmembranaires (Von Heijne, 1992) et des régions antigéniques (modèle de Parker *et al.*, 1985), les séquences ainsi converties sont analysées par le logiciel *Antheptot 2000, V5.2*, disponible sur internet (Deleage, distribué par l'auteur).

## **3.3.4 Réalisation et Criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard**

### 3.3.4.1 Prélèvement des tissus et extraction des ARN

Les organes sont prélevés comme décrit précédemment. Des fragments de testicules provenant de 2 renards fertiles sont utilisés pour la réalisation de la banque d'ADNc. Les ARNm sont extraits, purifiés et dosés.

### 3.3.4.2 Réalisation de la banque d'ADNc

#### 3.3.4.2.1 : Principe

La banque d'ADNc est réalisée à l'aide d'un kit commercial (ZAP Express cDNA gigapack III gold cloning kit, Stratagene). Ce kit utilise une amorce hybride oligo-dT-amorce, contenant un site de restriction *Xho*. Les ARNm s'hybrident avec cette amorce permettant la synthèse du premier brin d'ADNc, à l'aide de l'enzyme M-MLV RT et de nucléotides, dont le dCTP méthylé. Cette méthylation des brins néoformés les protège contre les enzymes de restriction, dont l'endonucléase *Xho*. Les ADN hémi-méthylés sont introduits dans des vecteurs phagiques qui servent à infecter des cellules *XLI*, ce qui permet leur réplique.

#### 3.3.4.2.2 : Synthèse des premiers brins d'ADNc

Cinq µg d'ARNm, chauffés 5 min à 65°C pour dénaturer les structures secondaires, sont ajoutés à un milieu réactionnel comprenant du *tampon 1x\**, 0,6 mM des nucléotides dATP, dTTP, dGTP, 0,3 mM de 5-méthyl dCTP, 56 ng d'amorce hybride oligo-dT, 40 unités d'inhibiteur de RNase, dans un volume final de 48,5 µL. Après incubation 10 min à température ambiante pour permettre l'hybridation de l'amorce, 75 unités d'enzyme M-MLV RT sont ajoutées, et le milieu réactionnel est incubé 1h à 37°C, puis refroidi sur glace.

#### 3.3.4.2.3 : Synthèse des seconds brins d'ADNc

Après ajout de *tampon 1x\**, des nucléotides (0,4 mM de dATP, dTTP, dGTP, et 1,0 mM de dCTP), de 3 µL de RNase H et 100 unités de DNA polymérase I, dans un volume final de 200 µL, le milieu réactionnel est incubé 2h30 à 16°C, puis refroidi sur glace.

#### 3.3.4.2.4 : Emoussage des extrémités de l'ADNc et précipitation

L'émoussage (ou *blunting*) est réalisé par ajout de 5 unités de Pfu DNA polymerase et du mélange d'oligonucléotides (0,25 mM de chaque oligonucléotide) suivie d'une incubation 30 min à 72°C. A ce moment, 200 µL de phénol-chloroforme (1 :1) pH 8 sont ajoutés, et après centrifugation 2 min à 12000 g le surnageant est récupéré.

Après un lavage du surnageant avec un volume égal de chloroforme, l'ADNc est précipité par addition de 20 µl d'acétate de sodium 3M et d'un volume d'éthanol absolu et incubation une nuit à -20°C. Après une centrifugation 1h à 12000g à 4°C, le surnageant est éliminé, le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol à 70°, puis séché.

#### 3.3.4.2.5 : Ligation des adaptateurs *EcoR I*

Le culot est resuspendu dans 2,8 µg d'adaptateur *EcoR I* (dans un volume de 7 µL) et incubé 30 min à 4°C. Le *tampon de ligation\**, 1 mM de nucléotide rATP et 4 unités de T4 DNA ligase sont alors ajoutés, dans un volume final de 10 µL. La ligation est effectuée par incubation 2 jours à 4°C. La ligase est ensuite inactivée par incubation 30 min à 70°C.

#### 3.3.4.2.6 Phosphorilation des extrémités de *EcoR I*

Les réactifs suivants sont ajoutés au milieu réactionnel : *tampon de ligation 1x\**, 1 mM rATP, et 10 unités de T4 polynucléotide kinase dans un volume final de 20 µL. La phosphorilation est effectuée pendant 30 min à 37°C, et la kinase est inactivée 30 min à 70°C.

#### 3.3.4.2.7 : Digestion avec *Xho I*

Les ADN sont digérés par ajout du tampon de digestion 1x et de 120 unités de l'enzyme de restriction *Xho I*, dans un volume final de 51 µL, et incubation 90 min à 37°C.

#### 3.3.4.2.8 : Purification de l'ADN

Cette purification constitue la modification majeure que nous avons apportée au kit Stratagène. Plutôt que d'utiliser les colonnes conseillées par le fabricant, nous avons purifié l'ADN à l'aide d'une colonne QIAquick (Qiagen).

Pour cela, 5 volumes de *tampon PB\** sont ajoutés à l'ADN, et ce mélange, déposé sur une colonne de purification QIAquick, subit une centrifugation rapide (1 min à 14000 g). La colonne est ensuite lavée par addition de 750 µL de *tampon PB* et centrifugation (1 min à 14000 g). L'ADN est ensuite élué par addition de 50 µL d'eau distillée à 37°C puis centrifugation dans les mêmes conditions. Cette élution est répétée 2 fois, et les éluats sont regroupés.

L'ADN est ensuite précipité 16h comme décrit plus haut. Après centrifugation 1h à 12000 g à 4°C, le culot est lavé par addition de 200 µL d'éthanol à 70° puis centrifugation 2 min à 12000 g.

L'ADN est quantifié par mesure de la densité optique à 260 et 280 nm.

#### 3.3.4.2.9 : Ligation de l'ADNc au vecteur ZAP Express

Cent ng d'ADN sont ajoutés au milieu réactionnel contenant du *tampon de ligation 1x*, 1 mM de rATP, 1 µg de ZAP Express vector, 2 unités de T4 DNA ligase, dans un volume final de 4,5 µL. La ligation est effectuée pendant une nuit à 4°C.

#### 3.3.4.2.10 : Encapsidation

Quatre µL de plasmides ZAP Express sont ajoutés au *Packaging extract\** immédiatement après décongélation, et le mélange est incubé 2h à 22°C. Cinq cent µL de *tampon SM* (100 mM NaCl ; 10 mM MgSO<sub>4</sub> ; 50 mM tris-HCl pH7,5) sont ensuite ajoutés ainsi que 20 µL de chloroforme. Le surnageant est récupéré après une courte centrifugation pour éliminer les débris.

#### 3.3.4.2.11 : Titrage de la banque

Des bactéries XL1-Blue MRF' sélectionnées sur une gélose *LB-tétracycline* (tryptone 10g/L, NaCl 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, agar 20g/L, tétracycline 15 mg/L ; Life Technologies), sont mises en culture pendant 5h à 37°C sous agitation dans 50 mL *milieu LB* supplémenté en 0,2% (p/v) maltose et 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Après une centrifugation 10 min à 500

g, le surnageant est éliminé, et les bactéries sont reprises dans une solution de 10 mM MgSO<sub>4</sub>, de telle façon que la DO<sub>600</sub> soit égale à 0,5.

Pour titrer la banque, 1 µL de phages est incubé pendant 15 min à 37°C avec 200 µL de bactéries hôtes à une DO<sub>600</sub> de 0,5 dans une solution de 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Après addition de 15 µL d'IPTG (0,5M), 45 µL de XGal (250 mg/ml) et 3 mL de *NZY Top Agar* (10g/L Peptone 140, 5 g/L extrait de levure, 5g/L chlorure de sodium, 0,94 g/L MgCl<sub>2</sub>, 0,7% agarose ; Life Technologies) chauffé à 48°C, ce milieu est coulé sur des boîtes de Pétri de 82 mm de diamètre contenant de la gélose NZY. Après une incubation de 10 min à température ambiante, les boîtes sont incubées une nuit à 37°C. Le nombre de plages de lyse bleues, correspondant aux phages sans insert, doit être inférieur à 10<sup>5</sup> PFU/µg de phages, et le nombre de plages de lyses non colorées doit être de 10 à 100 fois supérieur à ce nombre.

### 3.3.4.3 Amplification de la banque d'ADNc

#### 3.3.4.3.1 : Préparation des bactéries

Les bactéries XL1-Blue MRF' sont préparées comme décrit plus haut. Leur concentration est ajustée à 0,5 unité de DO<sub>600</sub> dans une solution de 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. Deux mL de ces bactéries sont utilisées par boîte de Pétri de 245 x 245 mm.

#### 3.3.4.3.2 Amplification de la banque

Les bactériophages sont ajoutés aux bactéries hôtes (1,5 x10<sup>6</sup> bactériophages pour 2 mL de bactéries hôtes), et incubés 15 min à 37°C. Ce mélange est ensuite ajouté à 30 mL de *milieu NZY Agar* refroidi à 48°C, et coulé sur une boîte de Pétri contenant du *milieu NZY Agar*. Après solidification, les boîtes sont incubées de 6 à 8h à 37°C. Les plages de lyse apparaissent. Pour récupérer les phages, les boîtes de Pétri sont ensuite recouvertes de 40 mL de *tampon SM* et incubées une nuit à 4°C, sous agitation douce.

Les surnageants sont ensuite récupérés. Cinq % de chloroforme sont ajoutés, et le mélange est incubé 15 min à température ambiante. Après une centrifugation de 10 min à 500 g, le surnageant est récupéré, et 0,3% de chloroforme sont ajoutés. La banque est conservée à 4°C. Le titre de la banque est vérifié.

### 3.3.4.4 Criblage de la banque par Southern blot

#### 3.3.4.4.1 : Principe

Pour rechercher l'ADNc des protéines sélectionnés, nous avons criblé la banque d'ADNc par Southern blot, en utilisant comme sonde les fragments de PCR obtenus (marqués après digestion enzymatique des plasmides cibles). Les bactériophages contenant l'ADNc recherché sont clonés, jusqu'à ce que 100% des plages de lyse soient positives. Les Southern blot sont réalisés à l'aide d'un kit commercial, *DIG High prime DNA labelling and detection starter kit II* (Roche) en suivant les recommandations du fabricant. Ce kit utilise la

digoxigenine (DIG) pour marquer les sondes qui sont hybridées avec les plages de lyse et révélées avec un système chemiluminescent.

#### 3.3.4.4.2 : Transfert

Les boîtes de Pétri contenant les bactériophages et les membranes sont incubées à 4°C pour faciliter le transfert. Une membrane de Nylon chargée positivement (Hybon N+, Pharmacia) est appliquée pendant 2 min contre la gélose. À l'aide d'une aiguille trempée dans de l'encre de Chine, des repères sont effectués sur la membrane et sur la gélose, afin de pouvoir situer après le Southern blot les clones positifs. Pour libérer l'ADN contenu dans les bactériophages, la membrane est placée 5 min dans la *solution de dénaturation* (1,5 M NaCl ; 2 M NaOH), puis 3 min dans la *solution de neutralisation* (1,5 M NaCl ; 0,5 M Trizma base pH 7,5). Elle est ensuite lavée 10 min dans du SSC2x (30 mM C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> ; 300 mM NaCl ; pH 7-8) pour éliminer les débris protéiques.

Les ADN sont fixés sur la membrane par transillumination aux UV à 254 nm dans un four à UV (Fisher Bioblock Scientific, France).

Les boîtes de Pétri et la membrane sont ensuite conservées 1h à 4°C, puis pour chaque criblage de la banque, un deuxième transfert de 10 min est réalisé, afin d'éliminer les artefacts.

#### 3.3.4.4.3 : Marquage des sondes

Les fragments de PCR ou de RT-PCR, contenus dans des plasmides sont utilisés comme sonde.

Les plasmides sont digérés par addition de 4 unités d'enzyme *Sst I* et 4 unités de *Xba I* dans un *milieu réactionnel* contenant 50 mM tris-HCl pH 8,0 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 50 mM NaCl dans un volume final de 20 µL, puis incubation 1h à 37°C. Après migration sur gel d'agarose, les fragments d'ADN sont prélevés avec un scalpel et purifiés comme décrits plus haut.

L'ADN est quantifié et 1 µg d'ADN (dans un volume de 16 µL) est dénaturé 10 min à 95°C. Quatre µL du réactif *DIG-High Prime\** sont ajoutés, et le mélange réactionnel est incubé toute la nuit à 37°C. La réaction est stoppée par chauffage 10 min à 65°C.

Pour la quantification des sondes, des dilutions de 1 ng/µL à 0,01 pg/µL sont réalisées dans le *tampon de dilution\** contenu dans le kit. Un µL de chaque dilution est déposé sur la membrane de Nylon N+, fixé aux UV, et révélé comme décrit plus bas.

#### 3.3.4.4.4 : Hybridation

La température d'hybridation est calculée de la façon suivante (Sambrook *et al.*, 1989) :

$T_m = 49,82 + 0,41(\%G+C) - (600/\text{taille sonde}) - (20 \text{ à } 25)$  ; ce  $T_m$  doit être compris entre 37 et 42°C.

Les  $T_m$  ainsi calculés sont de 49°C pour P8 et 42°C pour P13. Afin de rester dans l'intervalle de  $T_m$  conseillé, le  $T_m$  utilisé pour la sonde P8 est ramené à 42°C. Les membranes sont pré-hybridées 30 min à la température d'hybridation dans une solution

fournie par le fabricant (*Dig Easy Hyb\**) pour saturer les sites de liaison non-spécifiques. Elles sont ensuite hybridées avec les sondes marquées (87,5 ng de sonde marquée pour 100 cm<sup>2</sup> de membrane) toute la nuit à la température d'hybridation, sous agitation douce dans le four à hybridation (Hybaid).

#### 3.3.4.4.5 : Lavages

La membrane est lavée 2 fois 5 min à température ambiante dans une solution de SSC2x ; 0,1% SDS puis 2 fois 5 min à 65°C dans une solution de SSC 0,5x ; 0,1% SDS .

#### 3.3.4.4.6 : Révélation

La membrane est incubée 1 min dans la *solution de lavage* (0,1 M acide maléique ; 0,15 M NaCl ; 0,3% Tween20 ; pH 7,5) puis les sites de liaison non-spécifiques sont saturés par incubation 30 min dans la *solution de blocage\** fournie avec le kit. La membrane est ensuite incubée 30 min avec les anticorps anti-DIG marqués à la phosphatase alcaline (1/10<sup>5</sup> dans la solution de blocage). Après 2 lavages de 15 min dans la solution de lavage, la membrane est équilibrée 2 min dans la *solution de détection* (0,1 M tris-HCl ; 0,1 M NaCl ; pH 9,5), et placée sur une feuille de cellophane. L'excès de liquide est éliminé, et le substrat de la phosphatase alcaline contenu dans la solution du kit *CSPD-ready-to-use\**, est ajouté. Après une incubation de 5 min à température ambiante, l'excès de liquide est de nouveau éliminé. La membrane est recouverte par une seconde feuille de cellophane et incubée 10 min à 37°C. Elle est ensuite mise en contact avec un film photo (Kodak BioMax) pendant un temps pouvant varier de 15 à 30 min suivant l'intensité du signal. Ce film est révélé après une incubation de 5 min dans une *solution de développement\** et 10 min dans une *solution de fixation photo\**.

#### 3.3.4.4.7 : Sous-criblage et interprétation

Les clones positifs apparaissant sous forme de spots noirs visibles sur les 2 Southern blots réalisés sont prélevés sur la boîte et remis en culture (sous-clonage) comme décrit plus haut. Ces boîtes seront de nouveau criblées par Southern blot jusqu'à ce que tous les clones en culture soient positifs. A ce moment, un clone est prélevé et transformé, puis un séquençage est réalisé.

### **3.3.5 Analyse de la protéine P13 en spectrométrie de masse**

Vingt-quatre spots de la protéine P13 sont purifiés sur gels d'électrophorèse en 2 dimensions colorés au bleu de Coomassie, et transmis pour analyse au Laboratoire de Biochimie des peptides de l'Université de Szeged (Hongrie). Les protéines subissent une digestion trypsique, puis les fragments obtenus sont analysés par un appareil de type MALDI-TOFF.

## 3.4 : Caractérisation partielle des antigènes sélectionnés

### 3.4.1 Principe

Afin de d'évaluer l'intérêt des protéines sélectionnées comme antigène pour un vaccin contraceptif, nous les avons purifiées par électrophorèse en 2 dimensions, avant de les utiliser :

1/ pour des analyses biochimiques : études de glycosylations

2/ pour produire chez la souris des sérums monospécifiques (dirigés contre une seule protéine). Ces sérums sont utilisés pour établir la localisation des antigènes sur les spermatozoïdes, pour étudier par Western blot la spécificité d'espèce et d'organe, et enfin pour évaluer l'effet d'anticorps dirigés contre un antigène spermatique sur la mobilité des spermatozoïdes et sur la liaison spermatozoïdes – zone pellucide.

### 3.4.2 Caractérisation biochimique

#### 3.4.2.1 Digestion enzymatique des groupements glycosylés

Quatorze spots de P11 et P13, et 22 spots de P3, P4, P5 et P7, sont découpés sur des gels d'électrophorèse en 2D colorés au bleu de Coomassie. Après électroélution et lyophilisation, les protéines sont déglycosylées à l'aide d'un kit commercial (Enzymatic deglycosylation kit, BioRad). Pour cela, les protéines sont incubées 1h à 37°C avec 0,1 unité d'enzyme NANase II et 0,01 unité d'enzyme O-glycosylase, dans un tampon 187,5 mM de phosphate de sodium pH 6,0, dans un volume final de 16 µL. La combinaison de ces deux enzymes élimine tous les sucres Gal(β1-3)GalNAc(α1) liés à des sérines ou thréonine, ainsi que tous les acides sialiques substitués Gal(β1-3)GalNAc(α1). Après cette incubation, 0,05 unité d'enzyme PNGase F sont ajoutés ainsi que 20 µL de 0,25 M phosphate de sodium, et les protéines sont incubées 24h à 37°C. Cette dernière enzyme élimine tous les oligosaccharides Asn-liés. Le poids moléculaire des protéines déglycosylées est déterminé par migration sur un gel à 10% d'acrylamide (P13) ou un gel Tris-trycine (pour les autres protéines) coloré à l'argent, et comparé avec le poids moléculaire des protéines non déglycosylées.

#### 3.4.2.2 Marquage des sucres par des lectines

Huit spots de chacune des protéines sélectionnées sont découpés sur des gels d'électrophorèse en 2D colorés au bleu de Coomassie. Après une nouvelle électrophorèse, ces protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose qui est colorée au rouge Ponceau. La protéine apparaît sous forme d'une bande rouge unique, qui est découpée en plusieurs bandelettes qui sont traitées individuellement. Elles sont d'abord saturées 1h dans du TBS-BSA 10% (p/v), puis lavées 5 min dans du TBS (0,15 M NaCl ; 0,05 M Tris-HCl ; pH 7,5), avant d'être incubées 16h avec différentes lectines (voir tableau 7) à une concentration

finale de 50 µg/mL dans du *TBS-BSA*. Après 3 lavages de 5 min dans du *TBS-0,05% Tween20*, la présence des lectines est révélée grâce à un kit commercial (Pierce), en suivant les recommandations du fabricant. Pour cela, les bandelettes sont incubées 1 h dans une solution de révélation avidine-péroxydase biotinylée, lavées 3 fois dans du *TBS-Tween*, et ces complexes sont révélés grâce à une solution de DAB-Zinc (Pierce).

**Tableau 7** : Lectines utilisés.

Lectine	Sucres reconnus
<i>Concanavalin A</i>	A-man, α-glc
<i>Dolichos biflorus</i>	α-galNAc
<i>Phaseolus vulgaris PHA-E</i>	Oligosaccharide
<i>Phytolacca americana</i>	(glcNAc) <sub>3</sub>
<i>Pisum sativum</i>	α-man
<i>Tetragonolobus purpureas</i>	α-L-fuc
<i>Ulex europaeus UEA I</i>	(glcNAc) <sub>2</sub>
<i>Wisteria floribunda</i>	GalNAc

### 3.4.3 Caractérisation biologique

#### 3.4.3.1 Production de sérum de souris monospécifiques

##### 3.4.3.1.1 : Préparation des antigènes

###### 3.4.3.1.1.1 Electroélution des protéines

Les protéines isolées sur gels en 2D colorés au bleu de Coomassie, sont éluées du gel avec un appareil BioRad, en suivant les recommandations du fournisseur.

Les morceaux de gel contenant les protéines sont hachés en petits morceaux et déposés dans un tube en verre, au-dessus d'une chambre délimitée par un support de verre frité et une membrane de dialyse, retenant les protéines. Ce dispositif est maintenu en place par un adaptateur en silicone. Le dispositif est recouvert de *tampon d'éluion* filtré (50 mM bicarbonate d'ammonium ; 0,1% SDS), et la migration a lieu pendant 5h, sous un courant constant de 10 mA par tube, sous agitation rapide.

Les protéines sont récupérées dans la chambre délimitée par le verre frité et la membrane de dialyse.

###### 3.4.3.1.1.2 Lyophilisation

Des aliquots de protéines électroélues sont lyophilisés, toute une nuit à -50°C sous vide, dans un *Freeze dryer* (Edwards), afin d'en réduire le volume pour le rendre compatible avec une purification en HPLC.

### 3.4.3.1.1.3 Purification des protéines en HPLC

Cette purification est effectuée au Service Commun de Séquençage des Protéines de l'Université Henri Poincaré (Nancy I). Les échantillons sont déposés sur une cartouche RP300 (C8), de 100x2,1 mm (Applied Biosystems), et purifiés par passage d'un gradient eau TFA-acétonitrile variant en 50 min de 2 à 90% d'acétonitrile. La détection est effectuée à 215 nm.

Les fractions correspondant aux différents pics sont récoltées. Afin de déterminer quelle fraction contient les protéines, 5 µL de chacune des fractions récoltées est mélangée à 5 µL de tampon échantillon, chauffée 5 min à 95°C, puis subit une électrophorèse sur un gel d'acrylamide qui est coloré à l'argent, suivant les protocoles décrits plus haut.

Les fractions protéiques ainsi identifiées sont totalement lyophilisées afin d'éliminer les traces d'acétonitrile et reprises dans du PBS stérile.

### 3.4.3.1.2 : Immunisation des souris

Pour la production d'anticorps polyclonaux monospécifiques, 6 souris Swiss femelles et des souris balb/c (19 femelles, 6 mâles) sont utilisées (Iffa Credo, France). Ces animaux sont âgés de 4 semaines au début de l'expérience. Ils sont élevés en accord avec les recommandations du *Conseil Canadien de Protection des Animaux*.

Trois protocoles sont utilisés pour obtenir des sérums de souris contenant des anticorps dirigés contre des protéines de spermatozoïde de renard isolées en électrophorèse en 2D.

Protocole 1 : pour chaque protéine, 20 spots purifiés par électrophorèse en 2 dimensions, sont broyés, chauffés 20 min à 95°C, avant de migrer sur un gel de polyacrylamide. Ils sont ensuite transférés sur une membrane de PVDF humidifiée au méthanol qui est colorée au bleu de Coomassie. Des souris Swiss anesthésiées avec du tribromoéthanol (1g dans 1ml d'alcool amylique tertiaire, dilué à 1 :50 dans du sérum physiologique ; 1 ml de cette préparation par souris) sont immunisées directement avec cette membrane par voie intra-splénique. Un rappel est effectué 4 semaines plus tard de la même manière, et le sang est récolté 10 jours plus tard par ponction cardiaque, puis le sérum est testé par Western blot.

Protocole 2 : pour chaque protéine, 20 spots purifiés par électrophorèse en 2 dimensions sont électroélués du gel dans du tampon volatil. Le volume de l'éluat est ensuite réduit par lyophilisation. Les protéines sont purifiées par HPLC puis, après émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund, la fraction protéique est injectée par voie intra-péritonéale à des souris balb/c femelles. Deux rappels avec la même préparation protéique, émulsifiée dans de l'adjuvant incomplet de Freund, sont réalisés à 3 semaines d'intervalle. Le sang est récolté par ponction cardiaque 10 jours après le dernier rappel puis le sérum est testé par Western blot.

Protocole 3 : pour chaque protéine, 20 spots purifiés par électrophorèse en 2 dimensions sont électroélués du gel dans du tampon volatile. Le volume de l'éluat est ensuite réduit par lyophilisation. Les protéines sont purifiées par HPLC, et après émulsion dans un adjuvant Qiagen (ImmunEasy™ Mouse Adjuvant), la fraction protéique est injectée par voie intramusculaire à des souris balb/c femelles. Deux rappels avec la même préparation protéique, émulsifiée avec le même adjuvant, sont réalisés à 2 semaines d'intervalle. Le sang est récolté par ponction cardiaque 10 jours après le dernier rappel, puis le sérum est testé par Western blot.

### 3.4.3.2 Immunolocalisation

#### 3.4.3.2.1 : En FITC

Les spermatozoïdes éjaculés de renard sont récoltés et fixés au méthanol. Les lames sont saturées 40 min sous atmosphère humide avec un anticorps de lapin anti IgG de chien non marqué, dilué à 1/500 dans du *PBS-BSA*, avant d'être incubées 1 h avec les sérums des souris dilués au 1/200 dans du *PBS*. Après 3 lavages de 5 min dans du *PBS*, elles sont incubées 1 h avec un anticorps de chèvre anti-souris marqué au FITC dilué au 1/200. Après 3 lavages dans le *PBS*, les lames sont montées par une solution de *Glycérol-PBS*, mises sous lamelle, et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (grossissement x400). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra numérique (DP50, Olympus).

Pour chaque observation, un témoin négatif est réalisé à l'aide d'un sérum naïf (sérum d'une souris de la même souche non immunisée).

#### 3.4.3.2.2 En microscopie électronique

Deux protocoles de fixation sont utilisés : le premier pour une étude standard des spermatozoïdes en microscopie électronique en transmission, et le second pour une étude en immuno-marquage.

Des spermatozoïdes éjaculés et épидидymaires sont récoltés, lavés dans du *PBS* par centrifugation 5 min à 1000 g et fixés dans la *solution de fixation standard* (2,5% Glutaraldéhyde dans du tampon 0,1 M Cacodylate pH 7,2) ou dans la *solution de fixation immuno-marquage* (2% paraformaldéhyde ; 0,5% glutaraldéhyde dans du tampon 0,1 M phosphate pH 7,4). Les échantillons sont ensuite transmis au Laboratoire de Microscopie électronique de la Faculté de Médecine de Nancy.

Pour les standards, les spermatozoïdes fixés sont rincés 2 fois dans le tampon Cacodylate, sur une durée de 3h. Ils sont ensuite incubés 1h à 4°C dans une solution d'acide osmique à 1% dans le tampon cacodylate. Après un rinçage avec du tampon cacodylate, les spermatozoïdes sont déshydratés par immersion dans des bains d'alcool à 30°, 50°, 70°, 80°, 90°, (5 min par bain), puis par 3 bains de 20 min dans des solutions de 100° d'alcool et par 3 bains d'oxyde de propylène. Après chaque bain, les spermatozoïdes sont centrifugés et remis en suspension. Les prélèvements sont placés pendant 1 h à température ambiante dans un bain EPON-oxyde de propylène (1 :1) avant d'être immergés toute la nuit avec de l'EPON pur

dans des tubes en verre fermés, afin de permettre l'imprégnation des échantillons. Ils sont ensuite placés dans des capsules et recouverts d'EPON frais. Ils sont mis à polymériser à 56°C dans une étuve pendant au moins 48 h. Des coupes de 70 nm sont réalisées d'un Ultracut (Reichert-Jung) et déposées sur des grilles de cuivre. Les grilles sont polymérisées à l'acétate d'uranyle à 3% à 37° pendant 30 min, puis rincées à l'eau et mises dans le colorant de Reynolds. Après rinçage à l'eau distillée et séchage, elles sont observées.

Pour les techniques d'immuno-marquage, les spermatozoïdes sont rincés 2 fois sur une durée de 3 h dans du tampon phosphate. Ils sont ensuite déshydratés par immersions successives dans des bains d'alcool à 70° (10 min), 90° (10 min) et 100° (20 min). Les prélèvements sont ensuite placés dans 2 bains successifs d'Unicryl\* à température ambiante (1 h), sous agitation douce, puis ils sont imprégnés à l'Unicryl toute la nuit. Après cela, les échantillons sont placés dans des capsules Beem et recouverts d'Unicryl frais. Ils sont mis à polymériser sous UV, à 4°C, pendant 72 h.

Des coupes de 70 nm sont ensuite réalisées et placées sur une grille en Nickel avec un film carbonné. Elles sont incubées avec du triton X100 à 0,025% dans du PBS pendant 30 min, avant d'être rincées à l'eau bidistillée 5 fois 5 min puis 2 fois 10 min. Une incubation est réalisée pendant 30 min dans du PBS à 0,1% de BSA, 0,1% de Gélatine de poisson et 0,05% de Tween 20, puis les coupes sont incubées dans le premier anticorps (sérum de souris à 1/500) dilué dans du PBS, en chambre humide à 4°C pendant la nuit. Après rinçages dans du PBS (5 fois 5 min puis 2 fois 10 min), les coupes sont déposées sur des gouttes contenant le 2<sup>ème</sup> anticorps (anti-souris couplé à des billes d'or de 10 nm, Sigma, dilué à 1/50 dans du PBS), pendant 1 h à température ambiante. Elles sont ensuite rincées de la même façon, fixées 5 min dans du Glutaraldéhyde 1% dans du PBS et de nouveau rincées. Pour le améliorer le contraste, les coupes sont incubées 30 min à l'acétate d'uranyle à saturation dans de l'eau bidistillée puis 5 min avec du colorant de Reynolds. Elles sont observées de la même façon que les standards.

#### 3.4.3.3 Evaluation de la spécificité d'organe

Les tissus (spermatozoïde, testicule, épидидyme, ovaire, cerveau, foie, muscle, poumon et rein) sont prélevés sur deux renards adultes (1 mâle, 1 femelle) de notre station d'élevage. Ils sont broyés sur glace, dans 200 µL de *solution d'extraction* (2,5% triton ; 2,5% NP40, 4% doxylate ; 0,2 mM PMSF ; 0,14 M NaCl ; 0,01 M azide de sodium ; 0,1 M tris-HCl pH 7,4). Après une centrifugation 5 min à 12000 g et à 4°C, le surnageant est conservé à -20°C.

Ces extraits d'organes sont ensuite utilisés pour des Western blot, réalisés comme décrits plus haut.

#### 3.4.3.4 Evaluation de la spécificité d'espèce

Pour l'étude de la spécificité d'espèce, des spermatozoïdes de différentes espèces sont récoltés (tableau 8).

**Tableau 8 :** Animaux utilisés pour la récolte de spermatozoïdes.

Espèce	Nombre	Origine
Campagnol ( <i>Microtus arvalis</i> )	3	Animaux sauvages, EIDLCR, 08
Chat ( <i>Fellic catus</i> )	1	Animal de propriétaire, Dr Kientz, 54
Cheval ( <i>Equus caballus</i> )	2	Haras nationaux de Rosière aux salines, 54
Chevreuril ( <i>Capreolus capreolus</i> )	4	Animaux sauvages, Fédération de Chasse, 54
Chien ( <i>Canis familiaris</i> )	2	Animal de propriétaire, Dr Garreaux, 54
Fouine ( <i>Martes foina</i> )	1	Animal sauvage, 54
Hamster ( <i>Cricetus cricetus</i> )	1	Animal de laboratoire, IFFA Credo
Humain ( <i>Homo sapiens</i> )	1	CECOS Paris
Lapin ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	3	Animaux d'élevage, 54
Ragondin ( <i>Myocastor coypus</i> )	4	Animaux sauvages, ACTA, 85
Rat ( <i>Rattus rattus</i> )	7	INSERM U308, 54
Rat musqué ( <i>Ondatra zibethicus</i> )	6	Animaux sauvages, ACTA, 85
Sanglier ( <i>Sus scrofa</i> )	1	Animal sauvage, Ph. Vuillaume, 54
Souris ( <i>Mus musculus</i> )	11	Animaux d'élevage, IFFA Credo
Taureau ( <i>Bos taurus</i> )	1	Animal d'élevage, Abattoirs, 57

Les spermatozoïdes épидидymaires sont récoltés par rétroperfusion pour les espèces suivantes : campagnol, chat, chevreuril, chien, fouine, hamster, ragondin, rat, rat musqué, sanglier, souris et taureau.

Pour le cheval et le lapin, des éjaculats sont fournis par des éleveurs, lavés au PBS et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les spermatozoïdes humains proviennent de paillettes de sperme congelé.

Ces spermatozoïdes sont ensuite utilisés pour des Western blot, réalisés comme décrit plus haut.

#### 3.4.3.5 Test de liaison spermatozoïdes – Zone Pellucide chez le renard

##### 3.4.3.5.1 : Préparation des spermatozoïdes

Du sperme est prélevé par manipulation digitale et les spermatozoïdes sont lavés par centrifugation 5 min à 600 g avec du milieu *M199-BSA 1%* (Invitrogen). Ils sont ensuite repris dans 2 mL de milieu *M199-BSA1%*, et comptés à l'aide d'une cellule de Malassez.

##### 3.4.3.5.2 : Préparation des ovocytes

Les ovaires sont prélevés chez des femelles dont le pourcentage de kératinisation des cellules vaginales varie entre 20 et 30%, ce qui correspond au début des chaleurs (Boué *et al.*, 2000). Ils sont ensuite disséqués sur un tamis posé sur une grande boîte de Pétri, et le broyat est lavé avec du milieu *M199*. Le filtrat est alors prélevé et déposé sur un filtre dont le seuil de coupure est de 40  $\mu\text{M}$  (qui va donc retenir les ovocytes, qui ont entre 50 et 100  $\mu\text{M}$  de diamètre). Le filtre est retourné sur une boîte de Pétri et lavé avec 5 mL de milieu *M199* afin de récupérer les ovocytes, qui sont déposés dans une cupule contenant 0,4 mL de milieu *M199-BSA 1%* (20 ovocytes/cupule).

#### 3.4.3.5.3 : Test de liaison spermatozoïdes-ovocytes

Les spermatozoïdes sont ajoutés à 20 ovocytes dans un volume final de 600  $\mu\text{L}$  de milieu *M199-BSA 1%*, à une concentration finale de  $10^6$  /mL, et incubés toute la nuit à 37°C sous 5% de  $\text{CO}_2$ . Pour évaluer l'action des anticorps de souris dirigés contre une protéine de spermatozoïdes de renard sur la liaison des spermatozoïdes à la ZP, les sérums S5/1 et S13/1 sont ajoutés en même temps que les spermatozoïdes à la dilution de 1/100.

Les ovocytes et les spermatozoïdes liés à la ZP sont fixés par incubation 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 4%, puis lavés 2 fois 15 min dans une solution de PBS filtré.

Les spermatozoïdes sont ensuite visualisés par coloration avec du réactif de Hoechst (bis benzimide).

Les ovocytes sont photographiés, et les images numérisées. La surface des ovocytes est divisée en unités arbitraires de surface, et le nombre de spermatozoïdes présent dans chaque unité de surface est compté.

Le nombre de spermatozoïdes fixés sur les zones pellucides est exprimé en moyenne  $\pm$  erreur standard. Les comparaisons sont effectuées en utilisant le test ANOVA suivi de Fisher PLSD. Le seuil de significativité est donné à  $p < 0,05$ .

#### 3.4.3.6 Etude de la mobilité des spermatozoïdes

Toutes ces procédures sont réalisées avec du matériel et des milieux préchauffés à 38°C. Les spermatozoïdes sont récoltés par manipulation digitale et purifiés par centrifugation 20 min à 600 g sur un gradient de Percoll (45 – 90% dans du PBS). Les spermatozoïdes sont récupérés dans la fraction 90%. Ils sont ensuite lavés dans du milieu *M-199* puis repris dans du milieu *M-199*. Une numération est réalisée à l'aide d'une cellule de Malassez. Des aliquots de 300  $\mu\text{L}$ , contenant de 30 à 60 millions de spermatozoïdes/mL de milieu *M-199* sont réalisés puis incubés soit avec les sérums de souris dirigés contre les protéines spermatiques à la dilution de 1/100, soit avec un sérum de souris naïve dilué à 1/100. Les spermatozoïdes sont transportés rapidement à la Maternité Régionale, où l'analyse de leur mobilité est réalisée moins de 2h après le prélèvement.

Pour l'analyse de la mobilité, nous utilisons un système d'analyse de trajectoires (caméra reliée à un microscope et à un ordinateur). Dix  $\mu\text{L}$  des échantillons sont observés au grossissement x150, sur une plaque maintenue à 37°C, et les paramètres de mobilité sont enregistrés (pourcentage de mobilité, VCL, VSL, ALH, VAP et linéarité).

---

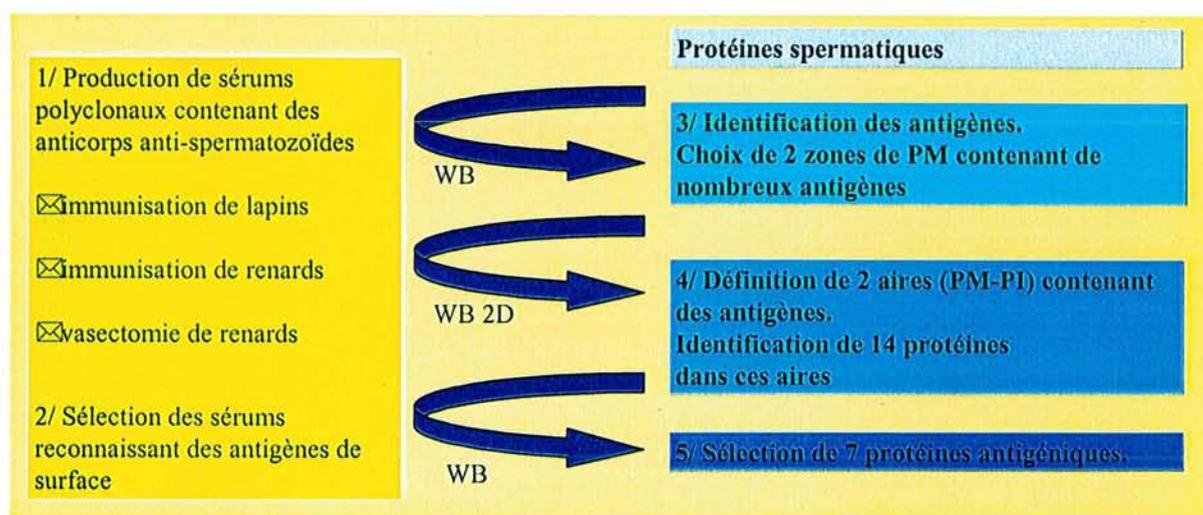
## **4. Résultats**

## 4.1 : Sélection des antigènes

### 4.1.1/ Principe

Pour obtenir des sérums reconnaissant des antigènes spermatiques de renard, nous avons utilisé deux types de stratégies : immunisation de lapins et de renards avec des protéines extraites de spermatozoïdes de renards, et vasectomie de renards. Nous avons récolté les sérums et vérifié qu'ils contenaient des anticorps dirigés contre des protéines de surface. Enfin, nous avons établi par Western blot le catalogue des antigènes reconnus.

Afin d'identifier ces antigènes, nous avons purifié les protéines spermatiques par électrophorèse en 2 dimensions et nous avons déterminé par Western blot les aires (PM-PI) contenant des antigènes reconnus fréquemment. Nous avons ensuite testé individuellement 14 protéines contenues dans 2 de ces aires pour sélectionner les plus antigéniques (Figure 14).



**Figure 14** : Démarche expérimentale suivie pour la sélection des antigènes spermatiques (WB : Western blot).

### 4.1.2/ Production de sérums polyclonaux anti-spermatozoïdes

#### 4.1.2.1 Réaction humorale anti-spermatozoïdes après l'immunisation de lapins

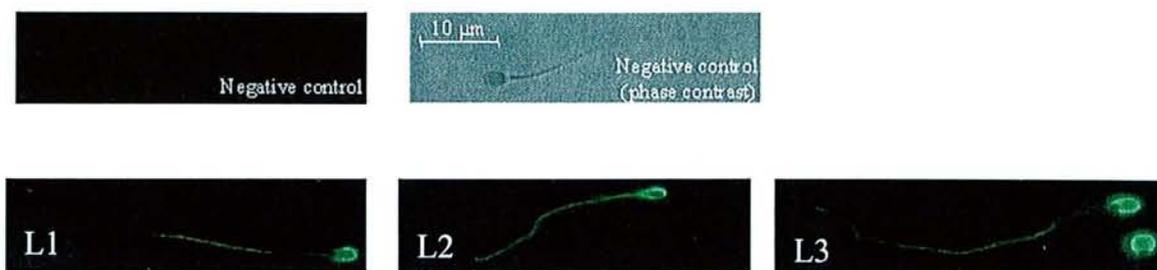
Trois lapins femelles (L1-L3) sont immunisées avec des protéines de spermatozoïdes de renard, et leur sérum est prélevé le 42<sup>ème</sup> jour.

##### 4.1.2.1.1 : Immunolocalisation d'antigènes reconnus en surface du spermatozoïde

Les anticorps produits chez les lapines sont incubés avec les spermatozoïdes de renard, puis avec des anticorps anti-lapins marqués au FITC. Les spermatozoïdes sont ensuite observés au microscope (Figure 15). Une comparaison avec les images en contraste de phase indique que plus de 90% des spermatozoïdes sont marqués.

Le marquage des spermatozoïdes est homogène pour chaque sérum utilisé. Nous observons deux types de marquage :

- un signal intense de la tête et de la pièce principale du flagelle, mais de plus faible intensité pour la pièce intermédiaire (L1) ;
- un marquage intense de la tête, de la pièce intermédiaire et de la pièce principale du flagelle (L2, L3).

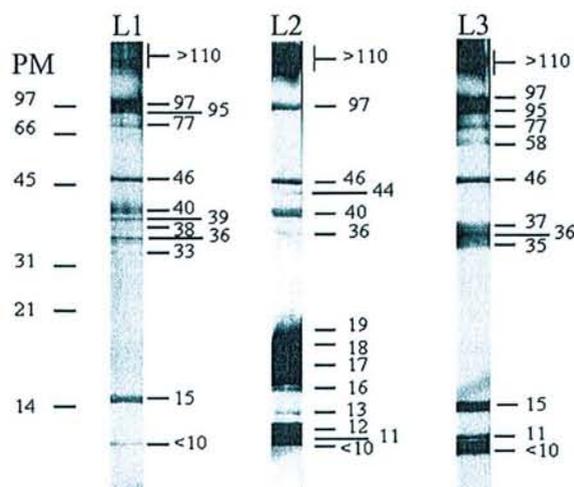


**Figure 15 :** Immunolocalisation des antigènes reconnus par les sérums des lapins sur des spermatozoïdes éjaculés de renard.

Les sérums de lapins reconnaissent donc des antigènes situés en surface ou près de la surface du spermatozoïde, sans qu’il nous soit possible à ce point du travail, d’identifier ces antigènes. La diversité des marquages obtenus suggère que plusieurs antigènes sont reconnus.

4.1.2.1.2 : Poids Moléculaire des antigènes reconnus

L’analyse en Western blot des sérums de lapins montre que chaque lapin réagit à l’immunisation en produisant des anticorps dirigés contre les protéines spermatiques. En utilisant cette technique, les sérums de lapins permettent le marquage en moyenne de 12,0 ±2,6 bandes protéiques. En tout, 23 bandes sont reconnues entre 10 et >110 kDa (Figure 16).



**Figure 16 :** Western blot d’extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec les sérums des lapins immunisés L1-3. Les poids moléculaires standards sont indiqués en kDa à gauche, et les poids moléculaires des antigènes reconnus sont indiqués à droite de chaque blot (kDa).

Parmi ces 23 bandes, 11 sont reconnues par au moins 2 sérums de lapins, et 5 sont reconnues par les 3 sérums de lapins (à >110, 97,46, 36 et 10 kDa).

#### 4.1.2.2 Réaction humorale anti-spermatozoïdes après l'immunisation de renards

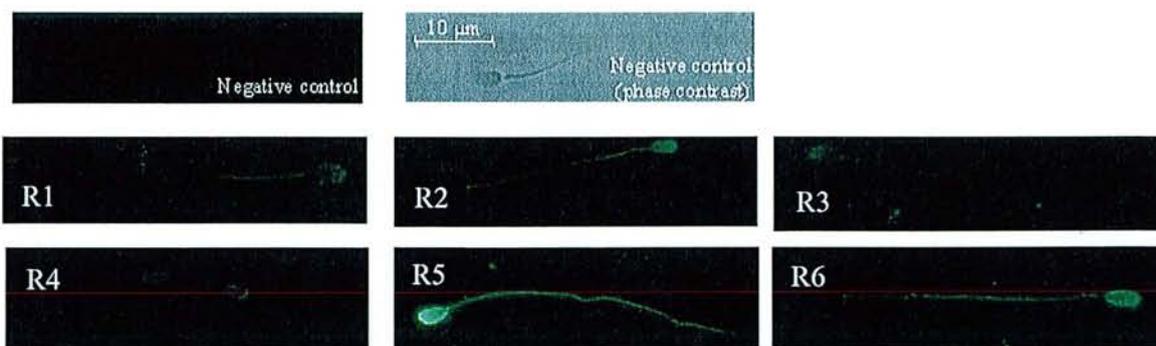
Six renards, 3 mâles et 3 femelles (R1-R6) sont immunisés avec des protéines spermatiques de renards extraites avec différents détergents, et leur sérum est prélevé à différents temps.

##### 4.1.2.2.1 : Immunolocalisation d'antigènes reconnus en surface du spermatozoïde

Les anticorps produits chez les renards sont incubés avec les spermatozoïdes de renard, puis avec des anticorps anti-chiens produit chez le lapin, et enfin avec des anticorps anti-lapin marqués au FITC. Les spermatozoïdes sont observés au microscope (Figure 17). Une comparaison avec les images en contraste de phase indique plus de 90% de marquage des spermatozoïdes, ces marquages étant homogènes pour chaque sérum utilisé. Un témoin négatif (sérum de renard non immunisé) ne montre aucun marquage significatif.

Nous observons quatre types de marquage :

- signal à la fois sur la tête et sur la pièce intermédiaire (R1, R3),
- signal sur la tête, la pièce intermédiaire et la pièce principale (R2, R6),
- signal uniquement sur la tête (R4)
- intense signal sur la tête et signal de plus faible intensité sur la pièce intermédiaire et la pièce principale (R5).



**Figure 17 :** Immunolocalisation d'antigènes reconnus par les sérums des renards immunisés R1-6 sur des spermatozoïdes éjaculés de renard.

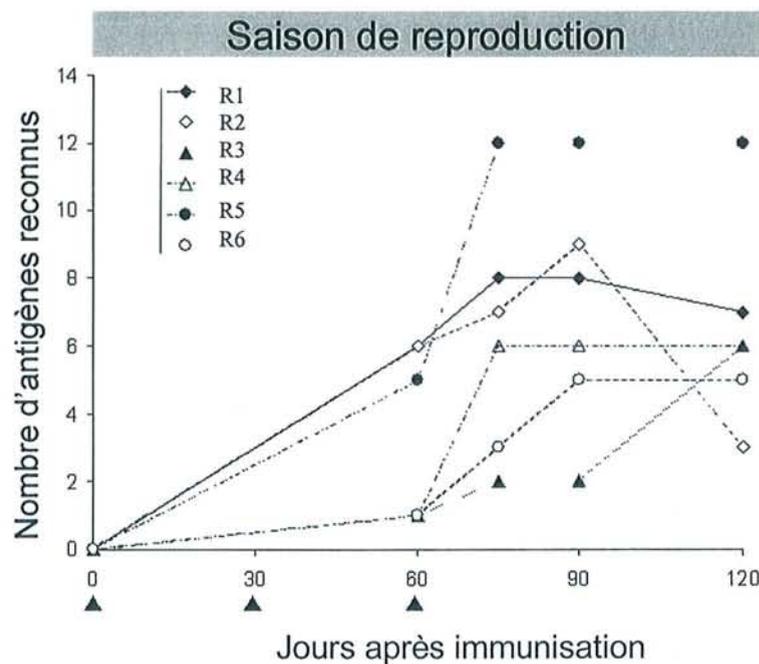
Comme les sérums de lapins, les sérums de renard reconnaissent des antigènes situés en surface ou près de la surface du spermatozoïde, sans qu'il nous soit possible, à ce point du travail, d'identifier ces antigènes. La diversité des marquages obtenus suggère que plusieurs antigènes sont reconnus.

#### 4.1.2.2.2 : Cinétique d'apparition des anticorps

L'analyse en Western blot des sérums des renards immunisés montre que chaque animal réagit à l'immunisation en produisant des anticorps anti-spermatozoïdes.

Le nombre de bandes reconnues par les sérums augmente après chaque injection, avec un maximum à J75 pour les renards R4-5, à J90 pour les renards R1-2 et R6, et à J120 pour le renard R3 (Figure 18). Aucune différence significative n'est observée entre les mâles et les femelles, quel que soit le jour considéré.

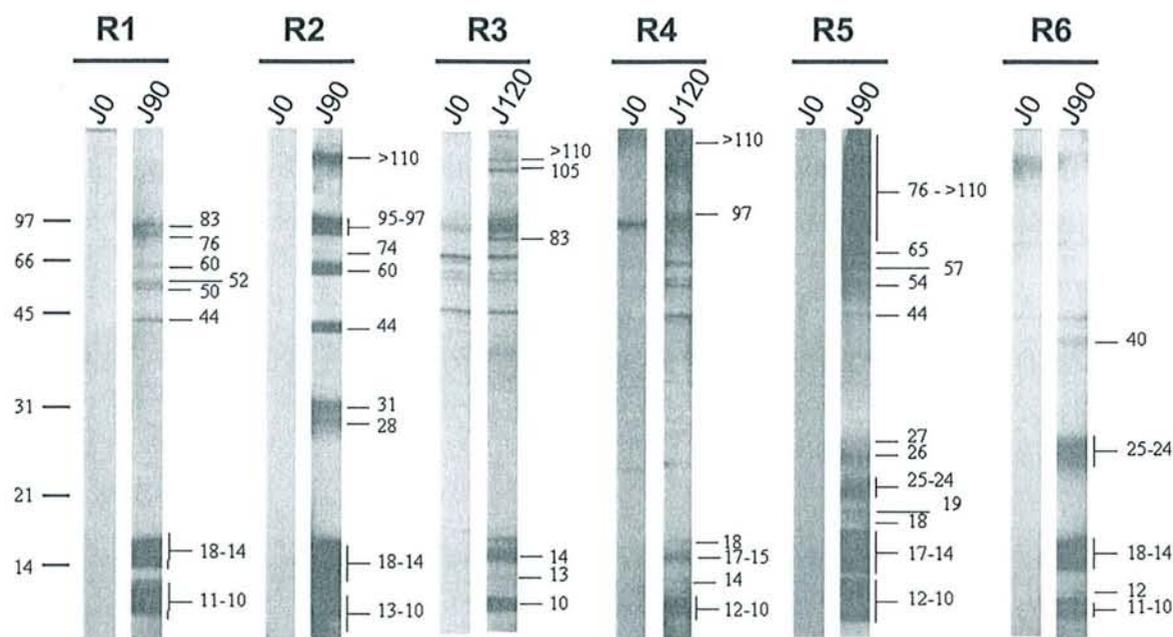
Le nombre maximal de bandes protéiques reconnues en Western blot par les sérums des mâles et des femelles est respectivement de  $8,6 \pm 3,0$  et  $6,6 \pm 2,1$ .



**Figure 18** : Cinétique d'apparition des anticorps anti-spermatozoïdes révélés par Western blot chez les renards immunisés. ▲ : immunisation.

#### 4.1.2.2.3 : Poids Moléculaire des antigènes reconnus

La Figure 19 représente l'analyse en Western blot des sérums de renards immunisés, au moment où ils reconnaissent le maximum de bandes. En tout, 25 bandes sont reconnues entre 10 et >110 kDa. Le profil des bandes reconnues varie suivant les animaux, cependant certaines bandes, en particulier à 97 kDa et à des PM inférieurs à 20 kDa, sont reconnues par la plupart des renards.



**Figure 19 :** Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec les sérums des renards immunisés R1-6 prélevés à J0 et au moment où ces sérums reconnaissent le maximum de bandes. Les poids moléculaires standards sont indiqués en kDa à gauche, et les poids moléculaires des antigènes reconnus sont indiqués à droite de chaque blot (kDa).

#### 4.1.2.3 Réaction humorale anti-spermatozoïde après la vasectomie de renards

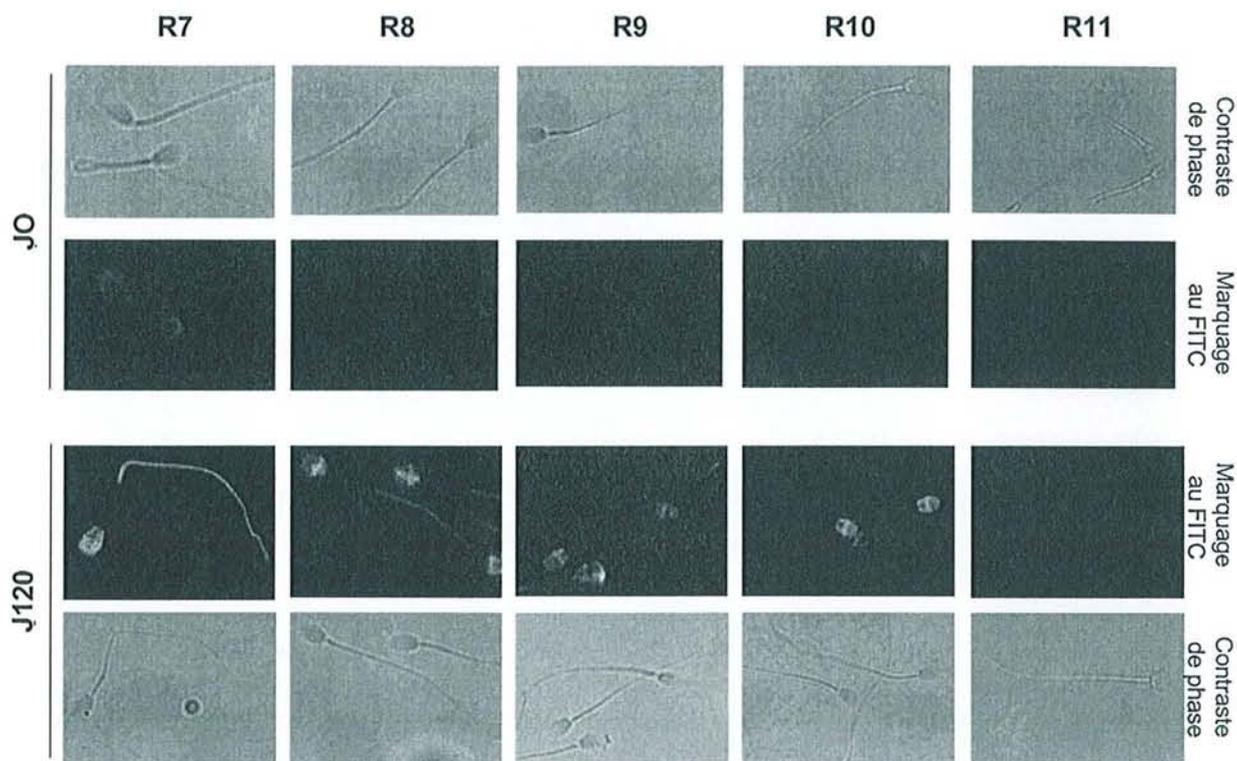
La réponse immunitaire humorale anti-spermatozoïde de 6 renards vasectomisés est suivie dans le sérum de ces animaux.

##### 4.1.2.3.1 : Immunolocalisation d'antigènes reconnus en surface du spermatozoïde

Les anticorps produits chez les renards vasectomisés sont incubés avec les spermatozoïdes éjaculés de renard étalés sur lame, puis avec des anticorps anti-chien produits chez le lapin, et enfin avec des anticorps anti-lapin marqués au FITC, avant d'être observés au microscope (Figure 20 pour le sérum des renards vasectomisés R7 à R11 prélevés à J120). Avec les sérums R11 et R12, aucun marquage significatif n'est observé. La comparaison avec les images en contraste de phase indique que plus de 90% des spermatozoïdes sont marqués avec les sérums des autres renards (R7-10). Ce marquage est homogène pour chaque sérum utilisé.

Nous observons 2 types de marquage :

- un marquage intense de la tête (R9, R10)
- un marquage intense de l'acrosome et de la pièce principale, mais pas de la pièce intermédiaire (R7, R8).



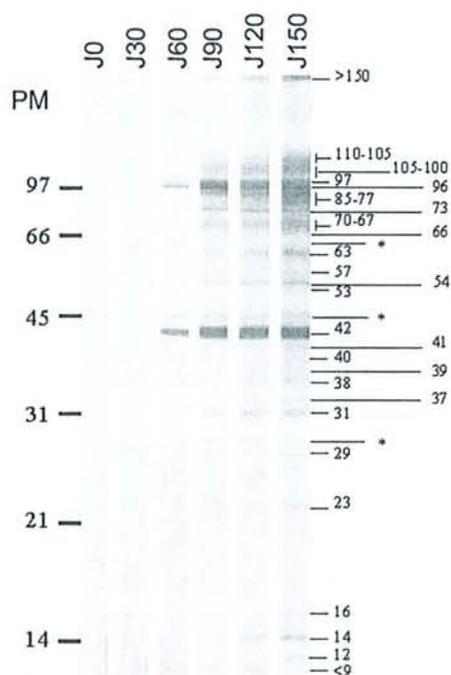
**Figure 20 :** Immunolocalisation sur des spermatozoïdes de renard des antigènes reconnus par les sérums des renards vasectomisés R7-11, prélevés à J0 et à J120.

Des antigènes situés en surface ou près de la surface du spermatozoïde sont reconnus par le sérum des renards R7-10 prélevé à J120. La diversité des marquages suggère que différents antigènes sont reconnus sans qu'il soit possible, à ce point du travail, de les identifier.

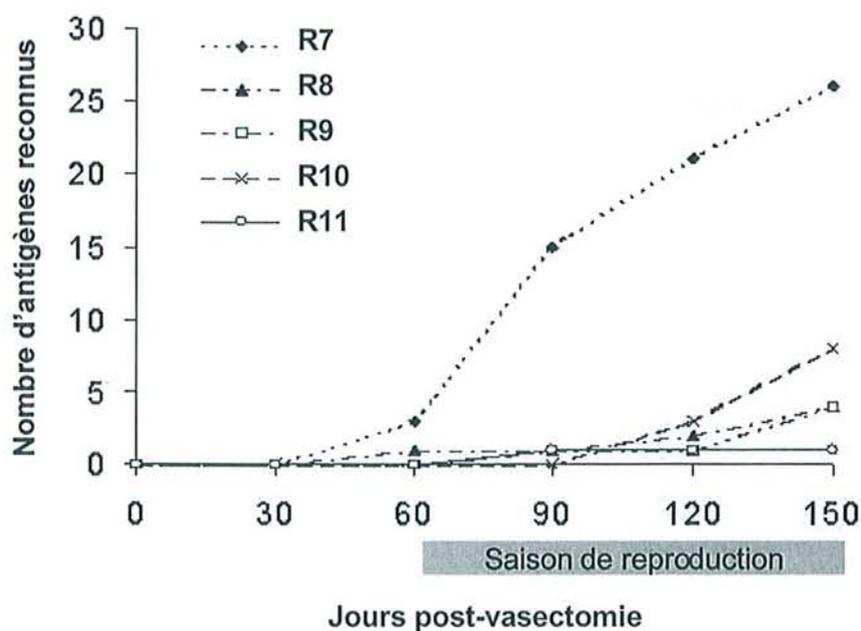
#### 4.1.2.3.2 : Cinétique d'apparition et de maintien des anticorps

L'analyse en Western blot des sérums des renards vasectomisés montre que chaque animal produit des anticorps anti-spermatozoïdes, à l'exception du renard R12.

Le nombre de bandes reconnues par les sérums ainsi que l'intensité du marquage augmentent progressivement, pour être au maximum entre les jours 120 et 150 (Figure 21). A ce moment, le nombre de bandes reconnues varie entre 1 (R11) et 26 (R7) (Figure 22).



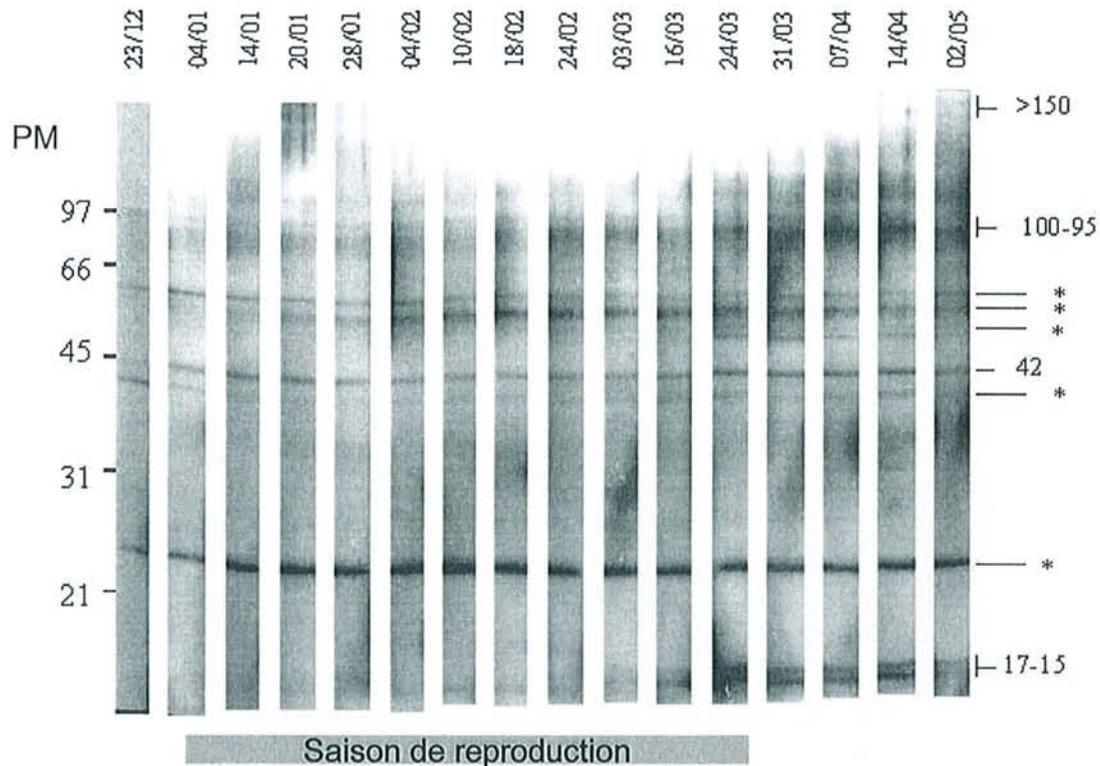
**Figure 21 :** Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec le sérum du renard vasectomisé R7 prélevé à J0, J30, J60, J90, J120 et J150. Les poids moléculaires standards sont indiqués en kDa à gauche, et les poids moléculaires des antigènes reconnus sont indiqués à droite. \* : bande marquée à J0.



**Figure 22 :** Cinétique d'apparition des anticorps anti-spermatozoïdes produits par les renards vasectomisés révélés par Western blot.

Le sérum du renard R8 est prélevé chaque semaine pendant la saison de reproduction, 2 ans après la vasectomie, et étudié en Western blot (Figure 23). Le poids

moléculaire des bandes spécifiques est constant pendant toute la saison de reproduction. Cependant l'intensité du marquage des antigènes de 17-15 et 100-95 kDa, augmente à la fin de celle-ci.



**Figure 23 :** Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard révélés avec le sérum du renard vasectomisé R8 prélevé toutes les deux semaines, deux ans après la vasectomie. Les poids moléculaires standards sont indiqués en kDa à gauche, et les poids moléculaires des antigènes reconnus sont indiqués à droite. \* : bande marquée à J0.

#### 4.1.2.3.3 : Poids Moléculaire des antigènes reconnus

Le sérum des renards vasectomisés est étudié par Western blot au moment où il reconnaît le maximum de bandes, et le poids moléculaire des bandes est déterminé. Le PM des 30 bandes reconnues entre 10 et >110 kDa est présenté dans le tableau 9. Selon les renards, de 1 (R11) à 26 (R7) bandes sont reconnues, dont 10 par au moins 2 sérums (>150 ; 105-98 ; 97 ; 95 ; 85-80 ; 45 ; 42 ; 16 ; 15 et <10 kDa).

Ces expériences nous ont permis d'obtenir des sérums reconnaissant des antigènes du spermatozoïde de renard, dont certains sont situés en surface ou près de la surface du spermatozoïde. Les expériences de Western blot suggèrent que certains des nombreux antigènes identifiés sont reconnus par des sérums provenant des différents protocoles. Il s'agit en particulier des antigènes de faible poids moléculaire (>20 kDa) et d'un antigène d'un PM de 97 kDa. Ce sont ces antigènes que nous chercherons à identifier dans la suite de ce travail.

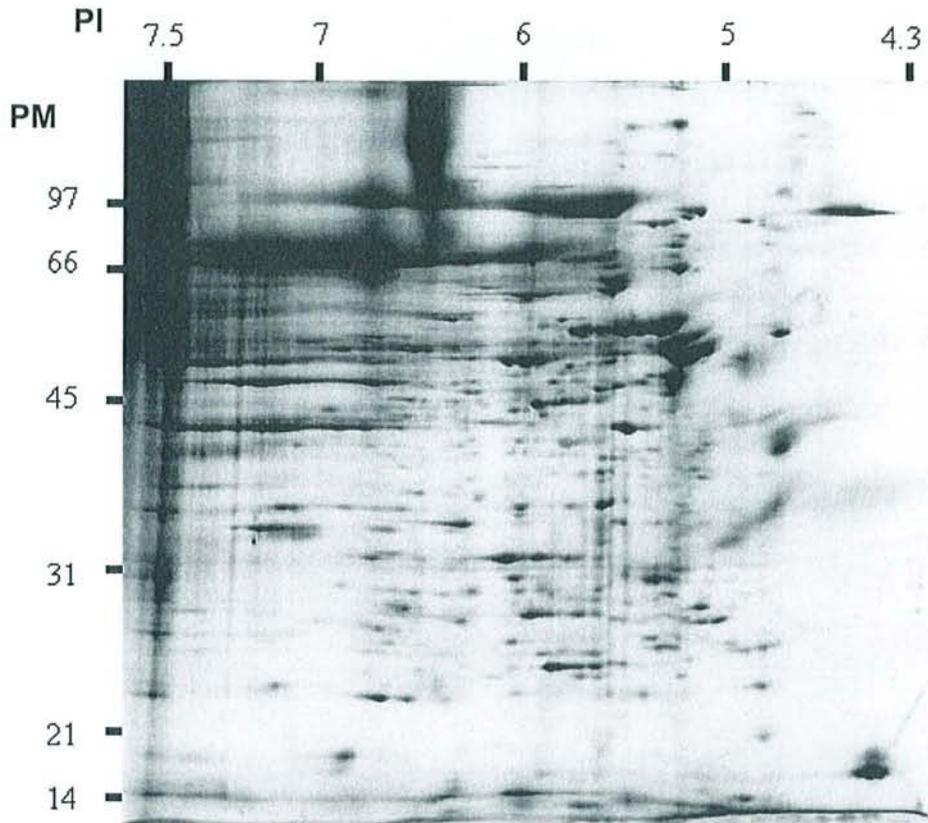
**Tableau 9 :** Poids moléculaire des antigènes spermatiques de renard reconnus par les sérums des renards vasectomisés.

Renard	R7	R8	R9	R10	R11	R12	
Jour	J150	J150	J150	J150	J120	J30-J150	
Poids Moléculaire en kDa	>150	>150	>150	>150			
	110-105						
	105-100						
	97	100-95	97	100-98			
	96		95	95			
	85-77			85-80			
	73						
	70-67						
	66						
	63						
	57						
	54						
	53			45	47-45		Pas de protéine détectée
	42	42					
	41						
	40						
	39						
	38						
	37						
	31						
29							
23							
16		17-15		17-15			
15				15	15		
14							
12							
<10				<10			

#### 4.1.3/ Localisation sur gel en 2 dimensions d'aires contenant des antigènes fréquemment reconnus

##### 4.1.3.1 Séparation des protéines spermatiques par électrophorèse en 2 dimensions

L'électrophorèse en 2D permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire et de leur point isoélectrique (PI). Le profil des gels est reproductible entre différentes migrations. La Figure 24 représente des protéines spermatiques colorées à l'argent après séparation sur un gel d'électrophorèse en 2D. Plusieurs centaines de protéines, représentées par des petits spots, sont séparées. Leur PM varie de >150 à <10 kDa, et leur PI est compris entre 6,7 et 4,3.

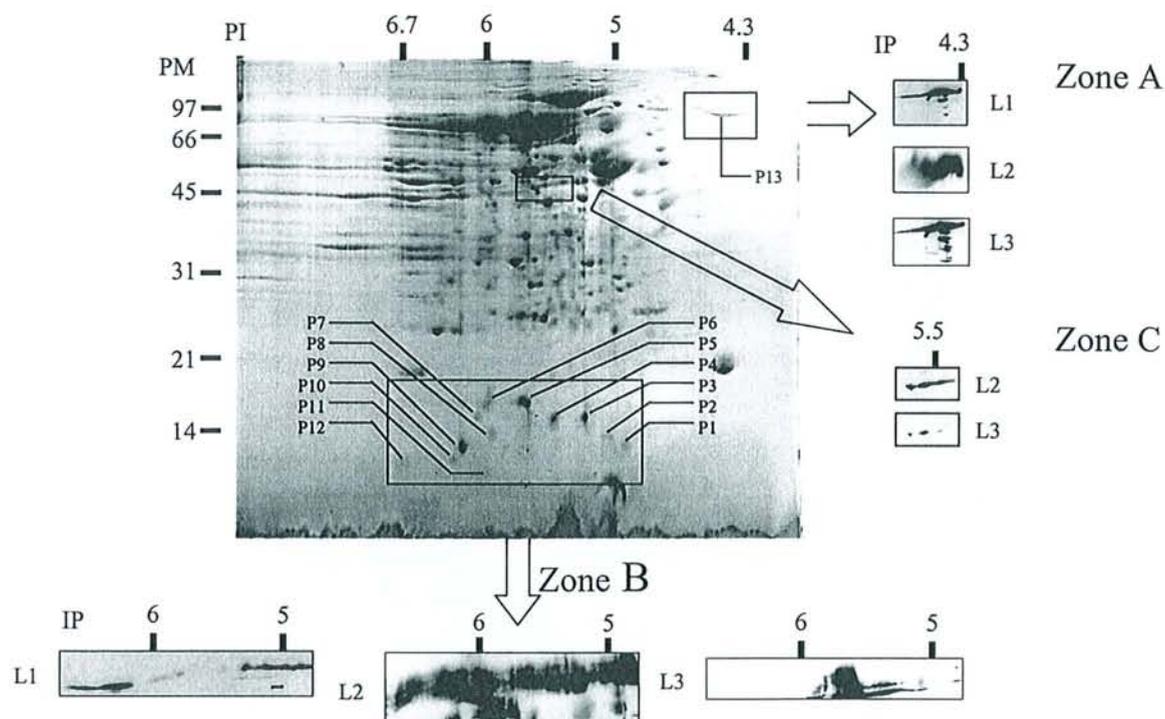


**Figure 24 :** Protéines du spermatozoïde de renard séparées par électrophorèse en deux dimensions, sur un gel à 12% d'acrylamide coloré à l'argent.

#### 4.1.3.2 Antigènes fréquemment reconnus par les sérums de lapins immunisés

Les sérums des lapins immunisés avec des protéines de renard sont utilisés pour définir par Western blot après électrophorèse en 2D, le PM et le PI des antigènes reconnus le plus fréquemment. Trois zones sont définies (Figure 25) comme contenant des antigènes fréquemment reconnus par ces sérums de lapins :

- la zone A contient une protéine d'un PM de 97 kDa et d'un PI compris entre 4,3 et 4,6 ;
- la zone B contient 12 protéines de faible poids moléculaire dont le PM est compris entre 10 et 20 kDa, et le PI entre 4,8 et 6,5 ;
- la zone C contient un triplet d'antigènes à identifier parmi de nombreuses protéines, dont le PM est de 46 kDa et le PI compris entre 5,3 et 5,7.



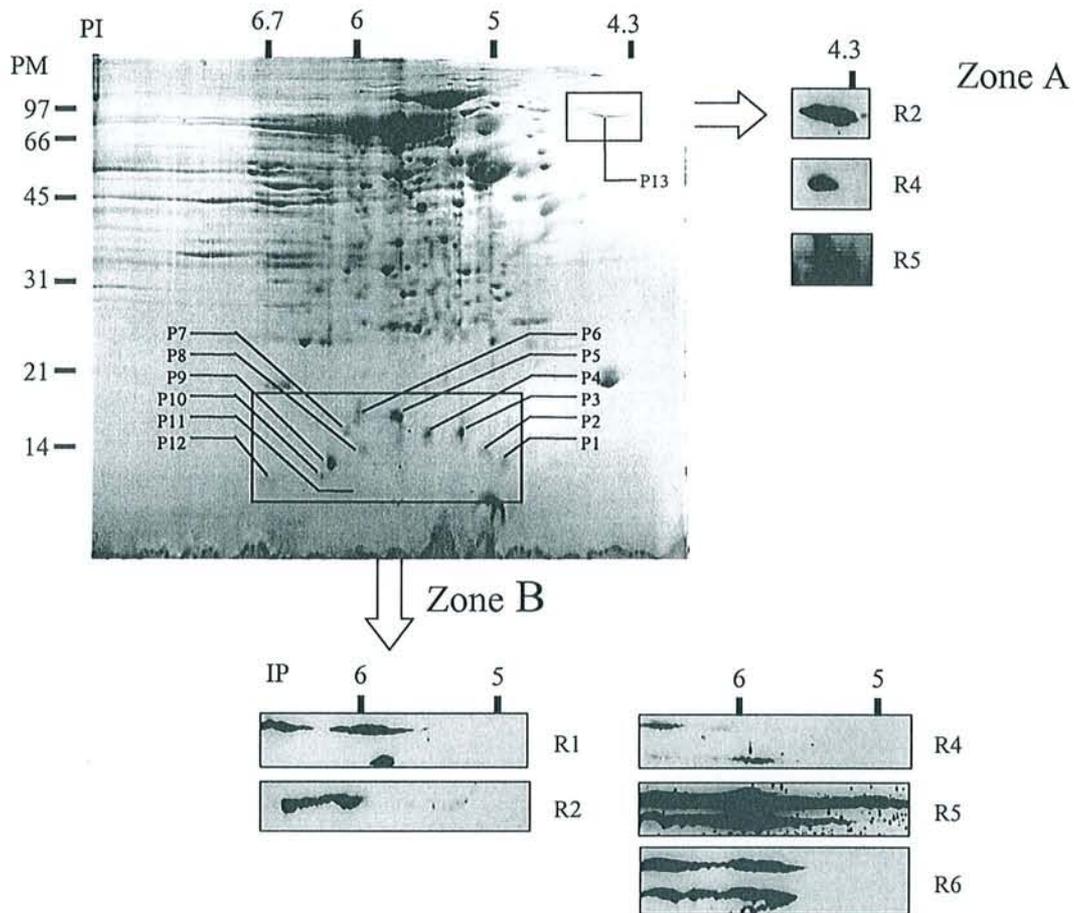
**Figure 25 :** Localisation des 3 zones sélectionnées sur gel d'électrophorèse en 2D coloré au bleu de Coomassie et identification de 13 protéines contenues dans 2 aires principales. Immunoréactivité de ces aires après Western blot réalisés avec le sérum des lapins immunisés prélevé à J42 (révélation ECL).

#### 4.1.3.3 Antigènes fréquemment reconnus par les sérums de renards immunisés

Le PM et le PI des antigènes reconnus le plus fréquemment par le sérums des renards immunisés est représenté sur la Figure 26. Deux zones principales, contenant des antigènes reconnus préférentiellement, sont définies :

- la zone A contient une protéine d'un PM de 97 kDa et d'un PI compris entre 4,3 et 4,6 ;
- la zone B contient 12 protéines de faible poids moléculaire dont le PM est compris entre 10 et 20 kDa, et le PI entre 4,8 et 6,5 ;

Ces zones correspondent à celles sélectionnées avec les sérums des lapins immunisés.

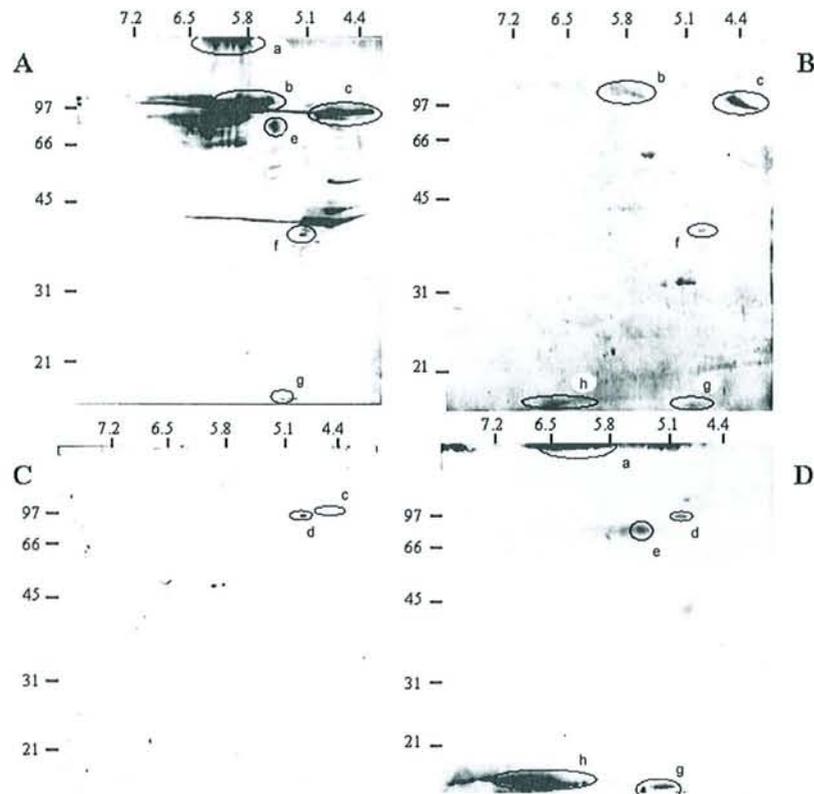


**Figure 26 :** Localisation des 2 zones sélectionnées sur gel d'électrophorèse en 2D coloré au bleu de Coomassie, et identification de 13 protéines contenues dans 2 aires principales. Immunoréactivité de ces aires après Western blot réalisés avec les sérums de renards immunisés prélevés à J90 (révélation ECL).

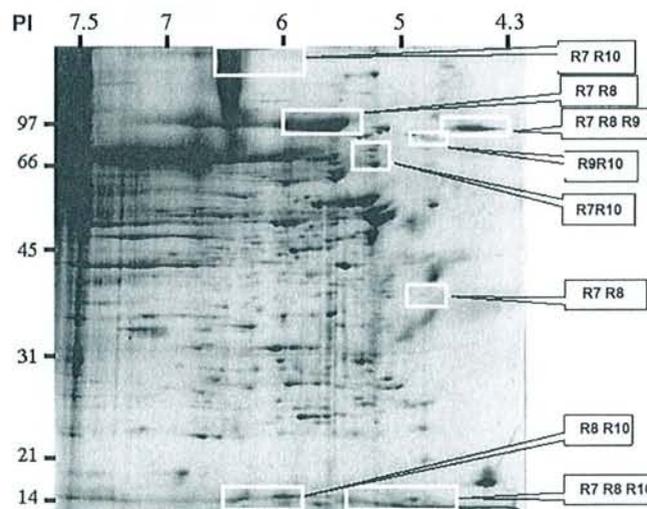
#### 4.1.3.4 Antigènes fréquemment reconnus par les sérums des renards vasectomisés

La Figure 27 représente les Western blot réalisés avec les sérums des renards vasectomisés prélevés à J120 (R7, R9) ou à J150 (R8, R10).

Avec le sérum du renard R11 (J150), aucun antigène n'est visualisé. La Figure 28 représente la localisation des 8 aires contenant des antigènes reconnus par au moins 2 sérums des renards vasectomisés. Le PM et le pI de ces aires sont précisés dans le Tableau 10.



**Figure 27 :** Western blot d'extraits protéiques de spermatozoïdes de renard séparés par électrophorèse en 2D révélés avec les sérums des renards vasectomisés R7, J120 (A) ; R8, J150 (B) ; R9 , J120 (C) et R10, J150 (D). Les antigènes reconnus par plus d'un sérum sont entourés d'un cercle et nommés de a à g. Les poids moléculaires standards sont indiqués en kDa à gauche, et les PI en haut de chaque blot.



**Figure 28 :** Localisation des 8 zones sélectionnées sur gel d'électrophorèse en 2D révélées en Western blot réalisés avec les sérums des renards vasectomisés.

**Tableau 10 :** Poids Moléculaire et Point Isoélectrique des 8 aires (*a-g*), contenant des antigènes reconnus par au moins deux sérums de renards vasectomisés.

Zones	PM (kDa)	PI	sérums
a	>150	6,6 – 6,0	R7, R10
b	105-98	6,0 – 5,5	R7, R8
c (A)	97	4,6 – 4,3	R7, R8, R9
d	95	5,0	R9, R10
e	85-80	5,4 – 5,1	R7, R10
f	42	5,0 – 4,8	R7, R8
g (B)	17-15	5,5 – 4,8	R7, R8, R10
h (B)	17-15	6,5 – 5,9	R8, R10

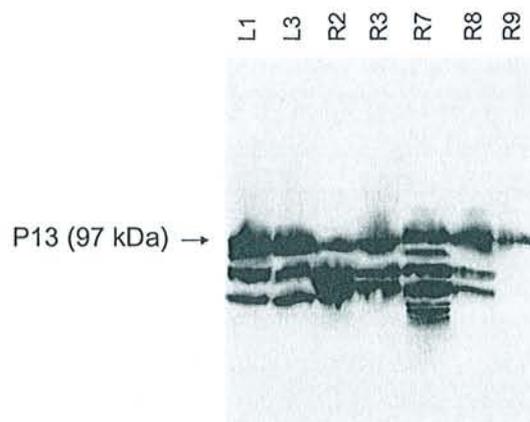
Il faut noter que la zone *c* correspond à la zone A décrite pour les protocoles d'immunisation des lapins et des renards, et que les zones *g* et *h* correspondent à la zone B. Il n'est pas possible à ce stade du travail, de déterminer quelles sont les protéines contenues dans ces aires qui sont antigéniques, en raison de la résolution des Western blots.

#### 4.1.4/ Identification de sept antigènes reconnus

Afin d'identifier les antigènes reconnus, nous avons purifié par électrophorèse en 2D les protéines spermatiques, avant de les tester individuellement par Western blot.

##### 4.1.4.1 Antigène de la zone A

Cette zone contient une seule protéine, que nous avons testée par Western blot avec les sérums provenant des 3 protocoles (Figure 29). La protéine contenue dans cette zone est bien réactive avec les sérums sélectionnés, puisqu'elle réagit avec les sérums des lapins L1, L2 et L3, des renards R2, et R5 (immunisés) et R7, R8, R9 (vasectomisés). Différentes bandes réagissent sous la bande située à 97 kDa. La protéine étant isolée et purifiée, ce résultat suggère que les sérums ont réagi avec des formes dégradées de la protéine.



**Figure 29 :** Western blot de la protéine P13 purifiée révéler avec le sérum des lapins immunisés L1 et L3, des renards immunisés R2 et R3 et des renards vasectomisés R7-9.

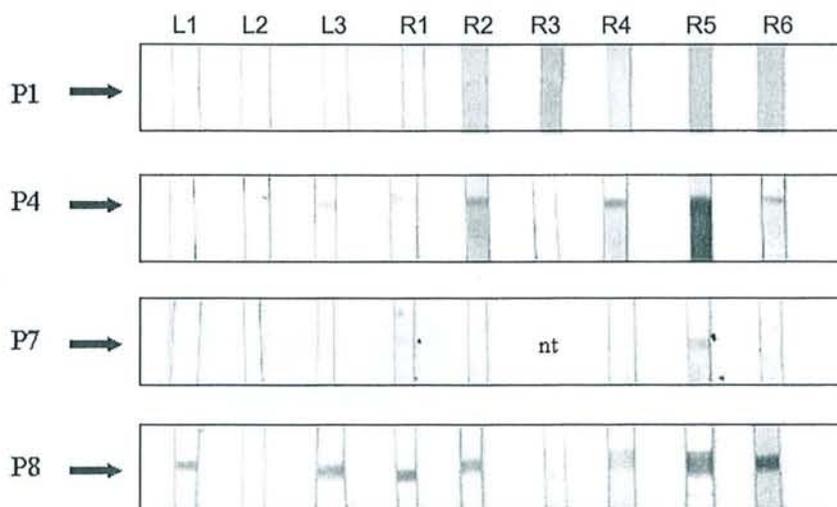
4.1.4.2 Antigènes de la zone B

Cette zone contient 12 protéines visibles après coloration des gels au Bleu de Coomassie. Ces protéines sont isolées puis testées individuellement par Western blot. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

**Tableau 11 :** Antigénicité des protéines purifiées par électrophorèse en 2 dimensions évaluée par Western blots avec les sérums des lapins et des renards immunisés (nt : non testé en raison de trop faibles quantités)

	Protéines											
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
L1	-	-	nt	-	nt	-	-	++	-	nt	-	-
L2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
L3	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	+	-
R1	-	-	-	+	-	-	+	+++	-	nt	+	nt
R2	-	-	nt	++	nt	-	-	++	-	nt	++	nt
R3	-	-	-	-	-	-	nt	-	-	-	-	-
R4	-	-	-	++	-	-	-	+	-	nt	+	nt
R5	-	-	+	+++	+	-	+	+++	-	-	+++	-
R6	-	-	+	++	+	-	-	+++	-	-	-	-

Parmi ces 12 protéines, 5 ne sont reconnues par aucun sérum : P1, P2, P9, P10 et P12, tandis que P6 n'est reconnue que par un sérum (lapin L2). Trois autres protéines sont reconnues par plusieurs sérums (P3, P5 et P7) et trois autres ont réagi avec la plupart des sérums testés (P4, P8 et P11). L'intensité de la réaction est forte pour ces trois protéines (Figure 30).



**Figure 30 :** Western blot des protéines P1, P4, P7 et P8 purifiées révélé avec le sérum des lapins (L1-3, J42) et renards (R1-6, J90) immunisés. nt : non testé

#### 4.1.5/ PM et PI des antigènes sélectionnés

Les protocoles d'immunisation et de vasectomie de renards nous ont permis d'obtenir des sérums reconnaissant des antigènes spermatiques.

Parmi ceux-ci, certains semblent fortement antigéniques, puisqu'ils réagissent avec un grand nombre de sérums provenant des 3 protocoles. Après électrophorèse en 2D, nous avons identifié 7 spots protéiques particulièrement antigéniques. Leur PM, déterminé sur gel Tris-Trycine pour les protéines de faible poids moléculaire, et leur PI sont présentés dans le tableau 12. Ce sont ces antigènes que nous avons étudiés dans la suite de ce travail afin d'en déterminer la séquence et d'en évaluer l'intérêt pour un vaccin contraceptif.

**Tableau 12 :** Poids Moléculaire (PM) et Point Isoélectrique (PI) des antigènes spermatiques sélectionnés.

Protéine	PM	PI	
P13	97	4,3-4,6	Zone A
P3	16.8	5,3	
P4	16.4	5,5	
P5	16.9	5,8	
P7	16.4	6,2	Zone B
P8	14.7	6,0	
P11	11.4	6,0	

## 4.2 : Détermination de la séquence des ADNc codant les antigènes sélectionnés

#### 4.2.1/ Microséquençage N-terminal des antigènes sélectionnés

Les 7 antigènes sélectionnés sont purifiés par électrophorèse en 2D, puis sont transmis au Service Commun de Séquençage des Protéines de l'Université de Nancy I. Afin d'identifier ces protéines, les séquences obtenues sont utilisées pour interroger la banque de données SwissProt disponible sur Internet (tableau 13).

**Tableau 13 :** Séquences N-terminale obtenues et principales homologues trouvées (entre parenthèse, le numéro d'accension EMBL des homologues).

	Séquence	Homologies principales
P3	KVYSRXELAKVLQDFGRE AY	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥66 % avec EP1 (G254390)</li> <li>P3 : 1 KVYSR ELAKVLQDF 15</li> <li>EP1 : 1 KVYSRDEEAALQDV 15</li> </ul>
P4	XXYQTDELARVLSPT	Pas d'homologue identifié

	Séquence	Homologies principales
P5	APIKVGDAIPXVXVFE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 87\%</math> avec thioredoxine peroxydase PMP20 (AF197951)  P5 : 1 APIKVGDAIPXVXVFE 16  PMP20 : 50 APIKVGDAIPXVXVFE 65</li> <li>• <math>\geq 73\%</math> avec EP3 (Q9TRP0)  P5 : 1 APIKVGDAIPXVXVFE 16  EP3 : 1 APIKRGAAIPXVXVFE 15</li> </ul>
P7	XDYENSSLWGELEXEL	Pas d'homologue identifié
P8	AXGGGVPTDDEQAT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 85\%</math> avec cytochrome oxydase (sous-unité VI) (POO428)  P7 : 1 AXGGGVPTDDEQAT 14  COB : 1 ASGGGVPTDDEQAT 14</li> </ul>
P11	Pas de séquence obtenue	
P13	PPAYDQAPEVTLQA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 % avec Fibrousheatin II (AF088868)  P13 : 1 PPAYDQAPEVTLQA 14  FS2 : 270 PPAYDQAPEVTLQA 283</li> <li>• 100 % avec CBP86 (fragment VI) (AY007205)  P13 : 1 PPAYDQAPEVTLQA 14  CBP86 : 69 PPAYDQAPEVTLQA 82</li> </ul>

Sur les 7 protéines sélectionnées, seule P11 n'a pas donné de résultat lors du séquençage NH<sub>2</sub>-terminal réalisé selon la technique d'Edman.

La protéine P3 possède une homologie avec la protéine EP1 : il s'agit d'une protéine décrite sur le spermatozoïde de porc, dont l'origine serait épидидymaire (Parry *et al.*, 1992). De même, l'un des homologues de la protéine P5 est décrit dans la même publication, il s'agit également d'une protéine épидидymaire de porc (EP3). Cependant, P5 présente aussi de nombreuses homologies avec différentes peroxydases identifiées dans différentes espèces (homme, babouin, porc, souris, drosophile...). Il faut noter que seule la séquence NH<sub>2</sub>-terminale de EP1 et EP3 a été décrite.

La protéine P8 présente une forte homologie avec le cytochrome-C oxydase. Cette protéine existe dans de nombreux tissus (foie, cerveau, muscle,...) de différentes espèces (homme, taureau, rat, souris, ...). Elle est associée aux membranes, notamment celles des mitochondries, et a un rôle dans le transfert des électrons. Son ARNm est connu (500 pb).

L'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine P13 présente une homologie de 100% avec des segments internes des protéines Fibrousheatin II (FS2) et de la Calcium Binding Protein (CBP86-VI). Ces deux protéines ont été décrites récemment chez l'homme. Il s'agit de protéines spermatiques spécifiques du testicule, qui sont phosphorylées pendant la capacitation. La partie peptidique de FS2 a un poids moléculaire de 53 kDa, et possède 493 acides aminés. Chez l'homme, la protéine CBP86 semble être une forme de la protéine FS2 tronquée dans son extrémité NH<sub>2</sub>-terminale.

Enfin, les deux protéines P4 et P7 ne présentent pas d'homologies significatives avec des protéines déjà décrites.

#### 4.2.2/ Amplification et séquençage d'un fragment d'ADNc codant ces antigènes

##### 4.2.2.1 Amplification d'un fragment d'ADNc à partir des ARNm

Cette méthode se déroule en deux étapes : extraction et purification des ARNm à partir de testicule ou d'épididyme de renard, et synthèse d'un brin d'ADNc suivi d'une amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

##### A- Choix de l'amorce spécifique du gène : exemple de P3

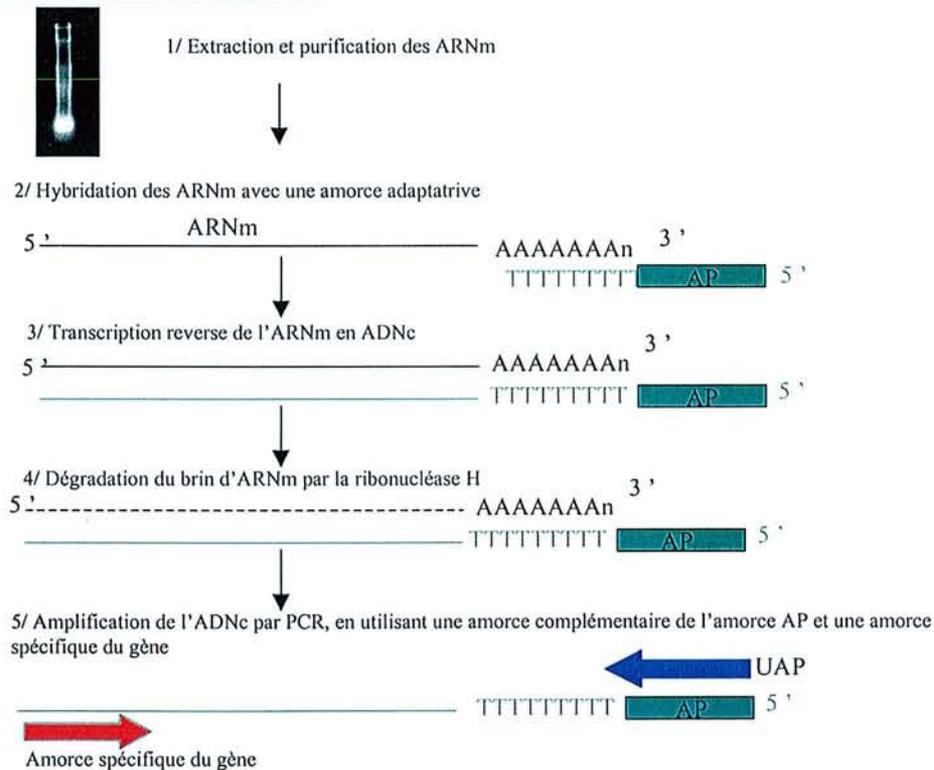
KVYSRXELAKVLQDFGREAY

séquence NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine

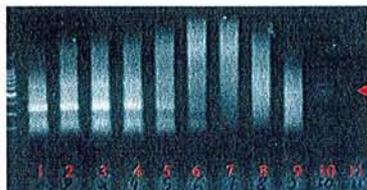
AArGTnTAywsnmGnnnnnGArYtnGcN AArGTnyTnCArGAyTTyGG nmGnGARGCnTAy

séquence en acides nucléiques correspondant. Cette séquence est dégénérée : plusieurs codons peuvent exister. En rouge, amorce choisie pour la PCR, en raison de la proportion de nucléotides sans ambiguïté

##### B- Principe de la 5' RACE PCR



##### C- Mise au point de la PCR par ajustement de la température d'hybridation

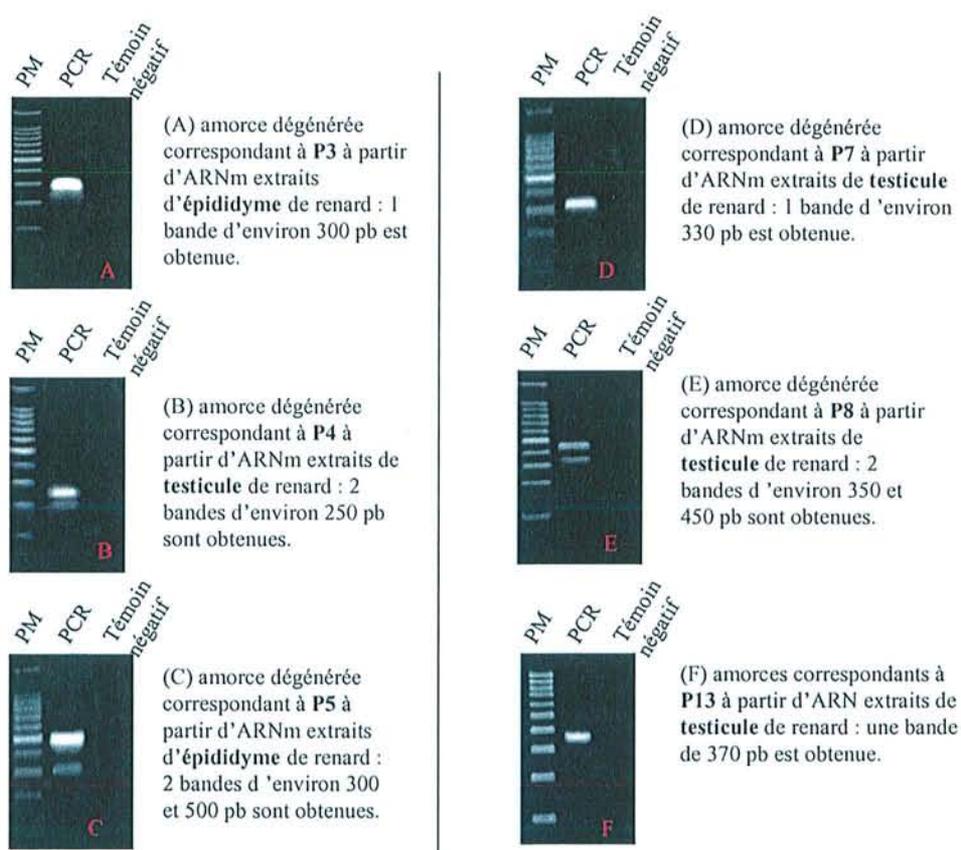


Il n'est pas possible de déterminer la T<sub>m</sub> théorique, puisque nous utilisons un cocktail d'amorces. Nous avons donc testé ici des T<sub>m</sub> comprises entre 52 et 70°(1-10 ; 11 : témoin négatif). D'après ces résultats, nous avons choisi une T<sub>m</sub> de 70°. Nous avons alors fait varier la concentration de MgCl<sub>2</sub>, avant de repréciser la T<sub>m</sub> optimale à la concentration choisie (1 mM), elle était alors de 65°C.

Figure 31 : Principe de la 5' RACE PCR : choix des amorces (A), démarche expérimentale (B) et ajustement des conditions de PCR (C).

L'amplification est réalisée à partir d'ARN extrait à l'aide d'une solution commerciale, le Trizol (Life technologies). La qualité des ARN est vérifiée par migration sur gel d'agarose (formes dégradées) et mesure de l'absorbance à 260 et à 280 nm (pureté). Les ARNm sont ensuite purifiés grâce au kit commercial Oligotex mRNA purification kit (Qiagen).

Pour la RACE-PCR, dont le principe est représenté sur la Figure 31, les ARNm sont transcrits en ADNc à partir d'une amorce adaptatrice. Après destruction du brin ARN des hétéro-duplex ADN-ARN, une PCR est réalisée entre cette amorce adaptatrice et une amorce spécifique des gènes étudiés. La séquence de cette amorce est déduite de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale des protéines séquencées : le code génétique étant dégénéré, un cocktail d'amorces est utilisé, ce qui impose une mise au point importante des conditions expérimentales de la PCR : température d'hybridation, concentration en amorces, concentration en MgCl<sub>2</sub>.



**Figure 32** : Résultats obtenus par 5' RACE PCR (A-E) et par RT-PCR (F).

En utilisant les amorces dégénérées déduites de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale des antigènes sélectionnés, nous avons obtenu un produit de RACE-PCR migrant sous forme d'une ou deux bandes simples en gel d'agarose (Figure 32). Dans le cas de P13, nous n'avons pas utilisé la RACE-PCR, mais une RT-PCR en utilisant des amorces déduites de la séquence de l'homologue humain FS2. Les ARN utilisés sont extraits de testicule de renard. La synthèse du brin d'ADNc se fait à partir d'une amorce oligo dT, c'est à dire à partir de

l'extrémité 3' des ARNm, et la PCR avec les amorces spécifiques de FS2. Cette stratégie nous a permis d'amplifier un fragment de 369 pb.

#### 4.2.2.2 Clonage et séquençage des ADN

Les amplicons obtenus sont purifiés à partir des gels d'agarose et insérés dans le plasmide pUC18/SmAI. Ces plasmides sont ensuite transfectés dans des bactéries DH5 $\alpha$ , qui sont mises en culture. En raison de la présence dans le vecteur d'un gène de résistance à l'ampicilline, seules les bactéries les ayant incorporés vont être en croissance. Le site d'insertion cible de ces vecteurs est situé dans le gène de LacZ. Pour les bactéries ayant incorporé les vecteurs, l'expression du gène de LacZ est inhibée, et les colonies sont blanches. A l'inverse, sans l'insert, la séquence du gène de LacZ est exprimée et les colonies sont bleues. Afin de confirmer que les colonies blanches ont bien incorporé le plasmide, une PCR de criblage est réalisée avec des amorces correspondant aux bras du vecteur pUC18/SmAI. Les clones n'ayant pas incorporé les produits de ligation ont une taille de 137 pb.

Les plasmides ayant incorporé les produits de PCR sont purifiés puis séquencés. Les séquences obtenues sont comparées à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale déterminée par le microséquençage d'Edman afin de valider ces résultats. En raison des amorces utilisées pour la RACE PCR, il arrive que l'on amplifie des fragments correspondant à des gènes de protéines non-cibles. Par exemple, en cherchant à amplifier le gène de P5, nous avons amplifié un gène correspondant à une autre protéine déjà identifiée chez le chien, *Rab11* (Tableau 14), en raison de la fixation non spécifique de l'amorce AP sur les deux extrémités de ce gène. Seul le séquençage permet de mettre en évidence que le fragment d'ADN amplifié correspond au gène de la protéine recherchée.

**Tableau 14 :** Séquence de la protéine vulpine *Rab11* déterminée par séquençage d'un fragment de RACE PCR.

- 
- Méthode : RACE PCR
  - Organisme : renard (*Vulpes vulpes*)
  - Tissu : testicule
- 

#### Séquence de *Rab11* :

```

1  ACTATCTCTT CAAANTTGTC CTTATTGGAG ATTCTGGTGT TGGAAANAGT
51  AATCTCTTGT CTCGATTTAC TCGAAATGAG TTTAATCTCG AAAGTAANAG
101 CACCATTGGA NTANAGTTTG CAACAAGAAN CATCCAGGTT GATGGGAAAA
151 CAATANAGGC NCAGATATGG GACACAGCAG GGCAGGAGCG ATACCGAGCT
201 ATGGACATCA GCATATTATC GTGGAGCTGT AGGTGCCTTA CTGGTGTATG
251 ACATTGCTAA GCATCTCNCG TATGAAAATG TANAACGATG GCTGAAAGAA
301 CTGAGAGGTC ATGCTGATAG TAACATTGTT ATCATGCTTG TGGGCAATAA
351 GAATGATTTG CGTCCTCTCC GGGCAGTTCC NACAGATGAA CCCAGAACGT
401 TTGCCCAAAA AATGGTTGTC GGTCATGAGA CTCCCTCCAA CACACTATNT
451 AAACNGCTGN AAAAA

```

---

Par cette méthode, nous avons amplifié et séquencé des fragments d'ADN ayant de fortes homologies avec les séquences correspondant à la séquence d'Edman établie pour les 6 protéines sélectionnées. Pour les protéines P8 et P13, ces fragments sont utilisés pour cribler une banque d'ADNc de testicule de renard que nous avons réalisée. Pour les autres protéines, pour lesquelles le criblage de la banque est en cours de réalisation, les séquences d'ADNc sont transcrites en acides aminés puis analysées.

4.2.2.3 Réalisation et criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard

Une banque d'ADNc est réalisée à partir d'ARNm de testicule de deux renards fertiles, à l'aide d'un kit commercial (ZAP Express cDNA gigapack III gold cloning kit, Stratagene). Cette banque est titrée et amplifiée. Après amplification, nous disposons de 40 mL de banque dont le titre est de 60000 phages/μL.

Des sondes correspondant aux fragments de PCR de P8 et P13 sont marquées à la DIG, et utilisées pour cribler la banque d'ADNc par Southern blot. Pour chacune des sondes, trois sous-criblages sont nécessaires pour isoler des bactériophages contenant l'ADNc cible. Par cette technique, nous avons isolé les plages de lyse contenant des séquences complémentaires des deux sondes utilisées. Après vérification par PCR de la taille des inserts, ces colonies sont séquencées par la technique de *Gene Walking*, nous permettant d'obtenir des séquences complètes de P8 et P13.

**4.2.3/ Séquences des protéines sélectionnées**

4.2.3.1 Protéine P3

4.2.3.1.1 Séquence obtenue

Par RACE PCR réalisée à partir d'ARNm d'épididyme de renard, des amplicons d'une taille d'environ 300 pb sont obtenus. Ces amplicons sont incorporés à un plasmide puis séquencés (tableau 15).

**Tableau 15 :** Séquence de l'ADNc obtenue par RACE PCR réalisée avec l'amorce dégénérée correspondant à P3, et acides aminés (AA) correspondant. Les acides aminés soulignés correspondent à ceux donnés par la séquence d'Edman. Les AA déterminés par le séquençage d'Edman mais non confirmés à partir de la séquence de l'ADNc sont entre parenthèses.

---

- Méthode : RACE PCR
- AC SwissProt : P83198

---

- Organisme : renard (*Vulpes vulpes*)
- Tissu : épididyme

---

Séquence de P3 :

1	AAG	GTT	TTG	CAG	GAT	TTC	GGG	GCT	CGG	GCT	CTT	GGA	TTC	AGG	GTA	45
KVYSRXELA	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	A	R	<u>A</u>	L	G	F	R	V	24
								(R)	(E)		(Y)					

---

46	CTT	TTA	TTG	TTC	TTG	TTA	CTG	TTG	CTT	ATA	AGA	AGC	AAA	TAT	CAA	90
25	L	L	L	F	L	L	L	L	L	I	R	S	K	Y	Q	39
91	AAG	ACT	TTC	TTC	AGT	GGA	ATA	GAA	TAT	TGA	GTA	TTT	TCA	GCC	AAT	135
40	K	T	F	F	S	G	I	E	Y	*	V	F	S	A	N	54
136	GAT	ACT	TTC	AAA	GTG	GGT	GGT	GTG	AAA	GGA	GAG	AGG	AGA	TAT	GCC	180
55	D	T	F	K	V	G	G	V	K	G	E	R	R	Y	A	69
181	AAG	AGC	CAT	TTT	ATT	TGG	AGG	TCC	CTA	TTT	TTA	TAG	CCT	ATT	TTA	225
70	K	S	H	F	I	W	R	S	L	F	L	*	P	I	L	84
226	CTT	ACA	TCT	AGA	AAA	GCA	GAC	TCA	CTT	CTG	AAT	AAA	ATC	GAC	ATT	270
85	L	T	S	R	K	A	D	S	L	L	N	K	I	D	I	99
271	TAT	CGT	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	291								
100	Y	R	K	K	K	K	K	106								

#### 4.2.3.1.2 Analyse de la séquence

##### 4.2.3.1.2.1 Homologues

Une interrogation des banques de données SwissProt réalisée avec la séquence de P3 en acides aminés n'a pas montré d'homologie significative, en plus de celle déjà déterminée (EP1, tableau 13).

##### 4.2.3.1.2.2 Prédiction de propriétés de la protéine P3

Les prédictions réalisées à partir de la séquence primaire de P3 sont présentées dans le tableau 16. Celles-ci sont à considérer avec précaution, la séquence de P3 obtenue par RACE-PCR devant être confirmée par criblage d'une banque d'ADNc d'épididyme de renard.

**Tableau 16 :** Prédictions réalisées à partir de la séquence de P3 obtenue par RACE-PCR.

P3	Prédictions	Sites
PM	11,8 kDa (16,8 kDa sur gel)	
PI	11,4 (5,3 sur gel)	
Sites particuliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ N-glycosylation</li> <li>➤ Phosphorylation par protéine kinase C</li> <li>➤ Phosphorylation par casein kinase II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ NDTF : 54-57</li> <li>➤ [ST]X[RR] : 56-58 ; 86-88 ; 87-89</li> <li>➤ [ST]XX[DE] : 44-47 ; 52-55</li> </ul>
Sites antigéniques	4 sites	31-40 ; 48-68 ; 82-94 ; 97-101
Région trans-membranaire	1 région déterminant une zone extracellulaire	23-30
Structure secondaire	Hélice $\alpha$ majoritaire	Hélice : 1-39 ; 75-79 ; 81-115 Feuillet : 40-44 ; 46-52 ; 58-61 Coude : 52-55 ; 61-65

4.2.3.2 Protéine P4

4.2.3.2.1 Séquence obtenue

Par RACE PCR réalisée à partir d'ARNm de testicule de renard, deux amplicons d'une taille de 230 et 250 pb sont obtenus. Ces fragments sont incorporés à un plasmide puis séquencés. Seule une de ces bandes présente une homologie avec la séquence établie selon la technique d'Edman (tableau 17).

**Tableau 17 :** Séquence de l'ADNc obtenue par RACE PCR réalisée avec l'amorce dégénérée correspondant à P4 et acides aminés correspondant (en bleu).

- Méthode : RACE PCR
- AC SwissProt : P83199
- Organisme : renard (*Vulpes vulpes*)
- Tissu : testicule

Séquence de P4 :

1	TAT CAG ACT GAC GAG TTG GCC CAG GAG TTC CGC AAG TTC GAC CTG	45
XX	<u>Y Q T D E L A</u> Q E F R K F D L	17
	(R) (V) (L) (S) (P) (T)	
46	AAC AGC CCG TGG GAG GCC TTT CCT GCC TAT CGA CAG CCC CCT GAG	90
18	N S P W E A F P A Y R Q P P E	32
91	AGT CTC AAG CTT GAA GCC GGA GAC AAG AAA CCT GAA ACC AAG TAG	135
33	S L K L E A G D K K P E T K Z	47
136	CTT CAG GGA AGG CAT GTG GAT ACT AGA AAG TGT TTA ACC TCT AAC	180
48	L Q G R H V D T R K C L T S N	62
181	TGA GCA TCC CTG TAA ATA AAA TCT GTA GAC CAA CAA AAA AAA AAA	225
63	Z A S L Z I K S V D Q Q K K K	77
226	AAA 228	
78	K	

4.2.3.2.2 Analyse de la séquence

4.2.3.2.2.1 Homologues

Une interrogation des banques de données SwissProt réalisée avec la séquence de P4 en acides aminés montre une homologie significative (Figure 33) avec le précurseur mitochondrial de la NADH ubiquinone oxydoreductase (décrite chez l'humain et chez le bovin, numéro d'accèsion P23709).

	180	*	200	*	220	*	
P4	:	-----	-----	-----	-----	YQTD	ELAQEFRKFD : 14
NADH ubi:	VFFANHPDLRRILTDYGFEGHPFRKDFPLSGYVELRYDDEVKRVVAEPV						ELAQEFRKFD : 236
	240	*	260	*	280	*	
P4	:	LNSPWEAFPAYRQPPE	SLKLEAGDKKPE	TKZLQGRHVDTRKCLTSNZASLZIKSVDQQK	:	73	
NADH ubi:	LNSPWEAFPAYRQPPE	SLKLEAGDTKPEAK	-----	-----	-----	-----	: 266

	300	*	320	*	340	*	
P4	: KKK	-----	-----	-----	-----	-----	: 76
NADH ubi:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -

**Figure 33 :** Homologie entre la séquence de la protéine P4 et celle du précurseur mitochondrial de la NADH ubiquinone oxydoreductase.

4.2.3.1.2.2 Prédiction de propriétés de la protéine P4

Les prédictions réalisées à partir de la séquence primaire de P4 sont présentées dans le tableau 18. Celles-ci sont à considérer avec précaution, la séquence de P4 obtenue par RACE-PCR devant être confirmée par criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard.

**Tableau 18 :** Prédictions réalisées à partir de la séquence de P4 obtenue par RACE-PCR.

P4	Prédictions	Sites
PM	8,2 kDa (16,4 kDa sur gel)	
P I	9,3 (5,5)	
Sites particuliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Phosphorylation par protéine kinase C</li> <li>➤ Phosphorylation par casein kinase II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ [ST]x[RK] : 26-28</li> <li>➤ [ST]xx[DE] : 12-15</li> </ul>
Sites antigéniques	3 sites	22-30 ; 32-43 ; 65-71
Région trans-membranaire	aucune région transmembranaire	
Structure secondaire	Hélice α majoritaire	Hélice : 3-15 ; 18-21 ; 30-37 ; 41-48 ; 65-76 Feuillet : 52-58 Coude : 15-18 ; 22-30 ; 48-51 ; 58-63

4.2.3.3 Protéine P5

4.2.3.3.1 Séquence obtenue

Par RACE PCR réalisée à partir d'ARNm d'épididyme de renard, deux amplicons d'une taille d'environ 300 et 450 pb sont obtenus. Ces fragments sont incorporés à un plasmide puis séquencés. Seule le fragment d'environ 450 présente une homologie avec la séquence établie selon la technique d'Edman (tableau 19).

**Tableau 19 :** Séquence de l'ADNc obtenue par RACE PCR réalisée avec l'amorce dégénérée correspondant à P5 et acides aminés correspondant (en bleu).

- Méthode : RACE PCR
- AC SwissProt : P83200
- Organisme : renard (*Vulpes vulpes*)
- Tissu : épididyme

## Séquence de P5 :

1	AAA GTS GGW GAC GCK ATC CCA ACT ACC TTG GAG ACC TCA TCA TGG CTC	19
	API <u>K V G N A I P T</u> T L E T S S W L	
	(D) (V) (V) (F) (E)	
49	TGG CCT GGT CCT TGC CTT GTG GAG TGT CTC ACC TGC TAC CCT ACT TYT	
20	W P G P C L V Q C L T C Y P T S/F	35
97	ACY TCY TCT ACT TCR CGG CAC TAC TGG TAC ACC GTG AGG CCC GGG ATG	
36	T S S T S R H Y W Y T V R P G M	51
145	AGC AGC AGT GCC TGC AGA AGT ATG GCC TGG CCT GGC ATG AAT ACT GTC	
52	S S T A C K T M A W P G M N T V	67
193	GGC GTG TGC CTT ACC GAA TCC TGC CCT ACA TCT ACT GAA GCA GCT CCA	
68	G V C L T Q S C P T S T Q A A P	83
241	CTC ACC CCA GAC TGG GGC ATG TGC ACT CAG CAC CAG GAG CCT GGA CTC	
84	L T P N W G M C T Q H Q E P G L	99
289	CTA CCC TGC TCC AAG CTC CAA CAA GCA GGG GAT GAA CAG CCC GAG AGA	
100	L P C S K L Q Q A G R E Q P E R	116
337	GGT GCT CTG GAG CAA GGA GAA ATG AAG CCA GTG CCC AAA AAT GGA GTG	
117	G A L E Q G E M K P V P K N G V	131
385	GAG GGG CTG TTC TTT CTC CTT GGA TAA ACA TCT AGA AAC CAA AAA AAA	
132	E G L F F L L G *	139
432	AAA	

## 4.2.3.3.2 Analyse de la séquence

## 4.2.3.3.2.1 Homologues

Une interrogation des banques de données SwissProt réalisée avec la séquence de P5 en acides aminés ne montre aucune homologie significative avec des protéines déjà décrites, en plus de celles déjà obtenues avec la séquence d'Edman (péroxydase, EP3).

## 4.2.3.3.2.2 Prédiction de propriétés de la protéine P5

Les prédictions réalisées à partir de la séquence primaire de P5 sont présentées dans le tableau 20. Celles-ci sont à considérer avec précaution, la séquence de P5 obtenue par RACE-PCR devant être confirmée par criblage d'une banque d'ADNc d'épididyme de renard.

**Tableau 20** : Prédictions réalisées à partir de la séquence de P5 obtenue par RACE-PCR.

P5	Prédictions	Sites
PM	15,0 kDa (16,9 sur gel)	
PI	7,8 (5,8 sur gel)	
Sites particuliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Phosphorylation par protéine kinase C</li> <li>➤ Phosphorylation par casein kinase II</li> <li>➤ Attachement des lipides sur les lipoprotéines membranaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ [ST]X[RK] : 39-41 ; 46-48</li> <li>➤ [ST]XX[DE] : 11-14</li> <li>➤ NTVGVCLTQSC : 65-75</li> </ul>
Sites antigéniques	6 sites	9-14 ; 29-44 ; 47-53 ; 69-78 ; 88-94 ; 102-128

Régions trans-membranaires	2 régions trans-membranaires déterminant 1 région extracellulaire et 2 régions intracellulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Trans-membrane : 22-32 ; 71-74</li> <li>➤ Extracellulaire : 32-70</li> <li>➤ Intracellulaire : 1-21 ; 75-128</li> </ul>
Structure secondaire	Majorité de coudes	Hélice : 101-106 ; 116-122 ; 131-139 Feuillet : 11-15 ; 38-48 ; 66-73 Coude : 5-10 ; 19-25 ; 31-37 ; 48-54 ; 61-66 ; 73-79 ; 81-89 ; 93-101 ; 106-112 ; 123-130

4.2.3.4 Protéine P7

4.2.3.4.1 Séquence obtenue

Par RACE PCR réalisée à partir d'ARNm de testicule de renard, un amplicon d'une taille d'environ 330 pb est obtenu. Ce fragment est incorporé à un plasmide puis séquencé. Ce fragment de 350 pb présente une homologie avec la séquence établie selon la technique d'Edman (tableau 21).

**Tableau 21** : Séquence de l'ADNc obtenue par RACE-PCR réalisée avec la sonde synthétisée à partir de l'amorce dégénérée correspondant à P7 et acides aminés correspondant (en bleu).

- Méthode : RACE PCR
- AC SwissProt : P83201
- Organisme : renard (*Vulpes vulpes*)
- Tissu : épididyme

Séquence de P7 :

1	TGG	GGG	GAG	CTT	GAG	GTC	ACC	GAG	CAG	CCA	AGG	CCG	AGC	ACC	AGC	AAG	
	<i>DYENSSL</i>	W	G	E	L	E	V	T	E	Q	P	R	P	S	T	S	K
								(E)	(L)								
49	GGG	GAT	GAC	TTG	CTG	GCC	ATG	ATG	GAT	GAG	TTA	TAG	CTG	TGC	CGG	CCG	
24	G	D	D	L	L	A	M	M	D	E	L	Z	L	C	R	P	39
97	AGC	ACC	CCC	ACC	CCG	CGG	CCC	CTG	TGG	GGT	GGG	CCG	CCC	CAT	AAG	GAC	
40	S	T	P	T	P	R	P	L	W	G	G	P	P	H	K	D	55
151	CCC	GGG	GAT	GCC	CCA	GGC	AGC	AAA	CCG	AGG	CTG	ATG	TTA	GTT	TTC	TAC	
56	P	G	D	A	P	G	S	K	P	R	L	M	L	V	F	Y	71
192	TGA	GTG	AGT	GGT	TAC	CTC	CCA	TTC	CTG	TTT	GTG	TTG	TAA	AGA	ACC	ACG	
72	Z	V	S	G	Y	L	P	F	L	F	V	L	Z	R	T	T	87
241	CAA	GGC	TCC	TTC	CAG	TCT	GGA	AGG	CGC	ACA	CAT	ATA	CAT	GTT	TTC	AGC	
88	Q	G	S	F	Q	S	G	R	R	T	H	I	H	V	F	S	113
291	TTT	TAA	AAA	A													
114	F	*															

4.2.3.4.2 Analyse de la séquence

4.2.3.4.2.1 Homologues

Une interrogation des banques de données SwissProt réalisée avec la séquence de P7 en acides aminés montre de faibles homologies avec différentes protéines. Parmi celles-ci, il existe une faible homologie avec la proacrosine de porc (P08001 ; Figure 34).

P7	-----	240	*	260	*	280	*	-----	26
proacro	TCQGDSGGPLMCRDRAENTFVVVGITSWGVCARAKRPGVYTSTWPYLNWIASKIGSN								290
P7	LLAMMDELZLC	300	*	320	*	340		LMLVFYZV	74
proacro	ALQMVQLGTPP							PPAPPPPP	348
P7	SGYLPFLFVLZRTTQGSFQSGRRRTHIHVFSF	360	*	380	*	400		-----	104
proacro	PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPQVSAKPPQALSFAKRLQQLIEALKGTAFSSGRSYYETET								406

Figure 34 : Homologie entre la protéine P7 et la proacrosine de porc (P08001).

4.2.3.4.2.2 Prédiction de propriétés de la protéine P7

Les prédictions réalisées à partir de la séquence primaire de P7 sont présentées dans le tableau 22. Celles-ci sont à considérer avec précaution, la séquence de P7 obtenue par RACE-PCR devant être confirmée par criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard.

Tableau 22 : Prédictions réalisées à partir de la séquence de P7 obtenue par RACE-PCR.

P7	Prédictions	Sites
PM	11,7 kDa (16,4 kDa sur gel)	
P I	6,3 (6,2 sur gel)	
Sites particuliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Phosphorylation par protéine kinase C</li> <li>➤ Phosphorylation par casein kinase II</li> <li>➤ N glycosylation</li> <li>➤ amidation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ [ST]X[RK] : 21-23 ; 43-45 ; 93-95</li> <li>➤ [ST]XX[DE] : 22-25</li> <li>➤ NSSL : 4-7</li> <li>➤ SGRR : 93-96</li> </ul>
Sites antigéniques	4 sites	10-24 ; 35-43 ; 45-62 ; 82-94
Région trans-membranaire	1 région trans-membranaire déterminant une partie extracellulaire	Trans-membrane : 71-79 Extracellulaire : 79-93
Structure secondaire	Majorité de coudes	Hélice : 26-36 Feuillet : 9-15 ; 66-72 ; 78-84 ; 96-104 Coude : 15-25 ; 37-46 ; 48-64 ; 72-78

4.2.3.5 Protéine P8

4.2.3.5.1 Séquence obtenue

Par RACE PCR réalisée à partir d'ARNm de testicule de renard, deux amplicons d'une taille d'environ 350 et 450 pb sont obtenus. Ces fragments sont incorporés à un plasmide puis séquencés. Seul le fragment de 350 pb présente une homologie avec la séquence de P8 établie selon la technique d'Edman (tableau 23). L'insert correspondant est

excisé, et marqué à la DIG pour servir de sonde pour le criblage de la banque d'ADNc de testicule de renard.

Après un criblage primaire de la banque, 6 clones sont sélectionnés, et 2 d'entre eux, sont remis en culture. Chaque culture est criblée une seconde fois, permettant d'isoler de nouveau un clone par culture, qui est de nouveau remis en culture. Un troisième criblage permet d'isoler 5 clones par culture. Les 10 clones ont la même taille. Deux inserts contenus dans ces clones sont séquencés.

**Tableau 23 :** Séquence de l'ADNc obtenue par criblage de la banque de testicule de renard réalisé avec la sonde synthétisée à partir de l'amorce dégénérée correspondant à P8 et acides aminés correspondant (en bleu).

- Méthode : criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard
- AC EMB1 : AJ421970
- Organisme : renard (*Vulpes vulpes*)
- Tissu : testicule

Séquence de P8 :

1	AAT TCG CAC GAG GCC TCG TGC CGA ATT CGG CAC GAG GGG TGG GCG	45
46	GCG CTC CCA GCG GGG AAG GTT CCC CGG CTG CGC TGT GTC ATC TCC	90
91	GGG AGC TGT TGA CCC GCG CCC GCT GCC CAC TTA ACG CGC AGT AAG	135
136	TGG CGG GCT CCT CAC CTG GGG ACC GGG CTT CCA CAC AGA TGA GGA	180
181	CGG TGA GGC CCC CAG GGA AAG GGC CGT TTG CCA CGG CAC GCC GAC	225
226	AGA AGG GGA CGG CGG CCA GGT TCG AAC CGG GGC GCG CTG TGG CCT	270
271	CGC CAC CGT CAG GCC CCT TCC GCG GAT CTT CCC CAG AAA GAA AAG	315
316	AAA ACT GAG GCA AAA AGA GAC TAA AGA GCT TGC TTG AGT GGC TAA	360
361	ACC TGG CAG TTC ACA ACA CAG GGA AAT GCA AAT GGC CTT <b>ATG</b> AAG	405
		M K 2
406	AGA GGC TCA GCT GCC TTG GAG GTC AGA GAA CTG AAA ATG CAA ACA	450
3	R G S A A L E V R E L K M Q T	17
451	CCA ACA GCA TCT TGT GTT TTA TCC ACT CAG CGG GCA AAC TTT GCA	495
18	P T A S C V L S T Q R A N F A	32
		(A) (X)
496	AAA GGT GGT GTT CCT ACT GAT GAC GAG CAG GCG ACA GGG CTG GAG	540
33	K <u>G G V P T D D E Q A T</u> G L E	47
	(G)	
541	AGG GAG GTC ATG ATG GCT GCA CGG AAG GGA CTG GAC CCA TAC AAT	585
48	R E V M M A A R K G L D P Y N	62
586	ATT CTA GCC CCA AAG GCA GCT GCA GGC ACC AAA GAA GAC CCT AAT	630
63	I L A P K A A A G T K E D P N	77
631	TTA GTC CCA TCT ATC ACC AAC AAG CGA ATA GTG GGC TGC ATC TGT	675
78	L V P S I T N K R I V G C I C	92
676	GAA GAA GAC AAT AGT ACC GTC ATC TGG TTT TGG CTG CAC AAA GGC	720
93	E E D N S T V I W F W L H K G	107
721	GAG GCC CAG CGA TGC CCT AGC TGT GGA ACC CAT TAC AAG CTG GTG	765
108	E A Q R C P S C G T H Y K L V	122
766	CCC CAC CAG TTG GCC CAC <b>TGA</b> GCC TTT GCA CTA ATT TAC TCA AAA	810
123	P H Q L A H *	
811	TGT GCT GTG AAG TTT TTT TTT TCC AAT AAA GAA TAG CCA TTG CAT	855
856	TGG TTC CTT TTC CCA TAA AAA AAA 879	

4.2.3.5.2 Analyse de la séquence

4.2.3.5.2.1 Homologues

Une interrogation des banques de données SwissProt réalisée avec la séquence de P8 en acides aminés montre une forte homologie avec le polypeptide Vb de la cytochrome-C oxydase bovine (P00428 ; Figure 35), du même fragment murin (P19536) et humain (P10606).

P8	: MKRGSAALEVRELKMQPTASCVLSTQRANFAKGGVPTDDEQATGLEREVMMARKGLDPY	: 61
cytC	: -----ASGGVPTDDEQATGLEREVMLAARKGQDPY	: 31
P8	: NILAPKAAAGTKEDPNLVPSITNKRIVGCICEEDNSTVIWFWLHKGEAQRCPSCGTHYKLV	: 122
cytC	: NILAPKATSGTKEDPNLVPSITNKRIVGCICEEDNSTVIWFWLHKGEAQRCPSCGTHYKLV	: 92
P8	: PHQLAH-----	: 128
cytC	: PHQLAH-----	: 98

Figure 35 : Homologie entre la protéine P8 et le polypeptide Vb de la cytochrome-C oxydase bovine (P00428).

4.2.3.5.2.2 Prédiction de propriétés de la protéine P8

Les prédictions réalisées à partir de la séquence primaire de P8 sont présentées dans le tableau 24.

Tableau 24 : Prédictions réalisées à partir de la séquence de P8 obtenue par criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard.

P8	Prédictions	Sites
PM	14,1 kDa (14,7 kDa sur gel)	
PI	8,1 (6,0 sur gel)	
Sites particuliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Phosphorylation par protéine kinase C</li> <li>➤ Phosphorylation par protéine kinase AMPc ou GMPc dépendant</li> <li>➤ Phosphorylation par casein kinase II</li> <li>➤ N glycosylation</li> <li>➤ Région de liaison au Zinc de la sous-unité Vb de la cytochrome-C oxydase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ [ST]X[RK] : 26-28 ; 83-85</li> <li>➤ KRGS : 2-5</li> <li>➤ [ST]XX[DE] : 38-41 ; 44-47 ; 72-75</li> <li>➤ NSTV : 96-99</li> <li>➤ VIWFWLHKGEAQRCPSCGTHYKLV : 99-121</li> </ul>
Sites antigéniques	8 sites	10-17 ; 22-28 ; 30-44 ; 53-57 ; 65-75 ; 77-83 ; 88-95 ; 103-113
Région trans-membranaire	Aucune région trans-membranaire	
Structure secondaire	Majorité de coudes et d'hélice	Hélice : 6-14 ; 45-56 ; 60-70 ; 101-105 ; 123-128 Feuillet : 21-25 ; 86-92 Coude : 15-21 ; 32-40 ; 56-60 ; 70-86 ; 92-98 ; 105-120

4.2.3.6 Protéine P13

4.2.3.6.1 Séquence obtenue

Par RT PCR réalisée à partir d'ARNm de testicule de renard, un amplicon d'une taille d'environ 370 pb est obtenu. Ce fragment est incorporé à un plasmide puis séquencé. L'analyse de la séquence obtenue confirme qu'il s'agit bien du gène de P13. L'insert est excisé puis marqué à la DIG pour servir de sonde pour le criblage de la banque d'ADNc de testicule de renard. Après un criblage primaire de la banque, 23 clones sont sélectionnés, et 2 d'entre eux, P13.1 et P13.2, sont remis en culture. Chaque culture est criblée une seconde fois, permettant d'isoler de nouveau 1 clone (par culture), qui est encore une fois remis en culture. Un troisième criblage permet d'isoler 5 clones par culture. Les 5 clones dérivés de P13.1 ont une taille légèrement différente de celle des clones provenant du clone P13.2. Deux clones de chacune de ces cultures sont séquencés. Les séquences obtenues sont alignées pour obtenir une séquence consensus (Tableau 25).

**Tableau 25 :** Séquence de l'ADNc obtenue par criblage de la banque de testicule de renard réalisée avec la sonde synthétisée à partir des amorces correspondant à P13, et acides aminés correspondant (en bleu).

- Méthode : criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard
- AC EMBL: *AJ421969*
- Organisme : renard (*Vulpes vulpes*)
- Tissu : testicule

Séquence de P13 :

1	AAT	TCG	GCA	CGA	GGC	AAC	GGG	GCA	ACG	AGG	AAG	CTC	TTG	GGA	GCG	45
46	TAG	CCG	GAA	AGG	AGA	AGT	TGA	GAT	TAC	AGA	CAT	CCT	GCC	AAA	ATG	90
														M	1	
91	ATT	TCT	TCA	AAG	CCC	AGA	CTT	GTC	GTA	CCT	TAT	GGC	CTC	AAG	ACT	135
2	I	S	S	K	P	R	L	V	V	P	Y	G	L	K	T	16
136	CTG	CTC	GAG	GGA	GTC	AGC	AGA	GCC	ATT	CTT	AAA	ATT	AAT	CCA	CCA	180
17	L	L	E	G	V	S	R	A	I	L	K	I	N	P	P	31
181	AAC	ATC	ACC	CAG	TTC	GCA	GCA	GTT	TAT	TTT	AAA	GAA	CTT	ATT	GTA	225
32	N	I	T	Q	F	A	A	V	Y	F	K	E	L	I	V	46
226	TTT	AGA	GAA	GGG	AAT	ACT	TCT	CTG	GAT	ATA	AAA	GAT	CTT	GTT	AAA	270
47	F	R	E	G	N	T	S	L	D	I	K	D	L	V	K	61
271	CAA	TTT	CAT	CAG	ATT	AAA	GTA	GAG	AAG	TGG	TCA	GAA	GGA	ACG	ACA	315
62	Q	F	H	Q	I	K	V	E	K	W	S	E	G	T	T	76
316	CAA	GAG	AAG	GAA	CCA	GAA	TGT	ATG	GAA	GAA	CAG	GTA	GAA	ACA	TCT	360
77	Q	E	K	E	P	E	C	M	E	E	Q	V	E	T	S	91
361	GTA	GTT	TCC	CAA	GAA	CCT	ACA	CGG	ATG	GAG	AAA	TCT	ACG	GAC	ACA	405
92	V	V	S	Q	E	P	T	R	M	E	K	S	T	D	T	106
406	GAG	GAG	GAC	AAT	ATA	GCT	GGA	CCA	CTG	TTT	ATG	AAC	AAA	ACC	ACT	450
107	E	E	D	N	I	A	G	P	L	F	M	N	K	T	T	121

451	CAG	TTC	CCA	TCA	GTT	CAC	GCA	GAG	GTG	CTC	CTG	GAG	CCC	GAG	GAG	495
122	Q	F	P	S	V	H	A	E	V	L	L	E	P	E	E	136
496	ACC	CCC	GAA	GCA	GCC	TGC	GGT	GGC	AGC	CCG	AAA	CCA	TCT	ACC	CCT	540
137	T	P	E	A	A	C	G	G	S	P	K	P	S	T	P	151
541	AAG	GCT	GTC	ACC	CCA	CCC	TCC	TCA	CCA	TCT	CCA	GCA	GCT	GTC	TCA	585
152	K	A	V	T	P	P	S	S	P	S	P	A	A	V	S	166
586	CAA	GAG	TTT	GCT	TAT	GTG	CCA	GCT	GAC	CCA	GCT	CAG	TTT	GCT	GCT	630
167	Q	E	F	A	Y	V	P	A	D	P	A	Q	F	A	A	181
631	CAG	ATG	TTA	GGT	AAT	GTT	TCA	TCT	ATT	CAT	TCT	GAT	CAG	TCT	GAC	675
182	Q	M	L	G	N	V	S	S	I	H	S	D	Q	S	D	196
676	GTT	TTA	ATG	GTG	GAT	GTG	GCA	ACA	AGT	ATG	CCT	GTT	TTT	TCT	GAG	720
197	V	L	M	V	D	V	A	T	S	M	P	V	F	S	E	211
721	GAG	GTG	CTG	AGC	TCA	GAG	GCT	GCC	GAA	GAT	GCC	AGG	GTG	GCC	ATT	765
212	E	V	L	S	S	E	A	A	E	D	A	R	V	A	I	226
766	CCC	TCT	GTG	TAT	TCC	GCA	GAG	GTT	GTA	GCC	CTG	CAG	GTT	CTG	AGC	810
227	P	S	V	Y	S	A	E	V	V	A	L	Q	V	L	S	241
811	CAA	ACA	TCT	GTC	CAT	GTA	GAT	TTG	GGT	CCT	AAA	CCT	AAA	GAC	GAC	855
242	Q	T	S	V	H	V	D	L	G	P	K	P	K	D	D	256
856	GAA	GCT	GAA	CCA	ACA	ACG	GCT	TCC	TCC	TTC	CCC	TTG	CAG	GAT	GAA	900
257	E	A	E	P	T	T	A	S	S	F	P	L	Q	D	E	271
901	CAA	GAC	CCT	CCT	GCT	TAC	GAT	CAA	GCT	CCC	GAG	GTC	CCT	TTG	CAG	945
272	Q	D	P	P	A	Y	D	Q	A	P	E	V	P	L	Q	286
946	GCT	GAT	ATT	GAG	GTC	ACA	TCA	TTC	GTT	CAT	GTT	TCA	TCC	ATC	TAT	990
287	A	D	I	E	V	T	S	F	V	H	V	S	S	I	Y	301
991	AAC	AAT	GAG	CCT	GTG	ATT	GAA	GGA	GTT	ACT	TAT	GTC	GAG	CAA	ATA	1035
302	N	N	E	P	V	I	E	G	V	T	Y	V	E	Q	I	316
1036	CCA	GAA	CAC	ATA	GTT	ATC	CCT	TTT	ACC	GAT	CAC	GTT	GCT	TCC	CTT	1080
317	P	E	H	I	V	I	P	F	T	D	H	V	A	S	L	331
1081	AAA	GAC	AAT	GAG	CCA	CCA	GAT	AGT	CCC	ATA	CCT	GTA	GCA	TGC	GAC	1125
332	K	D	N	E	P	P	D	S	P	I	P	V	A	C	D	346
1126	ACA	GGC	ATG	TCT	GAA	AAA	ACC	GTA	GGT	TCC	GTA	AGT	CTT	GCA	CAG	1170
347	T	G	M	S	E	K	T	V	G	S	V	S	L	A	Q	361
1171	TTG	GAG	GTG	GAA	TCA	CAC	TAT	TCC	TCA	GTA	CAT	ATG	GAG	GCA	GAA	1215
362	L	E	V	E	S	H	Y	S	S	V	H	M	E	A	E	376
1216	GCA	TCA	GTT	CTG	TTC	TCT	GAC	ACC	TCT	TTG	AAA	GGT	CAG	CCT	GCA	1260
377	A	S	V	L	F	S	D	T	S	L	K	G	Q	P	A	391
1261	CAA	TTC	CCG	GAT	GCA	GGG	GGT	TCC	ACC	AAA	GCA	GTC	GGT	TCT	GAA	1305
392	Q	F	P	D	A	G	G	S	T	K	A	V	G	S	E	406
1306	AAA	CCG	CTG	CAT	CTT	GAA	GTG	GAG	TTC	ACT	GCC	CTA	GTT	CCT	GGC	1350
407	K	P	L	H	L	E	V	E	F	T	A	L	V	P	G	421
1351	AAC	TCG	GGG	CAG	GAG	GAG	TCC	CAG	GGA	AGC	TCT	GCA	GCC	CAG	GAG	1395
422	N	S	G	Q	E	E	S	Q	G	S	S	A	A	Q	E	436
1396	ATG	GAG	GTC	AAA	CTC	GTG	CTC	TCT	GGG	GAA	GCT	GCT	ACA	GCA	GTG	1440
437	M	E	V	K	L	V	L	S	G	E	A	A	T	A	V	451
1441	CTC	TCA	GCT	GCA	TCT	GTA	AGG	GCA	GCT	GGT	GGT	AGC	CCC	ACT	CCT	1485
452	L	S	A	A	S	V	R	A	A	G	G	S	P	T	P	466

```

1486 GTT CCA GAA GGT CTT ACT GAA CCT GAG CTC GAA CCA GAA CTG GAA 1530
467 V P E G L T E P E L E P E L E 481

1531 GCA GCA CTT GAA CAA GGT TTG ATG AAG CCA GAT GCT GAA ACC ACC 1575
482 A A L E Q G L M K P D A E T T 496

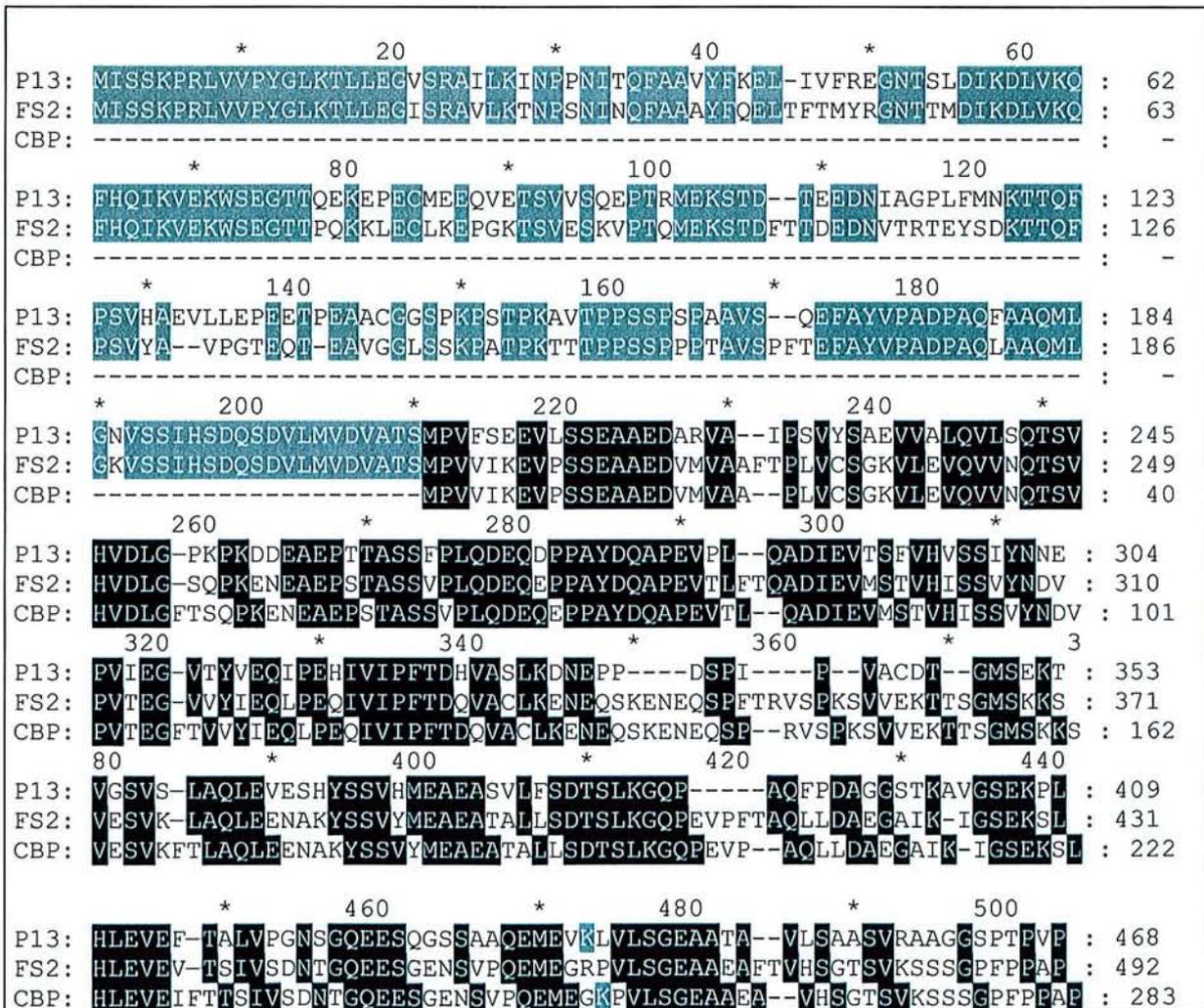
1576 ACC GTC TGA GCC AAC GTT CAA GGT GGA GTC TGC CAC CCG AAC GTA 1620
497 T V *

1621 CTT TGT CAA TAA ACT TCA TGC AAG CAT AAA AAA AAA AAA AAA 1662
    
```

4.2.3.6.2 Analyse de la séquence

4.2.3.6.2.1 Homologues

Une interrogation des banques de données SwissProt réalisée avec la séquence de P13 en acides aminés montre une forte homologie avec deux protéines spermatiques humaines (Figure 36) : 60% avec la fibrousheatin 2 (075952) et 54% avec la calcium binding protein 86 (fragment 6) spécifique du testicule (Q9HCY9). D'autre part, la protéine P13 présente une homologie avec la famille des protéines SP17 décrites chez l'opossum (062771 ; Figure 37), la souris, le rat et l'humain.



	*	520	*	540	*	560	
P13:	EGLTEP	ELPELE	AL	QGLMKPDAETTTVZ	-----	-----	: 499
FS2:	EGLTAP	EIEPEGESTAE	-----	-----	-----	-----	: 509
CBP:	EGLTAP	EIEPEGESTAE	-----	-----	-----	-----	: 302

**Figure 36 :** Homologie entre la protéine P13 et les protéines spermatiques humaines fibrousheatin 2 (075952) et calcium binding protein 86 (fragment 6) spécifique du testicule (Q9HCY9).

	*	20	*	40	*	60			
P13:	--MIS	SKPRLVVPYGLKT	LLEGVSRATL	KINPPNT	TQFAAVYFKE	LIVFREGNISLD	: 55		
RSA:	MSIPFS	SNTHYRI	QCFGN	LLEGLTREIL	REQPDNI	PAFAAAYFENL	KEKRE-KTNFD	PAEWGAK : 63	
	*	80	*	100	*	120			
P13:	IKDLVKQF	HQIKVEK	WSEGT	QKEKEPE	CMEEQVET	SVVSQEP	TRMEKST	DTEEDNIAGPLFMNK : 119	
RSA:	VDRFYNN	HAFKDE	PPEKSE	TQKIQPE	--KVAIE	KETMPQET	TVK-EKET	QVSFVEEPTTEEPQKE : 124	
	*	140	*	160	*	180	*		
P13 :	TTQF	PSVHAEV	LLEPEET	PAAACGG	SPKPS	TPKAVT	PPSSP	SPAAVSQEFAYVPADPAQFAAQM : 183	
RSA :	EEEE	EDEE	LEGLLV	REGMQD	AAVKIQ	AVFRGH	KTRKEYL	KKRSTDETADENNE----- : 179	
	200	*	220	*	240	*			
P13 :	LGNV	SSIHSD	QSDVLM	VDVAT	SMPVF	SEEVLS	EEAEDAR	VAI PSVYSAEVVALQVLSQTSVHV : 247	
RSA :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -	
	260	*	280	*	300	*	320		
P13 :	DLGPK	PKDDEA	EPTTASS	FPLQDE	QDPPAY	DQAPEV	PLQADIE	VTSFVHVSSIYNNEPVIEGVT : 311	
RSA :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -	
	*	340	*	360	*	380			
P13 :	YVEQI	PEHIVI	PFTHV	ASLKD	NEPPDS	PIPVAC	DTGMSE	KTVGSSVSLAQLEVESHYSSVHMEA : 375	
RSA :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -	
	*	400	*	420	*	440			
P13 :	EASV	LFSDT	SLKGQ	PAQFP	DAGGST	KAVGSE	KPLHLE	VEFTALVPGNSGQEE	SQSSAAQEMEV : 439
RSA :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -
	*	460	*	480	*	500			
P13 :	KLVL	SGEAAT	AVLSA	ASVRA	AGGSPT	PVPEGL	TEPELE	PELEEA	LEQGLMKPDAETTTVZ---- : 499
RSA :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -

**Figure 37 :** homologie entre la protéine P13 et la RSA (ou SP17) décrite chez l’opossum (062771).

4.2.3.6.2 Prédiction de propriétés de la protéine P13

Les prédictions réalisées à partir de la séquence primaire de P13 sont présentées dans le tableau 26.

**Tableau 26 :** Prédictions réalisées à partir de la séquence de P13 obtenue par criblage d’une banque d’ADNc de testicule de renard.

P13	Prédictions	Sites
PM	53,2 kDa (97 kDa sur gel)	
PI	4,1 (4,3-4,6 sur gel)	
Sites particuliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Phosphorylation par protéine kinase C</li> <li>➤ Phosphorylation par casein kinase II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ [ST]X[RK] : 3-5 ; 145-147 ; 150-152 ; 330-332 ; 350-352 ; 385-387 ; 399-401 ; 405-407 ; 456-458</li> <li>➤ [ST]XX[DE] : 16-19 ; 52-55 ; 75-78 ; 98-101 ; 104-107 ; 106-109 ; 311-314 ; 330-333 ; 423-426 ; 472-475</li> </ul>

P13	Prédictions	Sites
	➤ N glycosylation	➤ N{P}[ST]{P} : 32-35 ; 51-54 ; 118-121 ; 186-189
Sites antigéniques	17 sites	44-50 ; 66-82 ; 91-109 ; 130-137 ; 140-149 ; 152-160 ; 187-193 ; 214-219 ; 247-260 ; 266-279 ; 329-338 ; 344-352 ; 381-391 ; 393-406 ; 417-432 ; 457-475 ; 489-494
Région trans-membranaire	Aucune région trans-membranaire	
Structure secondaire	Majorité d'hélice et de coude	Hélice : 17-26 ; 33-44 ; 54-69 ; 107-113 ; 125-132 ; 166-185 ; 211-226 ; 281-291 ; 365-387 ; 408-417 ; 432-457 ; 475-490 Feuillet : 45-48 ; 196-202 ; 291-299 ; 305-314 Coude : 3-8 ; 28-33 ; 72-83 ; 93-106 ; 131-139 ; 141-164 ; 248-259 ; 264-284 ; 298-306 ; 330-352 ; 386-399 ; 419-427 ; 460-473

#### 4.2.3.6.2.3 Analyse de la séquence de la protéine P13 par spectrométrie de masse

Afin de confirmer la séquence obtenue pour P13, nous avons réalisé la digestion à la trypsine de cette protéine et analysé par spectrométrie de masse les fragments obtenus. Les valeurs obtenues expérimentalement sont comparées aux valeurs théoriques calculées par rapport à la séquence de P13 (Tableau 27). Sur 18 pics de forte intensité obtenus expérimentalement ( $m/z > 1000$ ), 15 sont prédits par l'analyse de la séquence de P13.

**Tableau 27 :** Séquences peptidiques obtenues par une digestion trypsique de P13 réalisée dans le gel déterminées par spectrométrie de masse, et valeurs théoriques correspondant à ces peptides. \* pyroGlu ; \*\*Met-Oxydation

Peptides et position	(m/z) calculé	(m/z) mesuré
16 (K) TLLEGVSR(A) 23	875	877
8 (K) LVVPYGLK(T) 15	889	888
		893
62 (K) QFHQIKVEK(W) 70*	1140	1139
62 (K) QFHQIKVEK(W) 70	1157	1156
		1638
441(K) LVLSGEAATAVLSAASVR(A) 458	1716	1715
28 (K) INPPNITQFAAVYFK(E) 42	1724	1726
8(K) LVVPYGLKTLLEGVSR(A) 23	1746	1747
		1801
103(K) STDTEEDNIAGPLFMNK(T) 119**	1897	1897
24 (K) AILKINPPNITQFAAVYFK(E) 42	2149	2155
8 (R) LVVPYGLKTLLEGVSR(I) 27	2169	2163
62 (K) QFHQIKVEKWSEGTTQEK(E) 79*	2186	2186
100(R) MEKSTDTEEDNIAGPLFMNK(T) 119	2271	2273
100(R) MEKSTDTEEDNIAGPLFMNK(T) 119**	2287	2289
80 (K) EPECMEEQVETSVVSQEPTR(M) 99	2379	2377
80 (K) EPECMEEQVETSVVSQEPTRMEK(S) 102	2768	2766

## 4.3 : Caractérisation partielle des antigènes sélectionnés

### 4.3.1/ Caractérisation biochimique

#### 4.3.1.1 Digestion enzymatique des résidus glucidiques

Afin de déterminer la présence de glycosylation, les protéines purifiées ont été incubées avec des N- et O-glycosylases. Afin de déterminer le PM de la partie peptidique, celle-ci est colorée à l'argent après migration sur un gel Tris-trycine (excepté pour P13, testée sur un gel à 10% d'acrylamide). Le PM des protéines est présenté dans le tableau 29.

#### 4.3.1.2 Identification de certains sucres par marquage avec des lectines

Afin d'avoir une indication de la nature des groupements glycosylés, les protéines ont été incubées avec différentes lectines marquées à la biotine. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 28.

**Tableau 28 :** Etude des glycosylations des 7 antigènes sélectionnés à l'aide de différentes lectines : résultats des marquages réalisés.

lectine	P3	P4	P5	P7	P8	P11	P13
<i>Concanavalin A</i>	-	-	-	+	-	-	+
<i>Dolichos biflorus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus vulgaris PHA-E</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phytolacca americana</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pisum sativum</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Tetragonolobus purpureas</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ulex europaeus UEA I</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>Wisteria floribunda</i>	-	-	-	-	-	-	-

Les sucres récapitulés dans le Tableau 29 sont donc potentiellement présents sur les antigènes sélectionnés.

**Tableau 29 :** Etude des glycosylations des 7 antigènes sélectionnés : prédiction des sites de liaison aux groupement glycosylés, PM avant et après digestion enzymatique et sucres reconnus par les lectines marquant les antigènes.

	Prédiction	PM avant digestion (kDa)	PM (kDa) après O-digestion	PM (kDa) après N-digestion	Sucres reconnus par les lectines marquant cette protéine
P3	1 site N-glycosyl.	16,8	14,9	16,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tetramère de N-acétyl-β-D- glucosamine</li> <li>➤ α-D-mannose terminal</li> <li>➤ α-L-fucose (α-6-désoxy-L-galactose) terminal</li> <li>➤ L-fucose α-lié</li> </ul>
P4	-	16,4	15,4	15,9	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tetramère de N-acétyl-β-D- glucosamine</li> <li>➤ α-D-mannose terminal</li> </ul>

	Prédiction	PM avant digestion (kDa)	PM (kDa) après O-digestion	PM (kDa) après N-digestion	Sucres reconnus par les lectines marquant cette protéine
					➤ Terminal $\alpha$ -L-fucose ( $\alpha$ -6-désoxy-L-galactose)
<b>P5</b>	-	16,9	16,9	16,9	➤ Tetramère de N-acétyl- $\beta$ -D- glucosamine ➤ $\alpha$ -D-mannose terminal ( $\alpha$ -D-glucose ?) ➤ $\alpha$ -L-fucose ( $\alpha$ -6-désoxy-L-galactose) terminal ➤ L-fucose $\alpha$ -lié
<b>P7</b>	1 site N-glycosyl.	16,4	16,4	16,4	➤ $\alpha$ -D-mannose terminal ➤ $\alpha$ -D-glucose terminal ➤ Tetramère de N-acétyl- $\beta$ -D- glucosamine ➤ $\alpha$ -D-mannose terminal ➤ $\alpha$ -L-fucose ( $\alpha$ -6-désoxy-L-galactose) terminal
<b>P8</b>	1 site N-glycosyl.	14,7	14,7	14,7	-
<b>P11</b>	?	11,4	11,4	11,4	-
<b>P13</b>	4 sites N-glycosyl.	97	66		➤ $\alpha$ -D-mannose terminal ➤ $\alpha$ -D-glucose terminal

### 4.3.2/ Caractérisation biologique

#### 4.3.2.1 Production de sérums monospécifiques chez la souris

Afin d'évaluer l'intérêt des antigènes sélectionnés pour un vaccin contraceptif, nous avons immunisé des souris de différentes manières et étudié leur sérum par Western blot. Le résultat de ces expériences est présenté dans le tableau 30.

**Tableau 30 :** Résultats obtenus par Western blot avec les sérums polyclonaux de souris immunisées contre des protéines spermatiques, et dénomination des sérums positifs obtenus (IM : intra musculaire, NT : non testé, + : faible réaction positive, ++ : forte réaction positive). Pour le détail des protocoles d'immunisation, voir la partie *Matériels et méthodes*. Le sexe des souris ayant réagi est précisé dans le tableau.

	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P11</b>	<b>P13</b>
Protocole 1 : sur PVDF, Voie intrasplénique, souris Swiss	-	-	-	-	-	NT	+ S13/1 femelle
Protocole 2 : Purification par HPLC, Voie IM, adjuvant de Freunds, souris balb/c	-	-	++ S5/1 mâle	-	-	NT	-
Protocole 3 : Purification par HPLC, Voie IM, adjuvant Qiagen , souris balb/c	+ S3/1 femelle	-	++ S5/2 femelle	-	++ S8/1 femelle	NT	-

Ces expériences ont permis d'obtenir des sérums polyclonaux monospécifiques (dirigés contre une seule protéine) reconnaissant P13, P5, P8 et P3. Par contre, nous n'avons jamais pu obtenir de sérum dirigé contre P4 et P7, et nous n'avons pas pu immuniser des souris avec P11, en raison de la faible concentration de cette protéine. D'autre part, des problèmes de volume, de conservation et de délais ont fait que nous n'avons pas pu utiliser tous ces sérums pour chacune des études menées ultérieurement.

#### 4.3.2.2 Immunolocalisation des antigènes

Les sérums dirigés contre P13 (S13/1) et P5 (S5/1) ont été utilisés pour localiser ces protéines sur des spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés de renard. Pour cela, un immunomarquage de spermatozoïdes fixés sur lames est réalisé à l'aide d'anticorps marqués au FITC.

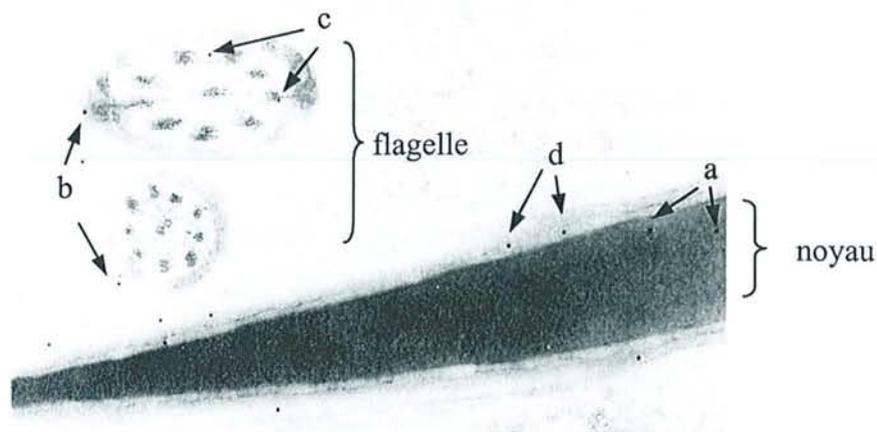
La Figure 38 présente les résultats obtenus : avec le sérum S13/1, nous observons un faible marquage du flagelle, tandis que le sérum S5/1 marque fortement l'acrosome. Un sérum négatif (souris non immunisée) ne marque pas significativement les spermatozoïdes. Les résultats sont identiques pour les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés. En raison de difficultés techniques liées à l'anticorps secondaire, ces expériences devront être confirmées.



**Figure 38** : immunofluorescence de spermatozoïdes épидидymaires de renards incubés avec des sérums d'une souris naïve (A), d'une souris immunisée contre P5 (B) et d'une souris immunisée contre P13 (C).

Les sérums dirigés contre P5 (S5/1 et S5/2) ont été utilisés pour localiser la protéine P5 sur des spermatozoïdes de renard, par immuno-marquage puis observation en microscopie électronique à transmission. Ces expériences sont réalisées au Laboratoire de Microscopie Electronique de la Faculté de Médecine de Nancy (Pr. Foliguet).

Les expériences menées avec un témoin négatif (sérum de souris non immunisée) ne montrent pas de marquage spécifique. Les observations réalisées après marquage dirigé contre la protéine P5 suggèrent fortement une localisation dans le noyau et sur la gaine fibreuse, et, d'une façon moins forte, sur les fibres denses et l'acrosome (Figure 39). Cette localisation est identique pour les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés.



**Figure 39 :** Immunolocalisation de la protéine P5 sur des spermatozoïdes éjaculés de renard observés en microscopie électronique à transmission (X40000). On observe un marquage dans le noyau (a) et sur la gaine fibreuse (b), et d'une façon moins forte sur les fibres denses (c) et dans l'acrosome (d).

#### 4.3.2.3 Evaluation de la spécificité d'organe

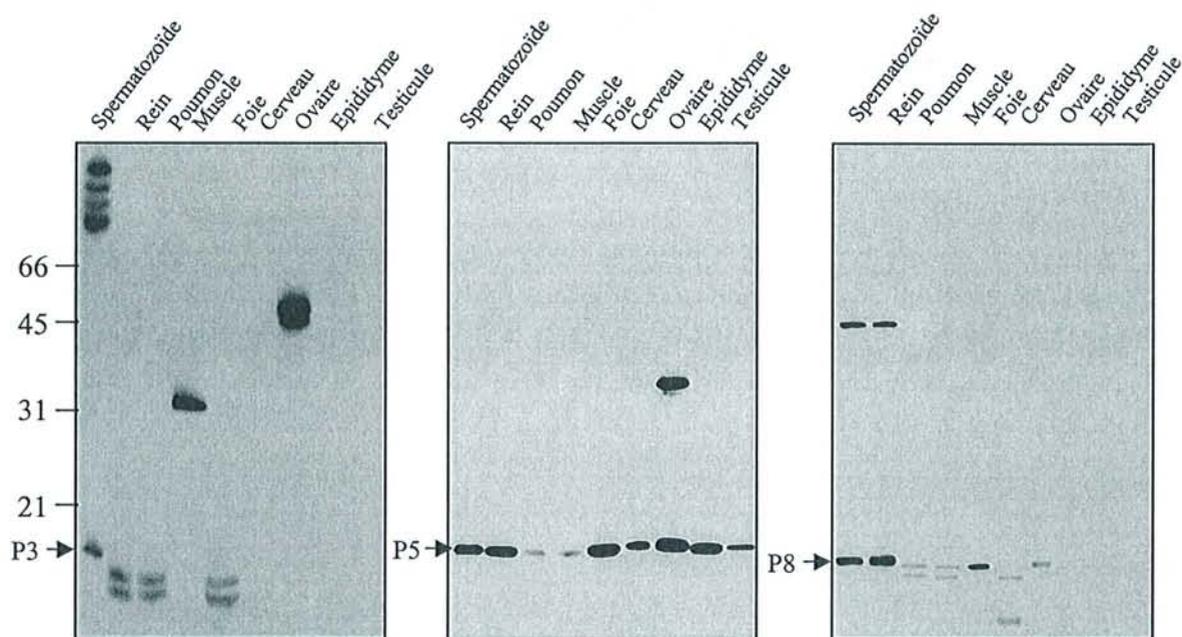
Pour évaluer la spécificité d'organe des protéines, les anticorps mono-spécifiques dirigés contre les protéines P3 (S3/1), P5 (S5/2) et P8 (S8/1) ont été testés par Western blot sur des extraits protéiques d'organes de renards. Les organes de renard suivant sont utilisés : testicule, épидидyme, ovaire, cerveau, foie, muscle, poumon et rein. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 31.

**Tableau 31 :** Résultats obtenus par Western blot réalisé avec les sérums de souris dirigés contre les protéines P3, P5 et P8 sur des protéines extraites de différents organes de renard.

Organes	P3	P5	P8
Spermatozoïdes	+	+++	+++
Testicules	-	++	-
Epididyme	-	+++	-
Ovaire	-	+++	-
Cerveau	-	+++	+
Foie	+	+++	+
Muscle	-	+	++
Poumon	+	+	+
Rein	+	+++	+

Le sérum dirigé contre P3 reconnaît des extraits de foie, de poumon et de rein. Les bandes obtenues en Western blot pour ces trois tissus sont de faible intensité, et apparaissent sous forme de doublets, qui migrent à un PM inférieur à celui de P3 (Figure 40). Le sérum dirigé contre P5 croise avec les extraits protéiques provenant de tous les organes testés

(Figure 40). Il faut noter cependant que les bandes observées en Western blot n'apparaissent pas toutes à la même hauteur, ce qui ne semble pas être lié à la migration, cette expérience ayant été répétée de nombreuses fois avec ce même résultat. Le sérum dirigé contre P8 croise avec les protéines musculaires et, pour les révélations très poussées, avec des extraits de cerveau, foie, poumon, rein et épидидyme (Figure 40). Là encore, il faut noter que ces bandes apparaissent à des PM différents, parfois sous forme de doublets.



**Figure 40 :** Evaluation de la spécificité d'organe par Western blot d'extraits protéiques provenant de différents organes de renard révélés avec les sérums de souris immunisées contre P3 (à gauche), P5 (au centre) et P8 (à droite). Les PM standards sont indiqués en kDa à droite.

4.3.2.4 Evaluation de la spécificité d'espèce

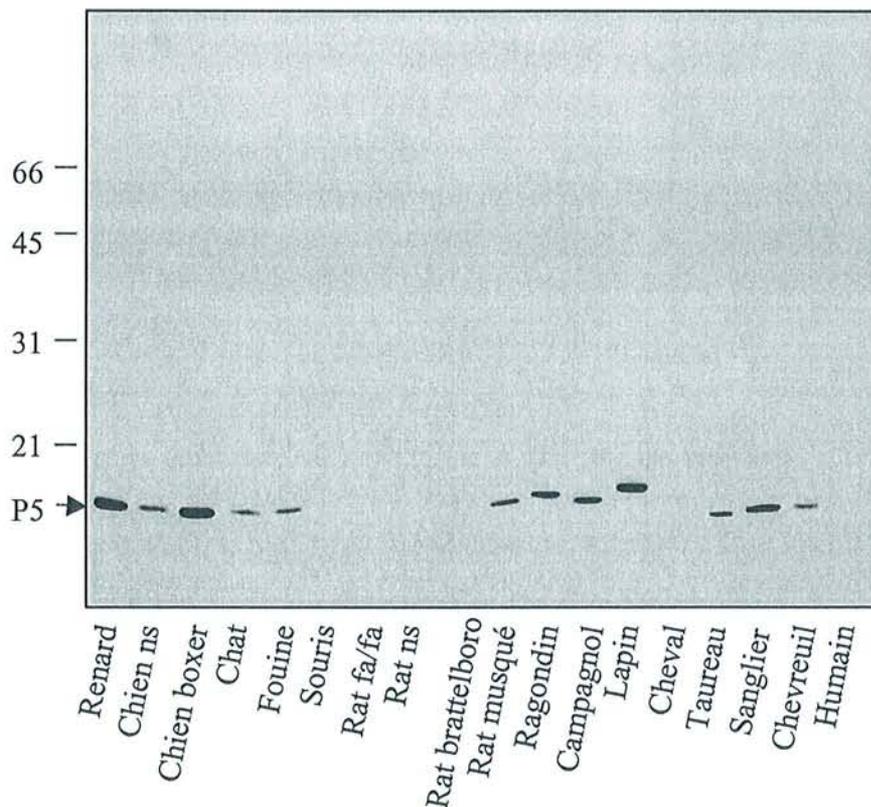
Pour évaluer la spécificité d'espèce des protéines, les anticorps mono-spécifiques dirigés contre les protéines P5 (S5/2) et P8 (S8/1) sont testés par Western blot sur des extraits protéiques de spermatozoïdes provenant de différentes espèces. Des spermatozoïdes des espèces suivantes sont utilisés : chien, chat, fouine, hamster, souris, rat, rat musqué, ragondin, campagnol, lapin, cheval, taureau, sanglier, chevreuil et humain. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 32.

**Tableau 32 :** Résultats obtenus par Western blot réalisés avec les sérums de souris dirigés contre les protéines P5 et P8 sur des protéines extraites de spermatozoïdes de différentes espèces (nt : non testé ; ns : non spécifié).

Espèce	Race	Nature spermatozoïdes	P5	P8
chien	Boxer	épididymaires	+++	+
chat	ns	épididymaires	+	-
fouine	ns	épididymaires	+	-

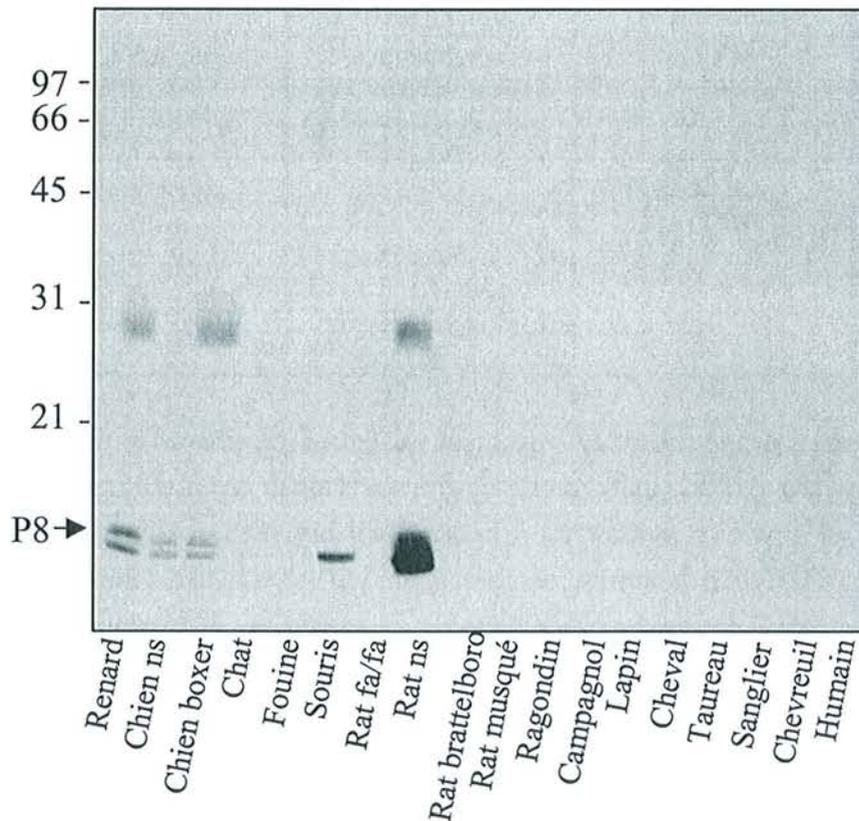
Espèce	Race	Nature spermatozoïdes	P5	P8
hamster	ns	épididymaires	-	nt
souris	Swiss	épididymaires	-	+
rat	Fa/fa	épididymaires	-	-
rat	ns	épididymaires	-	++
rat	Brattleboros	épididymaires	-	-
rat Musqué	ns	épididymaires	+++	-
ragondin	ns	épididymaires	+++	-
campagnol	ns	épididymaires	+++	-
lapin	Zika	éjaculés	+++	-
cheval	ns	éjaculés	-	-
taureau	ns	épididymaires	++	-
sanglier	ns	épididymaires	+++	-
chevreuil	ns	épididymaires	+	-
humain	ns	éjaculés	-	-

Le sérum dirigé contre P5 reconnaît des protéines provenant de spermatozoïdes de différentes espèces : chien, chat, fouine, rat musqué, ragondin, campagnol, lapin, taureau et sanglier. Il faut noter cependant que les bandes observées en Western blot (Figure 41) apparaissent à différentes hauteurs, ce qui suggère qu'il pourrait exister différentes isoformes de cette protéine en fonction des espèces.



**Figure 41 :** Evaluation de la spécificité d'espèce par Western blot d'extraits protéiques provenant de spermatozoïdes de différents espèces révélés avec le sérum de la souris immunisée contre P5. Les PM standards sont indiqués à gauche (kDa).

Le sérum dirigé contre P8 reconnaît uniquement des extraits protéiques provenant de spermatozoïdes de chien de souris et d'une souche de rat (Figure 42).



**Figure 42:** Evaluation de la spécificité d'espèce par Western blot d'extraits protéiques provenant de spermatozoïdes de différents espèces révélés avec le sérum de la souris immunisée contre **P8**. Les PM standards sont indiqués à gauche (kDa).

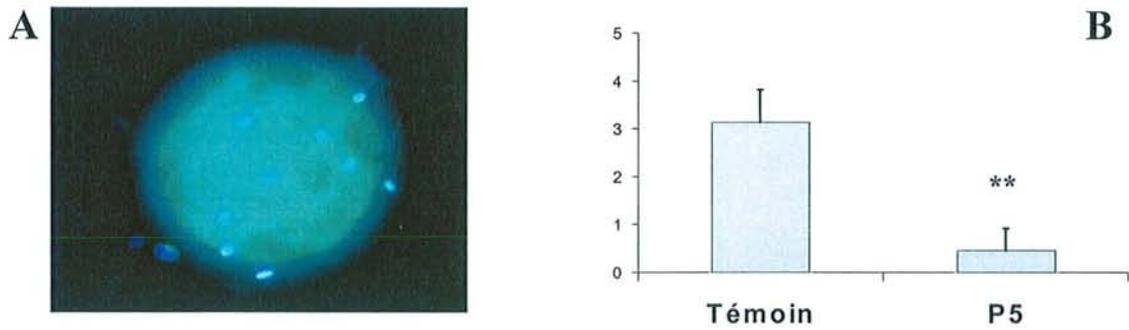
#### 4.3.2.5 Evaluation de l'effet des anticorps sur la liaison spermatozoïdes-zone pellucide

Afin d'évaluer l'efficacité des protéines sélectionnées comme antigène pour un vaccin contraceptif, les anticorps monospécifiques dirigés contre P5 (S5/1) et P13 (S13/1) ont été ajoutés à un milieu de culture contenant des ovocytes et des spermatozoïdes de renards. Après 16h d'incubation à 37°C, les cellules sont fixées, et les spermatozoïdes liés à la zone pellucide sont visualisés au colorant de Hoecht. Ce nombre rapporté à l'unité de surface est comparé à celui d'un témoin négatif (incubation de cellules avec un milieu contenant un sérum de souris naïve) à l'aide d'un test ANOVA. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 33.

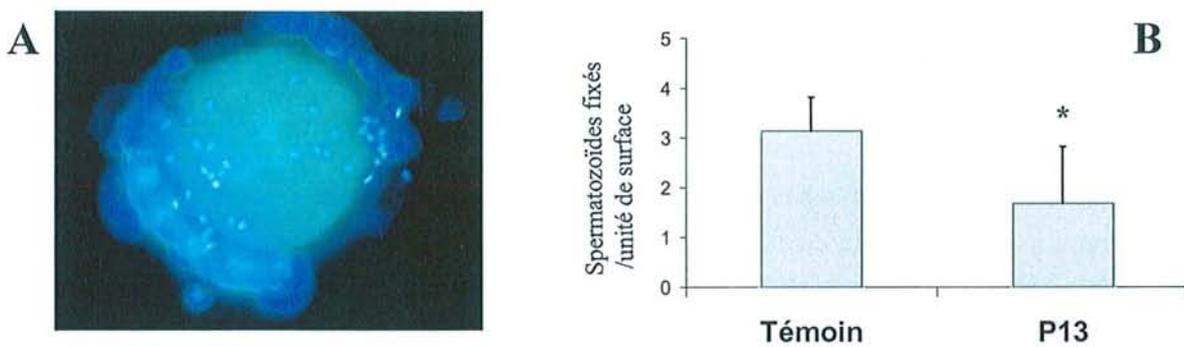
Le sérum dirigé contre P5 diminue de façon très significative la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide ( $P < 0,01$ ) (Figure 43). Le sérum dirigé contre P13 diminue également de façon significative la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide ( $P < 0,05$ ) (Figure 44).

**Tableau 33 :** Nombre d’ovocytes utilisés, taille de ces ovocytes (unités de surface) et nombre de spermatozoïdes fixés à la zone pellucide par unité de surface ( $\pm$  écart à la moyenne) pour des milieux de culture enrichis en sérum d’une souris naïve, d’une souris immunisée contre P5 (S5/1) ou d’une souris immunisée contre P13 (S13/1).

	Spermatozoïdes + sérum naïf	Spermatozoïdes + S5/1	Spermatozoïdes +S13/1
N ovocytes	6	9	20
N unités de surface	141	318	727
N spermatozoïdes	441	132	1224
N spermatozoïdes /unité de surface	3,13 $\pm$ 0,94	0,46 $\pm$ 0,46	1,68 $\pm$ 1,14



**Figure 43 :** Test de liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide. En présence d’anticorps anti-P5, le nombre de spermatozoïdes se fixant sur l’ovocyte (colorés en bleu ; A) diminue de façon significative ( $p < 0,01$ ) par rapport au témoin (sérum de souris non immunisée).



**Figure 44 :** Test de liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide. En présence d’anticorps anti-P13, le nombre de spermatozoïdes se fixant sur l’ovocyte (colorés en bleu ; A) diminue de façon significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin (sérum de souris non immunisée).

4.3.2.6 Evaluation de l’effet des anticorps sur la mobilité des spermatozoïdes

Afin d’évaluer l’action des anticorps monospécifiques sur la mobilité des spermatozoïdes, une analyse des différents paramètres de la mobilité est réalisée. Pour cela,

des spermatozoïdes éjaculés sont lavés et incubés dans un milieu contenant un antisérum dirigé contre P5 (S5/1) ou contre P13 (S13/2), puis l'analyse des trajectoires est réalisée à la Maternité Régionale de Nancy (Pr. Foliguet) (Tableau 34). Ces résultats restent cependant à confirmer, ce que nous n'avons pas pu réaliser en raison de la fin de la saison de reproduction des renards.

**Tableau 34 :** Paramètres de la mobilité de spermatozoïdes de renards incubés dans un milieu de culture normal, enrichi avec du sérum d'une souris naïve ou avec du sérum des souris immunisées contre P5 (S5/1) ou P13 (S13/1).

	spermatozoïdes milieu de culture	spermatozoïdes + sérum naïf	spermatozoïdes + S5/1	spermatozoïdes +S13/1
Numération (millions/mL)	34	37	66	33
N spermatozoïdes analysés	316	340	784	414
N trajectoires analysées	169	187	162	174
Mobilité	60%	55%	23%	43%
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	58 $\pm$ 31	49 $\pm$ 31	48 $\pm$ 27	51 $\pm$ 34
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	50 $\pm$ 33	40 $\pm$ 32	35 $\pm$ 27	43 $\pm$ 35
LIN (%)	80 $\pm$ 21	75 $\pm$ 19	71 $\pm$ 21	76 $\pm$ 19
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,2 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 0,7
ALH max ( $\mu\text{m}$ )	2,0 $\pm$ 1,1	2,1 $\pm$ 1,5	2,3 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 1,1
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	54 $\pm$ 31	43 $\pm$ 31	40 $\pm$ 26	46 $\pm$ 35

En raison du manque de références sur les paramètres normaux de la mobilité des spermatozoïdes de renard, l'analyse des résultats des spermatozoïdes témoins est à considérer avec précaution. Cependant, le pourcentage de mobilité obtenu 2h après le prélèvement (60%) semble indiquer que le prélèvement est dans un état de conservation satisfaisant au moment de l'analyse.

Le sérum naïf n'a pas d'effet sur la mobilité des spermatozoïdes, quel que soit le paramètre considéré. Que ce soit avec le sérum S5/1 ou S13/1, nous n'observons pas de différence par rapport aux spermatozoïdes incubés avec le sérum naïf pour tous les paramètres VCL, VSL, LIN, ALH, ALHmax et VAP. Cependant, nous observons une légère baisse du pourcentage de mobilité avec le sérum S13/1 (de 55% à 43%) et une forte diminution de ce pourcentage avec le sérum S5/1 (de 55% à 23%).

---

## **5. Discussion**

Le but de ce travail était d'identifier des antigènes spermatiques pouvant être utilisés dans un vaccin contraceptif ciblant le renard (*Vulpes vulpes*). En effet, les antigènes spermatiques déjà décrits pour cette espèce, LDH-C4, SP-10, PH-20 et PH-30, ne peuvent actuellement pas être utilisés dans un vaccin contraceptif, soit en raison d'un manque de spécificité, soit en raison d'un manque d'efficacité (Bradley *et al.*, 1997 ; Xu, 1998 ; de Jersey *et al.*, 1999). Nous avons utilisé une stratégie basée sur la sélection des protéines spermatiques les plus antigéniques, leur identification et leur caractérisation. Une des particularités de cette stratégie est l'utilisation de spermatozoïdes de renard, afin d'augmenter nos chances d'identifier des protéines antigéniques pour cet animal, ce qui nous a apporté certaines contraintes en raison de leur production saisonnière. Cette stratégie nous a permis de sélectionner 7 antigènes, et de caractériser certains d'entre eux. De plus, les résultats obtenus permettent d'envisager l'utilisation de cette stratégie, voire de certains de ces antigènes, pour le développement de vaccins contraceptifs dirigés contre d'autres espèces.

\*  
\* \*  
\* \* \*

Différents critères ont été proposés pour l'évaluation des antigènes spermatiques utilisables dans un vaccin contraceptif, dont les plus importants sont la spécificité d'espèce, la spécificité d'organe, l'implication dans l'interaction gamétique, la localisation en surface du spermatozoïde et l'antigénicité (Primakoff, 1994). D'autres propriétés peuvent être recherchées, comme la stabilité biochimique des antigènes, la facilité à les purifier ou à construire des formes recombinantes, mais ces propriétés sont généralement considérées comme étant secondaires.

Afin d'éviter des problèmes d'auto-immunité chez la femelle et de les restreindre au tractus génital chez le mâle, il est important que les antigènes utilisés soient **spécifiques du spermatozoïde** (Tung, 1998). L'existence de protéines spécifiques de ces cellules est liée à leurs propriétés particulières. Il existe toutefois en surface et à l'intérieur du spermatozoïde de nombreux antigènes communs avec d'autres cellules somatiques, ce qui rend inenvisageable leur utilisation *per se* pour un vaccin et rend indispensable la recherche d'antigènes ou d'épitopes spécifiques (Naz, 1999). Plusieurs épitopes spécifiques d'organes ont ainsi été décrits, comme la partie glycosylée de la glycoprotéine CD52 (Diekman *et al.*, 1999) ou l'antigène recombinant FA-1 (Naz et Zhu, 1998).

Pour s'assurer de cette spécificité de tissu, certains auteurs ont interrogé les banques de données existantes avec la séquence des antigènes identifiés (par exemple, Naz 1999). Cette approche n'est pas pertinente pour le renard, en raison du peu de protéines décrites dans cette espèce. Une interrogation des banques de données SwissProt et EMBL en janvier 2002

ne permettait de recenser que 14 protéines séquencées chez *Vulpes vulpes*<sup>1</sup>. De plus, des modifications post-transcriptionnelles, telles que les glycosylations, peuvent conférer une spécificité de tissu aux antigènes. Nous avons donc cherché à l'évaluer au niveau protéique (Anderson et Alexander, 1983), par Western blot sur des protéines extraites d'organes de renard choisis en fonction de leur importance physiologique.

A la différence des vaccins étudiés chez l'humain, pour lesquels la similitude avec des animaux représente un avantage indéniable puisqu'elle permet l'utilisation de modèles expérimentaux (Primakoff, 1994), un vaccin utilisable sur le terrain pour une vaccination par voie orale doit être **spécifique du renard**, pour ne pas affecter des espèces non-cibles, selon les recommandations de l'OMS (Stöhr et Meslin, 1997). L'exemple de la vaccination antirabique a montré que de nombreuses espèces peuvent accéder aux appâts vaccinaux : chien, chat, chat sauvage, fouine, blaireau, putois, martre, cerf, chevreuil, sanglier, musaraigne, mulot, campagnol, corneille... (Ruelle, 1993). Si ce manque de spécificité ne pose pas de grave problème en ce qui concerne la vaccination antirabique, elle serait plus problématique pour un vaccin contraceptif (Williams, 1997).

Schématiquement, un vaccin distribué par voie orale se compose de trois parties : l'antigène, le vecteur et l'appât. Il est théoriquement possible de jouer sur chacun de ces trois composants pour s'assurer d'une bonne spécificité d'espèce, sans oublier, le cas échéant, le choix de la méthode d'appâtage (Bradley *et al.*, 1999). Ce travail concernant uniquement le choix de l'antigène, c'est uniquement à ce niveau que nous évaluerons la spécificité d'espèce.

Des différences interspécifiques apparaissent dans la morphologie des spermatozoïdes, et sont prouvées par l'inefficacité des fécondations hétéro-spécifiques et par l'analyse moléculaire des protéines spermatiques ayant la même fonction. Ces différences rendent réalisable la recherche d'un antigène spécifique d'espèce. Plusieurs études ont permis de confirmer cette hypothèse, ainsi Lea *et al.* (1998-a) ont pu provoquer chez la souris une infertilité après une vaccination contre la protéine Sp17. Cet effet *in vivo* est non seulement spécifique de l'espèce souris, mais aussi spécifique de la souche utilisée.

Pour s'assurer expérimentalement de la spécificité de l'antigène, deux stratégies peuvent être utilisées : étude au niveau acides nucléiques (Southern ou Northern blot, PCR) ou au niveau protéique (Western blot). Cette dernière approche nous a semblé préférable. En effet, une forte homologie au niveau acide nucléique peut masquer des divergences au niveau protéique, et réciproquement des séquences nucléiques différentes peuvent converger vers des séquences peptidiques semblables. De plus, l'analyse au niveau acides nucléiques ne prend pas en compte les modifications post-transcriptionnelles, qui peuvent être essentielles pour la formation des épitopes. Pour toutes ces raisons, nous avons préféré évaluer la spécificité

---

<sup>1</sup> Il s'agit des protéines spermatiques FSA, LDHC4, PH-20 et kinectine ; du cytochrome b, des sous-unités I et II de la cytochrome c oxydase, du fibrinogène  $\beta$ , des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine, d'un inhibiteur de protéases, du récepteur de l'hormone stimulant les mélanocytes, de la protéine Agouti et de l'apolipoprotéine B.

d'espèce des antigènes par Western blot, en utilisant des sérums polyclonaux monospécifiques produits chez la souris. L'utilisation de sérums polyclonaux pour cette étude était particulièrement intéressant, puisque ceux-ci reconnaissant différents épitopes, les chances d'avoir un résultat faussement négatif sont *a priori* plus faibles qu'avec des anticorps monoclonaux. Cependant, dans le cas où ces anticorps reconnaîtraient des spermatozoïdes d'autres espèces, il ne faudrait pas éliminer ces antigènes mais rechercher s'il n'existe pas des épitopes spécifiques d'espèces. Les espèces utilisées pour cette étude ont été choisies en fonction de différents critères : espèces de la faune sauvage de nos régions (chevreuil, sanglier,...), espèces connues pour consommer des appâts vaccinaux antirabiques (rongeurs par exemple), proximité phylogénique avec les renards (chien, fouine, chat) disponibilité (hamster), autre intérêt économique (par exemple, lapin et cheval à protéger, ou au contraire le ragondin qui est considéré comme nuisible) ou, bien sûr, de santé publique (homme).

La fécondation est le résultat d'une suite d'événements complexes faisant intervenir de nombreuses molécules spermatiques. L'utilisation comme antigène de ces molécules **impliquées dans l'interaction gamétique** présente l'avantage de bloquer spécifiquement une étape de la fécondation. Ainsi, Primakoff *et al.* (1988 ; 1997) ont pu provoquer une infertilité chez 100% des cochons d'Inde femelles ou mâles vaccinées contre la protéine PH-20, qui est impliquée dans la reconnaissance de la zone pellucide. C'est également en inhibant la liaison spermatozoïdes - zone pellucide, cette fois avec des anticorps dirigés contre l'antigène FA-1, que Naz *et al.* (1998) ont provoqué une inhibition de la fécondation *in vitro* chez la souris.

Cependant, si le choix d'une protéine impliquée dans l'interaction gamétique est intéressant, ce critère ne semble pas indispensable. En effet, le rôle de nombreuses protéines spermatiques reste à élucider, mais l'inhibition de leur fonction pourrait perturber l'interaction gamétique qui dépend d'une cascade d'événements finement régulés. De plus, des effets contraceptifs ont pu être obtenus sans élimination de la liaison gamétique, ce qui a été montré après une immunisation de souris contre la glycoprotéine ZP3 (Greenhouse *et al.*, 1999). Ce résultat a été expliqué par des phénomènes d'encombrements stériques, qui peuvent également exister sur le spermatozoïde. L'action des anticorps anti-spermatozoïdes se traduit aussi par une baisse de la mobilité, une lyse des spermatozoïdes, une agglutination et une augmentation de la phagocytose des spermatozoïdes. Enfin, Tung *et al.* (1997) ont étudié certains mécanismes de l'infertilité chez le cochon d'Inde mâle immunisé contre la protéine PH-20. Cette immunisation a provoqué une absence totale de spermatozoïdes normaux dans l'épididyme et l'induction d'une orchite auto-immune expérimentale particulière, caractérisée par la présence d'anticorps sur les cellules germinales à l'intérieur des tubes séminifères et de la queue de l'épididyme. Ce mécanisme peut être induit par des immunisations avec des protéines qui ne sont pas impliquées dans l'interaction gamétique.

La **localisation** des antigènes en surface des spermatozoïdes est absolument nécessaire pour une contraception chez le mâle, puisque seules les protéines de surface

peuvent être atteintes par les anticorps. Cette condition est également favorisante chez la femelle (Primakoff, 1994). Cependant, dans ce cas, des antigènes présents dans le contenu de l'acrosome ou sur la membrane interne de l'acrosome, et qui seront localisés en surface du spermatozoïde après la réaction acrosomique, peuvent être efficaces (Primakoff, 1994). Ces antigènes devront se lier à des anticorps bloquant une fonction essentielle se produisant après la réaction acrosomique. Dans ce cas, ils disposeront seulement du temps relativement court entre la réaction acrosomique et la fusion à l'ovocyte pour se fixer sur les antigènes, et une concentration suffisante d'anticorps devra être obtenue sur le site de la liaison spermatozoïdes-ovocyte. Cette action est possible, les anticorps pouvant traverser la zone pellucide (Herr, 1996).

L'avantage reste donc aux antigènes de surface qui peuvent agir chez le mâle et à deux niveaux chez la femelle : lors de la pénétration du mucus cervical et lors de l'interaction gamétique, tandis que les antigènes situés dans l'acrosome ou sur la membrane interne de l'acrosome ne peuvent être atteints que chez la femelle, et seulement au moment de l'interaction gamétique (Primakoff, 1994). Il faut noter que des protéines dont la localisation principale est cytoplasmique, mais qui sont également exprimées en surface, peuvent constituer de bons antigènes. Ainsi, la LDH-C4 est principalement située dans le cytoplasme des spermatozoïdes, puisque seulement 10% de cette protéine a une localisation membranaire. Cependant, une immunisation des femelles contre cette protéine peut induire une infertilité chez la souris, le lapin et le babouin (Primakoff, 1994).

**L'antigénicité** est également une condition importante, puisque pour obtenir un effet contraceptif il est indispensable d'être en mesure de provoquer la production d'un haut titre en anticorps, afin d'atteindre un grand nombre de spermatozoïdes chez le mâle, et d'obtenir une action rapide chez la femelle.

La production des spermatozoïdes commence à la puberté, ce qui se traduit notamment par la synthèse et l'incorporation de protéines spécifiques de ces cellules. A ce moment, le système immunitaire a déjà distingué le *Soi* du *Non-soi* (Tung, 1998), ce qui fait que la plupart de ces protéines ont un fort pouvoir immunogène. Dans les conditions physiologiques normales, les spermatozoïdes sont séparés du système immunitaire par la barrière hémato-testiculaire (Pelletier, 1998), ce qui évite des réactions auto-immunes. De nombreux travaux sont donc basés sur le principe que la production d'anticorps anti-spermatozoïdes est relativement aisée à obtenir.

Cependant, les résultats obtenus sont souvent décevants (Frayne et Hall, 1999). D'une part, certains travaux ont montré qu'il n'existe pas toujours de corrélation entre le taux en anticorps sérique et l'effet contraceptif (Lea *et al.*, 1998-b), et d'autre part certaines protéines spermatiques se sont révélées être peu immunogènes, notamment chez le renard (Xu, 1998).

Différents facteurs, tels que la forme vaccinale, le vecteur ou les adjuvants, peuvent permettre d'obtenir un titre efficace en anticorps. Si un antigène contient seulement des épitopes cellules-B, il devra être conjugué à un transporteur, telles les toxines diphtérique ou tétanique, ou la cholératoxine B, qui fourniront les épitopes cellules-T permettant d'augmenter l'immunogénéicité. Si de nombreux vecteurs ont été proposés (liposomes, microsphères, ...), peu d'entre eux ont pu être testés pour les vaccins anti-spermatozoïdes, en raison du faible nombre d'antigènes spermatiques disponibles actuellement (Naz, 1999). Dans notre cas, ces vecteurs doivent également être adaptés à une vaccination par voie orale. Ainsi, l'utilisation de la salmonelle a induit une production d'IgG dans le tractus génital de renardes avec des antigènes témoins (entérotoxine d'*E.coli*), mais s'est révélée beaucoup moins efficace avec l'antigène spermatique SP10 (de Jersey *et al.*, 1999).

La sélection de protéines antigéniques et le choix des meilleurs épitopes semblent donc être indispensables pour permettre la fabrication d'un vaccin efficace.

Parmi les différentes propriétés permettant à une protéine spermatique d'être un antigène efficace pour un vaccin contraceptif, l'antéogénicité et la localisation sont particulièrement importantes. Afin d'identifier de nouveaux antigènes utilisables dans un vaccin contraceptif, nous avons choisi de sélectionner dans un premier temps les protéines les plus antigéniques en utilisant des sérums reconnaissant des protéines de surface du spermatozoïde de renard, puis de les identifier et d'en évaluer *in vitro* la spécificité et l'efficacité pour un vaccin contraceptif.

\*  
\* \*  
\* \* \*

La première étape de notre stratégie consistait à sélectionner les protéines spermatiques de renard les plus antigéniques en utilisant des sérums reconnaissant des protéines de surface. Pour produire ces sérums, deux approches ont été utilisées : l'immunisation de lapins et de renards avec des protéines spermatiques, et la vasectomie de renards.

Les **expériences d'immunisation** menées nous ont permis d'obtenir des anticorps anti-spermatozoïdes.

Pour extraire les protéines spermatiques, nous avons utilisé différents détergents : le Triton X-100, l'Igepal et le n-Octyl- $\beta$ -D-Glucoside. Il est établi que des spermatozoïdes dont la membrane est traitée avec une solution contenant 0,1% de Triton X-100 peuvent être réactivés dans différentes conditions de pH (Giroux Wideman *et al.*, 1991), ce qui montre qu'à cette concentration de détergent, qui est celle que nous avons utilisée, il est possible

d'extraire des protéines trans-membranaires ou associées à la membrane sans affecter les structures intracellulaires. Des travaux plus récents confirment que les détergents utilisant du Triton facilitent l'extraction des protéines spermatiques de surface tout en minimisant le relargage des protéines internes (Shetty *et al.*, 2001). Les autres détergents ont également été utilisés pour extraire des antigènes membranaires, tels que la protéine SOB2 avec de l'Igepal (Lefèvre *et al.*, 1997) ou la protéine P34H avec le n-Octyl- $\beta$ -D-Glucoside (Boué *et al.*, 1996). Par ailleurs, afin de réduire les risques d'immuniser les animaux avec des protéines intracellulaires, nous avons extrait les protéines à partir de spermatozoïdes vivants d'origine épидидymaire.

D'un point de vue méthodologique, il faut noter qu'il s'est avéré nécessaire de congeler les spermatozoïdes de renard avant de réaliser les Western blot. En effet, les renards possèdent une seule saison de reproduction par an, et produisent des spermatozoïdes seulement trois mois par an, de janvier à mars. La congélation des spermatozoïdes avant leur utilisation a probablement détruit des structures membranaires et des organelles, rendant possible que les protéines utilisées pour les Western blot soient des protéines de surface ou des protéines intracellulaires. C'est pourquoi nous avons testé la localisation des antigènes reconnus par les sérums obtenus par un marquage au FITC sur des spermatozoïdes éjaculés de renard. Les résultats nous ont permis de mettre en évidence que tous les sérums reconnaissent des antigènes situés en surface ou près de la surface des spermatozoïdes - la fixation des spermatozoïdes pouvant fragiliser la membrane et donc exposer des protéines intra-cellulaires - sans qu'il nous soit possible, à ce point du travail, de déterminer de quels antigènes il s'agit. La diversité des marquages obtenus semble indiquer que différents antigènes de surface sont reconnus. Ces antigènes ayant été purifiés à partir de spermatozoïdes épидидymaires, ils sont d'origine testiculaire ou épидидymaire.

Après une immunisation avec des protéines spermatiques de renard, **la réponse humorale des lapins** est caractérisée par une rapide production d'anticorps, un nombre relativement restreint d'antigènes reconnus, et une certaine homogénéité dans le profil des antigènes reconnus. Après 42 jours, les sérums de lapins reconnaissent en Western blot une moyenne de  $12,0 \pm 2,6$  bandes protéiques. Ce nombre est proche du nombre d'hétéro-antigènes reconnus par Western blot (14 à 18) après l'immunisation de hamsters dorés avec des protéines de surface de spermatozoïdes de porc (Haden *et al.*, 2000), et sensiblement supérieur au nombre de bandes observées (4 à 9) après l'immunisation de lapins avec des isoantigènes spermatiques extraits avec différents détergents (Naz *et al.*, 1984). Bien que nous n'ayons pas utilisé les mêmes détergents que ces auteurs, il est cohérent que les hétéro-antigènes reconnus soient plus nombreux que les isoantigènes. Onze des 20 bandes reconnues en Western blot sont reconnues par au moins deux sérums de lapins (>110, 97, 95, 77, 46, 40, 36, 33, 15, 11 et <10 kDa). Ces protéines particulièrement antigéniques pour le lapin sont donc en nombre relativement faible.

En comparaison avec les résultats obtenus chez les lapins, **la réponse humorale des renards** immunisés avec des isoantigènes spermatiques ne présente pas les mêmes caractéristiques : la production d'anticorps est moins rapide, moins de protéines sont reconnues par les sérums, et la réponse humorale est plus hétérogène. Après l'immunisation, la cinétique de la réponse humorale montre une apparition progressive des anticorps : le nombre de protéines reconnues augmente après les rappels, et diminue légèrement 1 à 2 mois après la dernière injection. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus par ELISA après immunisation de renards contre des antigènes gamétiques de la zone pellucide (Bradley, 1994). Une autre caractéristique de la réponse humorale des renards est sa plus grande hétérogénéité : seulement 8 des 25 bandes reconnues le sont par trois (ou plus) des six sérums de renards. Ce résultat est lié en partie à l'origine des renards, qui ne sont pas des animaux conventionnels de laboratoire, et sont génétiquement plus hétérogènes que la lignée de lapins New-Zealand. L'hétérogénéité de la réponse humorale a été également observée après l'immunisation d'élans avec des antigènes gamétiques de la zone pellucide (Garrott *et al.*, 1998), et semble être une caractéristique des animaux sauvages ou non conventionnels de laboratoire, comme le renard d'élevage (Bradley, 1994 ; Bradley *et al.*, 1999).

La différence entre les résultats obtenus chez le renard et chez le lapin souligne l'intérêt de travailler sur l'espèce cible, après la mise au point des expériences par des expériences pilotes menées sur un modèle bien connu. Les différences observées au niveau de la réponse immunitaire de ces deux espèces s'expliquent au moins en partie par des différences liées à l'espèce, par des différences individuelles et par la proximité phylogénique des protéines injectées.

L'objectif de ces expériences d'immunisation est l'identification de protéines spermatiques antigéniques, plus que la caractérisation précise de la réponse immunitaire. Ceci explique que nous ayons immunisé tous les animaux et que nous n'ayons pas utilisé comme témoins des animaux immunisés avec l'adjuvant seul. Bien qu'une comparaison avec ces sérums soit intéressante, nous étions limités par le fait que les renards sont des animaux de laboratoire qui sont onéreux, et qui doivent être hébergés dans des conditions particulières. Nous avons donc utilisé comme témoin négatif les sérums prélevés à J0. De la même manière, il n'est pas possible de comparer les réponses humorales en fonction des différents protocoles suivis, en raison de la variabilité individuelle. L'utilisation de différents détergents nous a permis d'augmenter nos chances de produire des sérums reconnaissant des protéines de surface du spermatozoïde. L'analyse par Western blot en une dimension n'est pas significative pour comparer les réponses humorales, les bandes reconnues pouvant l'être par différents isotopes d'anticorps, pouvant correspondre à différents épitopes, ou pouvant naturellement correspondre à différents antigènes de même poids moléculaire. La seule constatation relative à la réponse immunitaire que nous pouvons faire est qu'il ne semble pas y avoir de différence significative entre le nombre de bandes reconnues par les sérums des mâles et des femelles immunisés.

Afin d'identifier les protéines correspondant à ces bandes, nous les avons purifiées par **électrophorèse en 2 dimensions**. Le principe de cette méthode se base sur une séparation en deux étapes, selon les propriétés inhérentes aux différentes protéines (O'Farrell, 1975). Dans un premier temps, elles sont séparées en fonction de leur point isoélectrique - en étant conduites par un champ électrique à travers un gradient de pH, les protéines se placent à l'endroit où leur charge électrique nette est égale à zéro-, et dans un second temps en fonction de la taille moléculaire, sur un gel de polyacrylamide hydrophile. Le gradient de pH nécessaire pour la première séparation est réalisé par la migration d'ampholines, avant et en même temps que les échantillons, ce qui pose le problème du déplacement et de la déformation du gradient de pH, que l'on appelle la déformation cathodique, ce qui influe sur la reproductibilité de la méthode. Cette technique est délicate, relativement longue à réaliser, et pose différents problèmes de résolution : protéines qui se chevauchent, masquage des protéines moins exprimées (comme les récepteurs) par des protéines plus abondantes qui diffusent, spectre d'analyse relativement limité, de 10 à 100 kDa pour les PM, alors que celui des protéines varie de 5 kDa (aprotinine) à 1 MDa (titine), et des PI de 4 à 8 alors que celui des protéines varie de 2 (pepsine) à plus de 12 (protamines) (Rabilloud, 2001). Le manque de résolution pour les protéines de haut poids moléculaire ne provient paradoxalement pas de la dimension « taille moléculaire », qui est parfaitement capable d'analyser des protéines jusqu'à 200-300 kDa, mais provient de l'extraction et du maintien en solution des protéines dans des conditions très particulières (force ionique très faible, détergents non-chargés uniquement) nécessaires à la réalisation de cette technique. Ce problème de solubilité est aigu pour les protéines de haut poids moléculaire et pour les protéines intrinsèquement peu solubles dans l'eau comme les protéines membranaires hydrophobes ou les protéines nucléaires. Cette difficulté peut être contournée par les approches utilisant du SDS pour la solubilisation initiale, cependant l'élimination incomplète du SDS influe sur la reproductibilité de la technique, ce qui s'ajoute aux problèmes liés aux ampholines. C'est pourquoi nous avons utilisé une technique faisant appel à du  $\beta$ -mercaptoéthanol (O'Farrell, 1975).

Cette technique d'électrophorèse bidimensionnelle a permis la séparation de plusieurs centaines de protéines spermatiques de renards. Après Western blot, nous avons mis en évidence sept protéines antigéniques, reconnues par les sérums de lapins et de renards immunisés.

La deuxième stratégie que nous avons utilisée pour produire des anticorps anti-spermatozoïdes consistait à étudier la réponse humorale induite par la **vasectomie de renards**. Il est bien établi que la vasectomie augmente la pression intraluminale, en particulier de la queue de l'épididyme, ce qui induit une distension de l'épididyme et la formation de granulomes spermatiques. Dans beaucoup d'espèces, ces granulomes constituent un site de phagocytose des spermatozoïdes par les macrophages, et les produits de dégradation ou les spermatozoïdes entiers sont absorbés par l'épithélium épидидymaire. Ce phénomène pourrait

modifier l'environnement moléculaires et ioniques, et pourrait perturber les activités sécrétoires de l'épithélium (Légaré *et al.*, 2001). Cette réaction conduit à une apparition ou une augmentation des taux d'anticorps anti-spermatozoïdes, et à une modeste activité des lymphocytes T (McDonald, 2000). L'induction de la production d'anticorps anti-spermatozoïdes par la vasectomie a été montrée dans différentes espèces, par exemple la souris (Nakamura *et al.*, 1994), le rat (Flickinger *et al.*, 1994 ; Veräjänkorva *et al.*, 1999), le singe et l'humain (Samuel, 1978 ; Naz *et al.*, 1989). Mais ce travail est le premier à mettre en évidence l'apparition de ce type d'anticorps chez le renard.

Là encore, le but de ces expériences est l'identification de protéines hautement auto-antigéniques, plus que la caractérisation de la réponse immunitaire. Il est établi que certains rats « pseudo-lésés » (*sham*) produisent des anticorps anti-spermatozoïdes, mais d'une façon significativement moins élevée que les animaux vasectomisés (Veräjänkorva *et al.*, 1999). C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser uniquement le sérum de renards vasectomisés, et pas de renards témoins. Bien qu'une comparaison entre ces différents sérums soit intéressante, nous étions, comme pour les expériences d'immunisation, limités par le nombre de renards disponibles. De plus, la vasectomie n'induisant l'apparition d'anticorps que dans une proportion des animaux (Focacci *et al.*, 1997, Aitken *et al.*, 1988), nous avons décidé d'opérer tous les animaux dont nous disposions, et nous avons utilisé comme témoins les sérums prélevés à J0.

Nous avons mis en évidence la production d'anticorps anti-spermatozoïdes chez cinq des six renards que nous avons vasectomisés. Ces anticorps reconnaissent trente bandes protéiques en Western blot. Parmi celles-ci, dix sont reconnues par au moins deux sérums, ce qui suggère que ces protéines sont particulièrement antigéniques. Les premiers anticorps apparaissent trente jours après l'opération, et le nombre de bandes reconnues est maximal entre 120 et 150 jours après la vasectomie. Cette cinétique d'apparition est comparable à celle décrite chez le rat (Flickinger *et al.*, 1994). Le maintien de ces anticorps est également important à étudier, les renards possédant une seule saison de reproduction par an, qui est suivie par un phénomène de régression testiculaire (Maurel *et al.*, 1984). En étudiant le sérum du renard R8, nous avons montré que le nombre maximal de bandes reconnues par Western blot est atteint dans les mois qui suivent la vasectomie, et reste constant deux ans plus tard. Par cette technique, l'intensité de marquage des bandes de poids moléculaire 15-17 et 95-100 kDa augmente à la fin de la saison de reproduction, ce qui suggère que la régression testiculaire pourrait favoriser des anticorps anti-spermatozoïdes. Il a été établi que chez le vison, qui possède également une activité testiculaire saisonnière, la baisse de sécrétions de gonadotrophine et la régression testiculaire induisent la production d'anticorps anti-spermatozoïdes (Tung *et al.*, 1984). Ceci est dû au fait qu'au moment de la régression testiculaire, la barrière hémato-testiculaire devient perméable, ce qui expose les auto-antigènes spermatiques intra-cellulaires et de surface aux immunoglobulines et aux lymphocytes du sang (Pelletier, 1998). La première année, c'est au moment du début de la production spermatique que les premiers anticorps apparaissent, les renards ayant été opérés

un mois avant le début de la période d'activité testiculaire. Il est intéressant de noter que dans notre modèle, bien que le nombre de bandes reconnues ne semble pas être modifié après deux ans, l'intensité de marquage de quelques bandes semble être modifiée par la production saisonnière des spermatozoïdes et/ou la régression testiculaire.

Le marquage au FITC confirme la localisation de certains antigènes en surface des spermatozoïdes. Ces antigènes sont localisés sur différentes parties du spermatozoïde, sur l'acrosome et le flagelle. Ainsi, les sérums des renards R7 à R10 contiennent des anticorps reconnaissant des protéines de surface ou situés près de la surface, ce qui ne semble pas être le cas des sérums des renards R11 et R12. Il est établi que des sérums récoltés après des vasectomies reconnaissent des protéines intra-cellulaires, comme la protamine nucléaire (Samuel *et al.*, 1978). De plus, la technique du Western blot réalisée sur des protéines extraites de spermatozoïdes congelés n'est pas suffisamment sélective pour identifier des antigènes de surface.

La localisation de ces auto-antigènes par électrophorèse en deux dimensions montre plus précisément les protéines reconnues. Les résultats obtenus après Western blot sur protéines séparées par électrophorèse en deux dimensions sont cohérents avec les résultats obtenus par les études de Western blot en simple dimension, qui nous ont permis d'identifier dix bandes protéiques reconnues par au moins deux sérums (>150, 100-95, 97, 95, 85-80, 45, 42, 17-15, 15 et <9 kDa). Les Western blot en deux dimensions nous ont permis de confirmer ces résultats pour la plupart des antigènes cités, à l'exception des antigènes de faible poids moléculaire et de l'antigène de 45 kDa. Nous pouvons donc localiser huit auto-antigènes majeurs. Parmi ces huit auto-antigènes, certains (ceux de faible PM, et à un PM de 97 kDa) correspondent à certaines des 7 protéines identifiées par les expériences d'immunisation.

Il est établi que la nature et le développement d'anticorps anti-spermatozoïdes sont liés au mode d'induction de ces anticorps (Bohring et Krause, 2001). Les deux stratégies utilisées sont donc complémentaires, et nous ont permis d'identifier des antigènes potentiellement intéressants pour le développement d'un vaccin contraceptif.

Les auto-antigènes mis en évidence par les sérums des animaux vasectomisés induisent probablement peu d'effets secondaires pathologiques, puisqu'il a été établi chez l'homme que le développement d'anticorps anti-spermatozoïdes induits par la vasectomie ne provoque pas -ou peu- de complication physiologique, en dépit de la persistance de ces anticorps pendant des années (Massey *et al.*, 1984). Ces anticorps sont capables de maintenir une infertilité après l'opération inverse (vasovasostomie), ce qui démontre leur intérêt potentiel pour un vaccin contraceptif (Naz *et al.*, 1989), même si les antigènes reconnus par des sérums obtenus après vasectomie ne sont pas toujours situés en surface du spermatozoïde (Samuel *et al.*, 1978 ; Witkin *et al.*, 1978 ; Batova *et al.*, 2000).

Les antigènes identifiés par les expériences d'immunisation sont antigéniques, puisqu'elles peuvent induire une réponse humorale à la fois chez les lapins et chez les renards mâles et femelles. De plus, elles ont été mises en évidence avec des sérums reconnaissant des

antigènes de surface, obtenus chez des animaux ayant été immunisés avec des protéines de surface du spermatozoïde (extraites avec des détergents en faible concentration sur des spermatozoïdes non-congelés, même s'il reste possible que certaines de ces protéines ne soient pas de surface).

La suite de ce travail consistait à identifier et caractériser ces antigènes, qui sont facilement identifiables sur gels d'électrophorèse en deux dimensions colorés au Bleu de Coomassie.

\*  
\* \*  
\* \* \*

Nous avons identifié 7 antigènes que nous avons cherché à identifier et à caractériser, d'un point de vue biochimique en étudiant les glycosylations, et d'un point de vue plus biologique.

La **protéine P11** est une protéine d'un PM de 11,4 kDa et d'un PI de 6,0. Nous avons obtenu très peu d'informations concernant cet antigène. Nous avons montré qu'il s'agit d'une protéine spermatique qui présente la particularité d'être fortement antigénique mais qui est faiblement exprimée. En raison de sa faible concentration, nous avons choisi de l'electro-éluer du gel pour permettre son séquençage NH<sub>2</sub>-terminal, à la différence des autres protéines qui ont été transférées sur membrane de PVDF. Ce protocole expérimental ne semble pas bloquer la chimie d'Edman, comme nous l'avons vérifié sur une autre protéine d'un PM voisin, la Lysozyme. La protéine P11 n'ayant pas pu être identifiée par notre démarche expérimentale, il est nécessaire d'envisager d'autres stratégies pour la purifier et/ou en déterminer la séquence. En raison des faibles quantités de P11 purifiées, nous n'avons pas produit de sérum dirigé contre cet antigène.

\*  
\* \*

Les **protéines P4 et P8** sont deux protéines dont le poids moléculaire est respectivement de 16,4 et 14,7 kDa, et le point isoélectrique de 5,5 et de 6,0. Nous n'avons pas mis en évidence de glycosylation sur la protéine P8, tandis que les résultats obtenus suggèrent la présence d'oligosaccharides sur P4. L'ADNc de ces protéines a été amplifié à partir d'ARNm extrait de testicule de renard.

Le séquençage NH<sub>2</sub>-terminal de la **protéine P8** a montré une homologie avec une protéine localisée sur la membrane interne des mitochondries, la sous-unité Vb de la cytochrome-C oxydase bovine. Nous avons pu obtenir la séquence de l'ADN codant cette

protéine, par RACE PCR, puis par criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard, ce qui a confirmé cette homologie. Cette protéine existe dans de nombreux tissus (foie, cerveau, muscle,...) de différentes espèces (homme, taureau, rat, souris, ...). Elle est associée aux membranes internes des mitochondries, et a un rôle dans le transfert des électrons (oxydation terminale dans le transfert des électrons). Cette sous-unité est codée par un gène nucléaire.

Parmi les différentes sous-unités de la cytochrome-C oxydase, deux ont déjà été décrites chez le renard (*Vulpes vulpes*), il s'agit de la sous-unité I (AF028206) et de la sous-unité II (AF028230). Ces deux sous-unités codées par des gènes mitochondriaux ont été séquencées dans le cadre de la construction d'un arbre phylogénique du genre *Vulpes*, et ne présentent aucune homologie avec P8, qui est très proche de la sous-unité Vb de la cytochrome-C oxydase bovine, mais également murine ou humaine.

Le protéine P8 n'est *a priori* pas utilisable comme antigène pour un vaccin contraceptif, puisque la cytochrome-C oxydase n'est pas accessible pour les anticorps et qu'elle est indispensable au fonctionnement de toutes les cellules de l'organisme. Cependant, nous avons utilisé cette homologie avec une protéine bien connue pour valider notre démarche expérimentale nous permettant de passer de la protéine au gène. Ainsi, à partir de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale obtenue par le séquençage d'Edman, nous avons décrit une amorce dégénérée qui nous a permis d'amplifier par RACE PCR l'ADN codant cette protéine. Ce fragment de PCR a été utilisé pour le criblage de la banque d'ADNc de testicule de renard, ce qui nous a permis d'obtenir une séquence complète. Ces résultats permettent de mettre en évidence l'intérêt de la banque d'ADNc. Ainsi, la séquence de la banque permet de « corriger » deux bases obtenues par RACE PCR. Mais surtout il apparaît que la séquence d'Edman, à partir de laquelle nous avons défini l'amorce de RACE PCR, ne se situe pas en l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale mais qu'elle est plus interne à cette séquence (30<sup>ème</sup> acide aminé). Ceci est sans doute lié à un mécanisme d'hydrolyse de P8, peut-être lors du transfert précédant le séquençage. Pour réaliser ce séquençage, les protéines purifiées par électrophorèse en deux dimensions sont transférées sur une membrane de PVDF. L'avantage de ces membranes est qu'elles sont inertes en présence des solvants et détergents utilisés lors du séquençage, comme l'acétonitrile ou l'acide trifluoroacétique, au contraire des membranes de nylon ou de nitrocellulose qui se dégradent en présence de ces agents. Cependant, ce transfert peut parfois être moins performant, notamment en ce qui concerne les protéines de faible poids moléculaire ou de haut poids moléculaire. Cet exemple met en évidence la nécessité d'utiliser une banque d'ADNc pour obtenir une séquence fiable, permettant de recouvrir la totalité de la séquence codant les protéines. D'un point de vue plus technique, il faut remarquer les acides aminés 30-32 de P8 déduits de l'ADNc ne correspondent pas aux trois premiers acides aminés de la cytochrome-C oxydase, à la différence de ceux obtenus par la chimie d'Edman (tableau 23 ; figure 35). Il est donc possible qu'il existe une ou plusieurs délétion(s) dans les clones que nous avons séquencés, juste à l'extrémité 5' de l'amorce de RACE-PCR, ce qui pourrait expliquer la différence de poids moléculaire théorique (14,1 kDa) et observé sur le gel (14,7 kDa). Puisque nous n'avons pas mis en évidence de glycosylation sur P8, ce qui est par

ailleurs en accord avec les données connues sur la sous-unité Vb de la cytochrome-C oxydase, la présence de 4 à 5 acides aminés supplémentaires expliquerait cette différence de PM. Le criblage de clones supplémentaires devrait permettre de tester cette hypothèse.

Nous avons produit un **sérum monospécifique** dirigé contre P8 pour tester si les 32 acides aminés NH<sub>2</sub> terminaux de P8, qui sont différents de la cytochrome-C oxydase, ne confèrent pas à cette protéine les propriétés lui permettant d'être utilisée comme antigène dans un vaccin contraceptif.

Différents auteurs ont identifié et caractérisé des antigènes spermatiques, y compris de renard, grâce à des anticorps monoclonaux (par exemple, Xu, 1998) qui permettent d'obtenir des anticorps spécifiques d'un seul épitope. Cette spécificité peut être un avantage, mais elle peut aussi, dans certains cas, être un inconvénient. En effet si le site antigénique est altéré pour une raison ou une autre, ce qui peut arriver dans beaucoup d'expériences, les antigènes ne seront plus reconnus par les anticorps monoclonaux. Ce risque est réduit avec les anticorps polyclonaux, qui regroupent plusieurs clones se liant à de nombreux déterminants antigéniques. De petits changements de structure des antigènes, dus au polymorphisme génétique, à l'hétérogénéité des glycosylations ou à de légères dégradations, sont donc généralement sans conséquence sur l'affinité des sérums polyclonaux, ce qui représente dans notre cas un avantage certain. De plus, les sérums polyclonaux présentent l'avantage d'être plus rapides à obtenir (4 à 8 semaines, contre 3 à 6 mois pour les sérums monoclonaux), plus faciles à produire (ils ne font pas appel à des techniques de culture de cellules), tout en restant utilisables pour la plupart des applications courantes (ELISA, Western blot, ...).

Cependant, la réussite de la production de sérums polyclonaux n'est pas assurée, et dépend de nombreux critères tels que le modèle animal utilisé (espèce, sexe, âge), les conditions de l'immunisation (voie, type et qualité de l'adjuvant) et la nature de l'antigène utilisé. Le choix du *modèle animal* a été réalisé en fonction de différents critères. D'un point de vue pratique, nous avons choisi d'utiliser des souris, en raison de la facilité à prélever le sang, de la faible quantité de protéine à injecter et du fait que nous possédons déjà des souris au laboratoire. Nous avons utilisé de préférence des femelles, parce que certaines données suggèrent que les androgènes peuvent légèrement déprimer la réponse immunitaire, et parce que nous avons estimé qu'il serait plus facile de produire des anticorps dirigés contre des protéines spermatiques chez les femelles que chez les mâles. Certains autres facteurs peuvent intervenir dans la production des anticorps, comme la santé de l'animal et les conditions d'élevage. Ainsi, l'infection de souris par différents agents, tels que virus de Sendai, peut avoir un effet immunosuppresseur. Même si nous avons pris toutes les précautions recommandées, nous avons perdu toute une série d'animaux, en raison sans doute d'une infection que nous n'avons pas réussi à identifier. Pour les *conditions d'immunisation*, nous avons testé deux types d'adjuvants, l'adjuvant de Freund et un adjuvant basé sur les CpG ADN, qui augmente la réaction immunitaire tout en étant moins toxique que les autres adjuvants (Weeratna *et al.*, 2000). Les adjuvants ne sont pas toujours nécessaires pour la

production d'anticorps polyclonaux, mais ils sont souhaitables dans le cas des antigènes solubles (protéines, peptides, polysaccharides), lorsque peu d'antigènes sont disponibles, ou lorsque des antigènes sous forme native sont utilisés. De la même manière, l'injection intrasplénique est recommandée lorsque l'on utilise des antigènes en très faible quantité. Nous avons effectué deux rappels, pour des raisons de bien-être animal et parce qu'il est établi que les rappels multiples peuvent produire plus d'anticorps dirigés contre les contaminants, et donc moins spécifiques. Nous avons utilisé une plus forte quantité d'antigènes lors de la primo-injection, les faibles quantités d'antigènes n'étant pas suffisantes pour stimuler efficacement la mémoire immunitaire et pouvant induire une tolérance aux antigènes.

Le sérum dirigé contre P8 ayant été obtenu après la saison de reproduction, nous n'avons pas pu l'utiliser sur des spermatozoïdes « frais », que ce soit pour les expériences d'immunolocalisation ou pour évaluer son effet sur la liaison gamétique ou sur la mobilité. L'étude par Western blot de la spécificité de cette protéine a montré qu'elle est exprimée dans la plupart des organes testés, et seulement dans quelques espèces. Les données connues sur l'homologue de P8 suggèrent que certains de ces résultats pourraient être faussement négatifs (non expression chez les bovins, ni dans l'épididyme ou le testicule de renard), ce qui pourrait être lié à la mauvaise qualité de ce sérum. Afin de d'évaluer l'intérêt de P8, nous envisageons de produire un anticorps dirigé contre la séquence de P8 ne présentant pas d'homologie avec la cytochrome-C oxydase (32 acides aminés NH<sub>2</sub>-terminaux), après avoir vérifié que cette séquence est bien présente sur la protéine mature.

Le séquençage NH<sub>2</sub>-terminal de la **protéine P4** n'a pas montré d'homologie significative avec des protéines connues, mais nous a permis de définir une amorce dégénérée qui nous a permis d'amplifier par RACE PCR son ADNc. Cette séquence comporte 76 codons, dont 3 codons *non-sens*. De plus, les 6 acides aminés suivants la séquence correspondant à l'amorce utilisée pour la RACE PCR ne correspondent pas aux résultats obtenus par le micro-séquençage d'Edman. En analysant cette séquence au niveau ADN (tableau 17), il apparaît que certaines erreurs de séquences permettent de décaler le cadre de lecture, et de se rapprocher de la séquence d'Edman. Par exemple, en supprimant la base C placée en 12<sup>ème</sup> position, le cadre de lecture serait déplacé et le nouveau codon coderait pour une Arginine, comme suggéré dans la séquence d'Edman. De même, la suppression de la première base du codon suivant ferait que ce codon coderait pour une Valine, ce qui correspond là encore à la séquence d'Edman... Ces extrapolations sont à considérer avec précaution, mais elles montrent la nécessité d'obtenir la séquence de P4 à partir de la banque d'ADNc afin de réduire ce risque d'erreur, et d'interpréter fidèlement cette séquence. Une étude en spectrométrie de masse permettra de valider cette séquence en montrant si elle correspond bien à la protéine P4 sélectionnée. Les prédictions réalisées à partir de la

séquence de RACE PCR obtenue sont difficilement interprétables, même si ce fragment de PCR pourra être utilisé pour le criblage de la banque d'ADNc.

L'interrogation des banques de données montre que la séquence de P4 présente de fortes homologies avec le précurseur mitochondrial de la NADH ubiquinone oxydoreductase. Cette homologie n'apparaît pas lors des interrogations effectuées avec la séquence NH<sub>2</sub>-terminale, les quatre acides aminés NH<sub>2</sub>-terminaux montrant une divergence avec cette protéine mitochondriale. Il s'agit d'une protéine complexe, composée de 30 sous-unités, localisée dans la matrice et le cytoplasme de la membrane interne des mitochondries, et dont la fonction est le transfert des électrons. L'homologie avec cette protéine s'arrête à partir de l'acide aminé 45, qui correspond précisément à un codon *non-sens*. Là encore, l'établissement d'une séquence fiable à partir d'une banque d'ADNc de testicule de renard permettra de lever ces ambiguïtés.

Deux des protéines identifiées sont d'origine mitochondriale. Les mitochondries sont des organelles très exprimées dans les spermatozoïdes, situées d'une façon caractéristique, en hélice autour de la fibre dense de la pièce intermédiaire du flagelle (Yanagimachi, 1994). Cette hélice serait stabilisée par une capsule mitochondriale, composée notamment de la protéine SMCP (Herr *et al.*, 1999). Cette protéine s'est révélée être un auto-antigène reconnu par des sérums de rats immunisés avec des spermatozoïdes et des sérums d'animaux vasectomisés. Elle est principalement exprimée après la puberté, dans les spermatides allongés, ce qui fait qu'elle pourrait être reconnue comme faisant partie du *Non-Soi* par le système immunitaire. L'étude de l'intérêt de cette protéine en tant que modèle expérimental d'orchite auto-immune, ou en tant qu'antigène présent chez des patients présentant une infertilité liée aux anticorps, est envisagée (Herr *et al.*, 1999). Bien que la localisation et sans doute l'expression de la protéine SMCP et des deux protéines mitochondriales P4 et P8 soient sensiblement différentes, nos résultats comme ceux de ces travaux suggèrent que la forte expression des mitochondries dans les spermatozoïdes est un argument favorisant l'antigénicité de ses protéines.

\*

\* \*

La **protéine P3** est une protéine d'un PM de 16,8 kDa et d'un PI de 5,3. Nous avons montré par les expériences de marquage avec les lectines et par digestion enzymatique que P3 possède des groupements glycosylés. L'étude des glycosylations avait un double objectif. D'une part, elle permet d'estimer la taille de la partie peptidique des antigènes sélectionnés, ce qui est indispensable pour nous assurer que les séquences que nous avons obtenues correspondent bien aux antigènes sélectionnés. D'autre part, les études menées avec les lectines permettent d'avoir une idée plus précise de la nature des groupements glucidiques des glycoprotéines. Les groupements glycosylés confèrent aux protéines des propriétés

particulières par exemple dans la reconnaissance cellulaire – et particulièrement dans l'interaction gamétique (Oehninger, 2001), mais également en ce qui concerne l'antigénicité et les caractéristiques biochimiques (PM, PI). S'ils sont souvent moins antigéniques que les parties peptidiques, ils peuvent cependant être la cible de vaccins (exemple du vaccin dirigé contre la glycoprotéine G du virus de la rage, Masson *et al.*, 1999). Différentes lectines, dont *Concanavaline A*, *Dolichus biflorus* et *Ulex europaeus* ont été utilisées avec succès pour étudier la partie glucidique de glycoprotéines d'origine épидидymaires (Saez *et al.*, 2000) et de protéines situées en surface du spermatozoïde (Fierro *et al.*, 1996 ; Fierro *et al.*, 1998). Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines qui reconnaissent spécifiquement et marquent différents glucides. Il est établi qu'elles constituent un excellent outil de caractérisation des glucides formant les chaînes oligosaccharides des glycoprotéines. La combinaison des lectines avec différentes procédures de déglycosylation permet également la détermination du type de liaison au squelette peptidique. De nouvelles lectines sont régulièrement découvertes, cependant celles que nous avons utilisées dans ce travail sont celles pour lesquelles nous avons le plus d'expérience. Dans ce travail, certaines lectines marquant les mêmes glucides (par exemple *Pisum sativum* et *Concanavalin A*, qui marquent le mannose) peuvent varier dans les résultats, ce qui est par exemple le cas de P3 qui est marqué par *Pisum sativum* mais pas par la *Concanavalin A*. Ceci est dû à des différences d'affinités entre les lectines en fonction de la nature de l'oligosaccharide sur lequel le sucre est attaché (Saez *et al.*, 2000).

La glycoprotéine P3 serait d'origine épидидymaire. Le séquençage selon la technique d'Edman de cette protéine nous a permis d'obtenir la séquence de vingt acides aminés NH<sub>2</sub>-terminaux, montrant une homologie avec la protéine épидидymaire de porc EP1. Cette protéine a été décrite par Parry *et al.* (1992) dans le cadre d'un travail visant à identifier des protéines se liant à la zone pellucide. Afin de distinguer les protéines de bas poids moléculaire présentes sur des spermatozoïdes éjaculés et épидидymaires, et celles du plasma séminal, les auteurs ont réalisé le séquençage NH<sub>2</sub>-terminal de différentes protéines. Ils ont ainsi montré que les protéines épидидymaires qu'ils avaient sélectionnées étaient différentes de celles présentes sur les spermatozoïdes éjaculés. Dans le cadre de ce travail, les protéines épидидymaires EP1 et EP3 n'ont pas été plus caractérisées. Les seules informations que nous possédons sur cette protéine EP1 concernent donc sa présence sur les spermatozoïdes de porc et son poids moléculaire (environ 16 kDa) voisin de celui de la protéine sur laquelle nous travaillons. L'information la plus importante que nous retirons de cet article est l'origine épидидymaire de cette protéine, ce qui nous a permis d'obtenir une séquence par RACE PCR réalisée à partir d'ARNm extraits d'épididyme de renard.

L'importance des protéines épидидymaires dans l'acquisition du pouvoir fécondant du spermatozoïde et dans l'expression d'une fertilité normale est bien établie. L'épididyme intervient de deux manières sur la maturation du spermatozoïde. D'une part, il contribue à créer un environnement particulier dans lequel se trouve le spermatozoïde pendant le transit

épididymaire, et d'autre part il sécrète des protéines spécifiques qui se fixent au spermatozoïde. La plupart de ces protéines spécifiques sont sécrétées dans la tête de l'épididyme (Fournier-Delpech et Thibault, 1991).

L'analyse de la séquence obtenue pour P3 montre que cette protéine aurait une localisation membranaire. Il existe différents exemples de protéines épididymaires présentes en surface du spermatozoïde. Par exemple, la protéine épididymaire AEGL1, l'équivalent humain de la protéine de rat DE, est associée faiblement à la surface du spermatozoïde, ce qui suggère que son implication dans la fusion à la membrane vitelline serait moins évidente chez l'humain que chez le rat (Ellerman *et al.*, 1998). La protéine HE4 est également une protéine épididymaire associée faiblement à la membrane du spermatozoïde. Elle est éliminée du spermatozoïde pendant la capacitation (Yeung *et al.*, 1997). Une autre protéine sécrétée par l'épididyme présente en surface du spermatozoïde, FLB1, semble être impliquée dans la liaison à l'ovocyte (Boué *et al.* 1995), tandis que la protéine P34H est impliquée dans la reconnaissance de la zone pellucide (Boué *et al.*, 1996). Au contraire de ces protéines, le produit du gène HE5 exprimé dans l'épididyme, qui fournit la partie peptidique de l'antigène de surface CD52, est fortement lié à la membrane du spermatozoïde, par l'intermédiaire d'une liaison à une « ancre » glycosylphosphatidylinositol. Cet antigène CD52 n'est pas spécifique du spermatozoïde, puisqu'il se retrouve également en surface des lymphocytes (Yeung *et al.*, 1997). Il est établi que des anticorps dirigés contre cet antigène réduisent significativement la mobilité des spermatozoïdes, sans doute en raison d'une baisse de l'activité de cette protéine. La complexation des anticorps avec des antigènes membranaires ne peut affecter les structures membranaires que si une forte concentration d'anticorps est fixé sur les structures membranaires, ce qui diminue la fluidité membranaire. En utilisant le pourcentage de mobilité comme index de la viabilité des spermatozoïdes, Hale *et al.* (1993) n'ont pas pu mettre en évidence un effet sur les spermatozoïdes des anticorps dirigés contre CD52 en l'absence du complément. Des anticorps dirigés contre un autre antigène d'origine épididymaire, GZS-1, ont également une action inhibitrice de la fécondation, mais par un autre mécanisme d'action, à savoir une agglutination des spermatozoïdes (Hutter *et al.*, 1996). Il faut noter que cet antigène se retrouve aussi sur les monocytes humains. Ces différents exemples soulignent l'importance des protéines épididymaires, qui peuvent donc se révéler être des cibles efficaces pour un vaccin contraceptif.

La séquence de P3 ne montre pas d'homologie avec les différents antigènes épididymaires cités. Tous les antigènes d'origine épididymaire ne sont pas spécifiques d'organe, ce qui semble être également le cas de P3, d'après les résultats obtenus par Western blot. Cependant, d'après nos expériences, le sérum dirigé contre la protéine P3 ne réagit qu'avec des protéines ayant d'autres PM, ce qui pourrait s'expliquer soit par un manque de spécificité du sérum, soit par la présence de différentes isoformes de P3. Il serait donc particulièrement intéressant de vérifier l'effet d'anticorps dirigés contre P3 ou contre certains épitopes de P3 sur la liaison à la zone pellucide, l'agglutination des spermatozoïdes ou

l'inhibition de la mobilité, la localisation membranaire probable de P3 rendant cet antigène particulièrement attractif pour un vaccin contraceptif.

\*  
\* \*

La **protéine P7** est une protéine d'origine testiculaire, dont le poids moléculaire est de 16,4 kDa et le PI de 6,2. Nous n'avons pas pu produire de sérum dirigé contre cette protéine, ce qui nous a limité dans sa caractérisation.

La séquence NH<sub>2</sub>-terminale de P7 ne présente pas d'homologie avec des protéines déjà décrites. A partir de cette séquence, nous avons défini une amorce dégénérée nous permettant d'amplifier l'ADNc codant cette protéine par RACE PCR. Même si la séquence obtenue ne semble pas parfaite (présence de codons *non-sens*), elle est en accord avec la séquence d'Edman. Comme pour P4, seule la séquence définitive obtenue par criblage de la banque d'ADNc sera à considérer, cependant l'analyse préliminaire réalisée sur la séquence du fragment de RACE PCR suggère que P7 a une localisation membranaire, ce qui rendrait cette protéine accessible pour les anticorps. Elle présente de plus différentes régions particulièrement antigéniques, en particulier un site (acides aminés 82 à 94) qui serait extracellulaire. Les résultats obtenus concernant les glycosylations de la protéine P7 sont contradictoires, puisqu'elle réagit avec certaines lectines (*Concanavalin A*, *Phytolacca americana*, *Pisum sativum*, *Tetragonolobus purpureas*), mais que la digestion enzymatique n'a pas permis de mettre en évidence de différence de poids moléculaire avant et après digestion.

Un fragment de 32 acides aminés de P7 présente une homologie de 58% avec la proacrosine de porc. La proacrosine est la forme zymogène de l'acrosine, une sérine protéase majeure localisée dans la matrice acrosomale des spermatozoïdes de mammifères. L'acrosine joue un rôle essentiel dans la liaison à la zone pellucide, elle est constituée d'une chaîne lourde (qui présente l'activité catalytique) et d'une chaîne légère, reliées par deux ponts disulfure (Baba *et al.*, 1989). L'homologie entre P7 et la proacrosine de porc est située à la fin de la chaîne lourde de l'acrosine. L'acrosine est glycosylée par la présence de sucres GlcNAC N-liés.

L'analyse de la séquence de la protéine P7 montre que cette protéine est potentiellement intéressante comme antigène contraceptif, en raison de sa localisation membranaire et de son antigénicité. De plus, son homologie partielle avec la proacrosine de porc la rend particulièrement attractive. Ces données devront être confirmées par le criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard. Enfin, la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette protéine permettra de mieux appréhender son intérêt pour un vaccin contraceptif.

\*

\* \*

La **protéine P5** est une glycoprotéine d'un PM de 16,9 kDa et d'un PI de 5,8. Comme P3, elle est exprimée dans l'épididyme.

Par RACE PCR, nous avons obtenu l'ADNc codant cette protéine. Sa séquence comprend une seule ambiguïté (base 95), et sa traduction ne fait pas apparaître de codon *non-sens*. Elle présente une bonne corrélation avec la séquence obtenue par la chimie d'Edman, ce qui n'était pas le cas d'un des produits de RACE PCR, correspondant au gène de la protéine *Rab11*. Ceci souligne la difficulté de la technique de RACE PCR, qui utilise un cocktail d'amorces pouvant s'hybrider avec différents fragments d'ADN. L'analyse de la séquence de P5 est à considérer avec précaution, tant que nous ne possédons pas la séquence par criblage de la banque d'ADNc, elle suggère cependant que P5 aurait une localisation membranaire, et présenterait différents sites antigéniques. La protéine P5 ne présente pas d'homologie significative avec des protéines déjà décrites. D'un point de vue biochimique, l'antigène P5 est reconnu par différentes lectines, et présente un site d'attachement des lipides sur les lipoprotéines membranaires.

Nous avons produit un sérum dirigé contre la protéine P5, ce qui nous a permis d'évaluer la spécificité d'espèce et d'organe de cette protéine. Cet antigène est retrouvé sur les spermatozoïdes de la plupart des espèces testées, et sur tous les organes de renard testés. Cependant, nous avons observé que les souris immunisées contre P5, pour produire ce sérum polyclonal monospécifique, n'ont pas développé de symptôme visible de maladie auto-immune (réaction inflammatoire locale). Mais les résultats des Western blot rendent nécessaires la recherche d'épitopes spécifiques.

En utilisant un sérum polyclonal de souris dirigé contre P5, nous avons pu déterminer en microscopie électronique plusieurs localisations possibles pour cette protéine, dont les principales sont dans le noyau et sur les fibres denses. Par ailleurs, cette protéine aurait la même localisation sur les spermatozoïdes humains que sur les spermatozoïdes de renard (Pr Foliguet, communication personnelle).

Différentes *protéines nucléaires* ont été identifiées comme étant antigéniques, par exemple la protamine (Samuel *et al.*, 1978), l'ADN polymérase (Witkin *et al.*, 1978) ou la NASP (Nuclear antigenic sperm protein, Batova *et al.*, 2000). Celles-ci étant localisées uniquement dans le noyau et n'étant pas accessibles pour les anticorps, elles ne peuvent pas être utilisées comme cible pour un vaccin contraceptif. La localisation de P5 déterminée en microscopie électronique n'est pas opposée aux résultats obtenus par immunofluorescence

indirecte (localisation sur la tête), la fixation des spermatozoïdes pouvant perméabiliser les membranes et donc rendre accessibles aux anticorps les antigènes nucléaires.

Des protéines situées sur les *fibres denses* peuvent également être antigéniques, comme cela a été montré pour les protéines odf1 et odf2 (Flickinger *et al.*, 2001). Chez le rat, l'isolement des fibres denses et leur analyse en SDS-PAGE montre qu'elles sont composées de différentes protéines, notamment certaines dont la masse moléculaire est de 84, 80, 32, 27,5, 20 et 14,4 kDa (Kim *et al.*, 1999). Les interactions moléculaires complexes entre les différentes protéines du cytosquelette sont actuellement étudiées, ce qui permettra de mieux comprendre le rôle des fibres denses, dont on pense qu'elles jouent par leurs propriétés élastiques un rôle de protection du spermatozoïde contre les forces de cisaillement (Baltz *et al.*, 1990). Ce phénomène est particulièrement important pour la mobilité du spermatozoïde. Même la localisation de P5 sur les fibres denses reste à confirmer, il est intéressant de souligner la proximité des poids moléculaires de P5 et de l'une des protéines constitutives des fibres denses du rat (14,4 kDa). Il faut également souligner que les anticorps dirigés contre P5 semblent inhiber la mobilité des spermatozoïdes. Par ailleurs, il reste à étudier la vitalité des spermatozoïdes incubés avec les anticorps dirigés contre P5, pour savoir si cette baisse de mobilité est due à une baisse du nombre de spermatozoïdes vivants.

Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer la fréquence avec laquelle les protéines des fibres denses sont identifiées comme auto-antigène (Flickinger *et al.*, 2001). Premièrement, ces protéines sont abondantes : elles représenteraient environ 40% des protéines spermatiques. Deuxièmement, ces protéines sont résistantes à la dégradation : elles seraient parmi les derniers débris des spermatozoïdes lors de leur dégradation, elles sont présentes à l'intérieur des granulomes spermatiques et sont encore visibles à l'intérieur des lysosomes lors de la phagocytose. De plus, il a été montré *in vitro* que les fibres denses sont résistantes à la solubilisation, peut-être en raison de la présence de nombreux ponts di-sulfure. Ces données suggèrent que les fibres denses constituent un important stock d'antigènes, qui peut être libéré peu à peu, agissant pendant une longue période de temps comme stimulus pour le système immunitaire. De plus, les fibres denses sont spécifiques du spermatozoïde. Elles sont produites uniquement à partir de la puberté, dans les spermatides. Elles échappent donc à la reconnaissance par le système immunitaire en tant que protéines du *Soi*, et sont donc capables d'induire une réponse humorale lorsqu'elles ne sont plus séquestrées par la barrière hémato-testiculaire ou hémato-épididymaire. Ceci peut se produire après une immunisation ou après une vasectomie, qui provoque souvent une rupture des canaux du tractus génital. Cependant, l'absence de spécificité d'organe de P5 suggère que cette protéine n'est pas spécifique des fibres denses.

Puisque nous disposons d'anticorps dirigés contre P5 pendant la saison de reproduction, nous avons testé leur action sur la liaison à la zone pellucide et sur la mobilité des spermatozoïdes. La mobilité est une propriété importante des spermatozoïdes, qui permet la pénétration dans le mucus cervical, la remontée utérine et tubaire jusqu'au lieu de la

fécondation, et enfin la traversée des enveloppes périovocytaires. Cette caractéristique est donc fondamentale pour assurer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Il est bien établi que certains anticorps anti-spermatozoïdes peuvent altérer certaines de ces caractéristiques, telles que la VSL et l'ALH (De Alméida *et al.*, 1991), allant jusqu'à l'immobilisation. D'autres anticorps peuvent au contraire augmenter cette mobilité, sans que le mécanisme mis en jeu ne soit clairement identifié (Aitken *et al.*, 1988). D'un point de vue méthodologique, il faut souligner l'importance, dans ce genre d'étude, de nombreux paramètres pouvant affecter la mobilité des spermatozoïdes, tels que la température, le milieu d'incubation, le délai entre le prélèvement et l'analyse,... Ces conditions pré-analytiques (par exemple, récolte des spermatozoïdes, purification sur un gradient de Percoll, transport) et analytiques (par exemple, champs d'acquisition, nombre de trajectoires étudiées...) ont été déterminées pendant ce travail. En particulier, si la centrifugation sur gradient de Percoll peut modifier la glycosylation de protéines spermatiques, cette méthode a été largement employée pour enrichir en spermatozoïdes mobiles les prélèvements utilisés pour les fécondations *in vitro* (De Maistre *et al.*, 1996). Ce type de préparation est donc adaptée à l'étude de la mobilité. Cependant, en raison de la fin de la saison de production des spermatozoïdes de renard, nous n'avons pas pu tester suffisamment d'échantillons pour évaluer l'action des anticorps que nous avons produits (courbe effet-dose, effet de chacun des anticorps sélectionnés, ...). En ce qui concerne P5, il semble que les anticorps dirigés contre cette protéine aient un effet immobilisant sur les spermatozoïdes. Chez l'humain, différents anticorps immobilisants ont été identifiés, certains inhibent également la capacitation des spermatozoïdes (Myogo *et al.*, 2001) ou la liaison à la zone pellucide (Kamada *et al.*, 1999).

La liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide est une étape clé parmi les processus menant à la fécondation. Cette étape implique souvent des molécules spécifiques d'espèce, qui sont donc particulièrement attractives pour un vaccin contraceptif. Il est important de vérifier si les anticorps dirigés contre P5 inhibent la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide par un test *in vitro*, ce qui présente l'avantage d'économiser des animaux, de mettre en évidence et d'expliquer en partie un effet contraceptif (cet effet peut être la résultante de différents mécanismes : masquage des récepteurs, agglutination des spermatozoïdes, immobilisation, ...). Ce type d'explication est important pour un vaccin contraceptif, la compréhension du niveau d'action des antigènes pouvant permettre d'adapter la formule vaccinale. Enfin, il faut noter que certains anticorps peuvent avoir un effet sur la fécondation sans que celui-ci soit mis en évidence par ce test de liaison à la zone pellucide, ce qui pourrait par exemple être le cas d'anticorps provoquant la baisse de la production de spermatozoïdes normaux (Tung *et al.*, 1997), ou inhibant certains paramètres de la mobilité (De Almedia *et al.*, 1991).

Les anticorps dirigés contre P5 inhibent significativement la liaison à la zone pellucide, sans que la localisation principale de cette protéine, déterminée expérimentalement, nous permette d'expliquer cette action. Par contre, la possible localisation membranaire

déduite de la séquence primaire de cette protéine pourrait expliquer ces effets. Des études complémentaires, faisant par exemple appel à des sérums plus efficaces ou à la microscopie confocale, pourront permettre de confirmer la localisation de P5.

Les anticorps dirigés contre P5 permettent de diminuer significativement la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide, et semble réduire la mobilité des spermatozoïdes. A ces deux résultats obtenus *in vitro*, il faut ajouter la forte antigénicité de P5 déterminée *in vivo*, ce qui rends P5 particulièrement attractive comme antigène pour un vaccin contraceptif, à condition de déterminer les meilleurs épitopes. Ceux-ci devront être antigéniques, ce qui peut être déterminé expérimentalement par le technique du Pepscan comme cela a été réalisée pour PH-20 (Chan *et al.*, 1999) ou la FSH (Gobert *et al.*, 2001), et spécifiques d'organe et d'espèce (voir les travaux de Norton *et al.*, 2001 concernant le choix d'un épitope spécifique du testicule pour CD52).

\*  
\* \*

La **protéine P13** est une glycoprotéine d'origine testiculaire, d'un PM de 97 kDa et d'un PI de 4,3 à 4,6. A partir de la séquence obtenue par le micro-séquençage NH<sub>2</sub>-terminal, nous avons mis au point une RT-PCR permettant l'amplification d'un fragment de 369 pb codant cette protéine. Ce fragment a servi de sonde pour le criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard, permettant de séquencer la totalité de l'ADN codant cette protéine.

La protéine P13 présente une homologie importante avec différentes protéines spermatiques, FS2, CBP86 et, à un degré moindre, RSA17.

L'homologie la plus importante concerne la protéine FS2 (fibrousheatin 2). L'homologie avec cette protéine spermatique est apparente tant au niveau séquençage NH<sub>2</sub>-terminal (100% d'homologie avec une séquence interne de FS2) qu'au niveau de la séquence complète obtenue par criblage d'une banque d'ADNc (60% des acides aminés). Peu d'informations sont connues concernant cette protéine humaine, dont on sait seulement qu'elle est spécifique de tissu (testicule et spermatozoïdes) et qu'elle est associée à la gaine fibreuse des spermatozoïdes. La gaine fibreuse est décrite comme une structure insoluble *kératine-like*, composée de différentes protéines, au nombre de 18 chez le rat (Kim *et al.*, 1997) et au moins 6 chez la souris. Chez l'humain, 7 protéines sont identifiées, dont l'une d'un PM de 97 kDa. Il faut noter que la formation et la taille physique de la gaine fibreuse sont différentes chez le rat et chez l'humain, ce qui montre que différentes protéines ou mécanismes biochimiques permettent d'obtenir une même fonction biologique (Kim *et al.*, 1997).

La protéine P13 présente aussi dans sa partie C terminale une homologie (54% des acides aminés) avec la protéine CBP86 (Calcium binding protein). Il s'agit d'une protéine

humaine, spécifique du testicule, localisée sur le flagelle du spermatozoïde et qui est phosphorylée pendant la capacitation. Différentes CBP, telles que la calmoduline, une phosphatase, la  $Ca^{2+}$  sequestering molecule, un antigène impliqué dans la réaction acrosomique et une protéine impliquée dans l'interaction gamétique, ont déjà été décrites dans les cellules germinales mâles dont les spermatozoïdes (pour revue, Gye *et al.*, 2001). Ces molécules présentes sur des spermatozoïdes épидидymaires et dont le rôle est de lier le calcium assurent des fonctions importantes, notamment dans la stabilisation de la structure du spermatozoïde, l'homéostasie du calcium, la régulation de la mobilité et l'intégrité de la matrice acrosomale. Sur les spermatozoïdes éjaculés, elles jouent un rôle dans la mobilité, la capacitation, l'interaction gamétique et la réaction acrosomique. La plupart des CBP sont de faible PM (<20 kDa). L'analyse de la séquence de CBP86 et de FSP2 montre que la première pourrait être une forme tronquée de la seconde.

Enfin, la protéine P13 présente dans son extrémité  $NH_2$ -terminale une homologie moins marquée mais significative (48% entre les acides aminés 1 et 56, et 36% entre les acides aminés 80 et 110) avec la protéine RSA17 (Rabbit Sperm Antigen 17, ou Sp17). Il s'agit d'un antigène très important, identifié dans des spermatozoïdes de différentes espèces (lapins, souris, hamster, macaque, humain...), et qui est impliqué dans l'interaction gamétique et particulièrement dans la liaison à la zone pellucide. Cette protéine a par ailleurs une structure permettant la liaison avec les calmodulines (Wen *et al.*, 1999), mais dans sa région C terminale (AA 108-137) qui ne présente pas d'homologie avec P13. Il est établi que Sp17 est une protéine se liant à la zone pellucide qui n'est localisée ni en surface de la membrane plasmique ni sur l'acrosome, mais qui est trouvée dans le cytoplasme de la tête du spermatozoïde et, plus légèrement, associée à la face interne de la membrane plasmique, mais également dans le cytoplasme de la région post-acrosomique et tout le long du flagelle (Wen *et al.*, 1999). Sp 17 devient apte à lier la zone pellucide lorsque la réaction acrosomique a lieu. A ce moment, les modifications de localisation sont associées à un clivage protéolytique résultant notamment dans la perte des sites de liaison aux calmodulines, ce qui, en libérant les calmodulines, influencerait sur le taux de  $Ca^{2+}$ . Ce processus de protéolyse est un mécanisme bien décrit de régulation de la fonction et de la localisation de différentes protéines, par exemple de la protéine spermatique de la gaine fibreuse de souris AKAP, synthétisée sous forme de précurseur pro-AKAP82. Enfin, en utilisant un vaccin contraceptif dirigé contre Sp17, Lea *et al.* (1998-a) ont réussi à provoquer une infertilité souche-spécifique chez 100% des souris utilisées, ce qui montre que certains épitopes de Sp17 peuvent être hautement spécifiques.

L'étude des relations entre la protéine P13 et la protéine Sp17 est donc particulièrement intéressante, notamment pour déterminer si cette homologie peut être due à une convergence fonctionnelle ou si la protéine P13 serait un précurseur de Sp17, même si cette hypothèse est très peu probable en raison du faible degré d'homologie entre ces deux protéines. Nous avons testé par Western blot des anticorps dirigés contre la protéine recombinante RSA17 (Wen *et al.*, 1999), aimablement fournis par le Pr. O'Rand (Université

de Caroline, USA). Ces anticorps ont reconnu sur des protéines extraites de spermatozoïde de renard séparées par SDS-PAGE une bande à 24 kDa, qui ne correspond donc pas à la protéine P13. Ce résultat est intéressant puisqu'il montre pour la première fois que le renard possède un homologue de la protéine RSA17, qui a le même PM que celui de la protéine décrite chez le lapin. Les anticorps dirigés contre P13 ne reconnaissent pas des protéines d'autres PM, en particulier avec l'équivalent renard de RSA17, ces deux protéines sont bien distinctes chez le renard.

Après criblage d'une banque d'ADNc, nous avons pu obtenir la séquence de l'ADNc codant la protéine P13. Il faut remarquer que la séquence du peptide NH<sub>2</sub> terminal obtenu par la chimie d'Edman ne se retrouve pas à l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale de la séquence déduite de l'ADNc, mais en position interne (276-287). Ce résultat ne peut pas être dû à la chimie d'Edman, mais pourrait être expliqué par une hydrolyse préférentielle de la protéine P13 avant le séquençage, par exemple lors du transfert. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu pour P8, pour laquelle la séquence d'Edman s'est aussi révélée être interne par rapport à la séquence déduite de la banque d'ADNc.

La séquence de P13 présente plusieurs cadres de lecture (ORF) compatibles avec la séquence d'Edman (ouverture possible de l'ORF en position 74, 323, 371, 422, 620, 668, 689 de l'ADNc). Cependant, seule l'ouverture de l'ORF en position 74 est compatible avec les données obtenues en spectrométrie de masse, ce qui constitue une preuve expérimentale de l'ORF proposé. Celui-ci code une protéine de 499 acides aminés, d'un PM théorique de 53 kDa. Ce PM est bien inférieur au PM obtenu expérimentalement (97 kDa). Différentes hypothèses sont envisageables pour expliquer cette différence de PM. La possibilité la plus probable serait la présence de modifications post-traductionnelles, et notamment des glycosylations, qui augmenterait le PM de la protéine mature par rapport à celui de sa partie peptidique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé la digestion de la protéine P13 par des glycosylases, ce qui nous a permis de montrer que la partie peptidique de P13 (après digestion) était d'un PM de 66 kDa. Seulement 65% de la molécule seraient donc d'origine protéique, et 35% seraient représentés par les oligosaccharides. Ce type de protéines existe mais demeure très rare. Un monosaccharide ajoutant en moyenne 162 Dalton au PM de la protéine, ceci veut dire qu'environ 200 hexoses sont nécessaires, ce qui représente une dizaine d'embranchements. Pour expliquer la différence entre le PM théorique (53 kDa) et le PM obtenu après digestion (66 kDa), différentes hypothèses sont envisageables. La digestion des glucides peut être incomplète, la combinaison des deux enzymes utilisées éliminant les sucres Gal(β1-3)GalNAc(α1) liés à des sérines ou thréonine, ainsi que tous les acides sialiques substitués Gal(β1-3)GalNAc(α1). Une autre possibilité serait que le PM déterminé sur le gel d'électrophorèse après digestion donne un résultat incorrect, en raison d'un problème particulier (phosphorylation, formation anionique, ...). Il a ainsi été montré que la migration des CBP en SDS-PAGE était différente en l'absence et en présence de Ca<sup>2+</sup> (Gye *et al.*, 2001).

Nous avons produit un anticorps de médiocre qualité dirigé contre cette protéine. En utilisant un marquage au FITC, nous avons localisé cet antigène sur le flagelle du spermatozoïde. Cette localisation est cohérente avec ce que l'on sait des homologues identifiés, FS2 et CBP86, qui ont respectivement une localisation sur la gaine fibreuse et sur le flagelle. D'un point de vue méthodologique, il faut remarquer que la fixation des spermatozoïdes avant cette expérience a perméabilisé les membranes, ce qui fait que le marquage sur le flagelle que nous avons obtenu peut être dû à des protéines situées en surface et/ou près de la surface des spermatozoïdes.

La protéine P13 présente de nombreux atouts comme antigènes pour un vaccin immunocontraceptif. D'une part, elle s'est révélée être particulièrement immunogène, puisqu'elle est reconnue par le sérum des lapins immunisés, mais aussi des renards mâles et femelles immunisés, et des renards vasectomisés. Les Western blots réalisés sur la protéine purifiée avec ces sérums ont montré que différentes bandes, correspondant à différentes formes dégradées, sont reconnues, ce qui suggère que P13 présente différents épitopes. D'autre part, une étude menée au laboratoire sur 76 sérums de renards mâles sauvages a permis d'en sélectionner 8 reconnaissant des antigènes spermatiques (Boué *et al.*, 2001). Parmi ces 8 sérums, nous avons montré que 2 reconnaissent la protéine P13, ce qui montre que cette protéine est aussi antigénique dans des cas naturels, ce qui renforce les arguments concernant son antigénicité. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il a été établi que le PI acide de certaines molécules est généralement défavorable à la liaison des anticorps (Anderson et Alexander, 1983), et que le PI de P13, déterminé expérimentalement, est de 4,3.

Nous n'avons pas pu tester la spécificité d'organe de cette protéine, en raison de la médiocre qualité des anticorps dirigés spécifiquement contre P13. Cependant, ses deux principaux homologues, FS2 et CBP86, sont spécifiques du testicule. Il s'agit d'un critère important pour le choix d'un antigène pour un vaccin contraceptif, même si cette propriété reste à confirmer pour P13.

Dans l'état actuel des travaux, il n'est pas possible de déterminer à quel point la protéine P13 est spécifique de l'espèce renard. Il faut souligner que les divergences entre P13 et son homologue humain, FS2, permettent de choisir différents épitopes spécifiques.

Enfin, il reste à déterminer l'accessibilité de cette protéine par les anticorps. Nous avons vu qu'en raison de la méthode de fixation, le FITC ne permet pas de déterminer la localisation en surface des antigènes, et l'observation en microscopie électronique n'a pas été possible avec l'anticorps anti-P13. Cependant, l'inhibition significative obtenue lors des tests de liaison à la zone pellucide suggère que cet antigène peut être accessible aux anticorps, et que ces anticorps sont efficaces pour inhiber la fécondation *in vitro*. Cette donnée, liée à l'antigénicité de P13, rendent cette glycoprotéine particulièrement intéressante comme antigène pour un vaccin contraceptif.

---

## **6. Conclusion et perspectives**

Dans le cadre de la prophylaxie de la rage, l'immunocontraception est envisagée afin de contrôler les populations de renards. Aucun antigène n'étant actuellement disponible pour permettre une vaccination dirigée contre les spermatozoïdes, en raison notamment d'un manque d'antigénicité, nous avons mené ce travail dont le but est d'identifier de nouveaux antigènes.

Par des expériences d'immunisation et de vasectomie, nous avons produit des sérums reconnaissant des protéines spermatiques auto-antigéniques chez le renard. Ces protéines peuvent être antigéniques en raison de leurs caractéristiques biochimiques (structure, abondance), mais aussi parce qu'elles sont synthétisées après la mise en place par le système immunitaire de la reconnaissance du *Soi* et du *Non-Soi*, puis qu'elles en sont isolées par la barrière hémato-testiculaire puis hémato-épididymaire. Ces antigènes constituent donc *a priori* des candidats attractifs pour un vaccin contraceptif.

Par la technique de Western blot, nous avons localisé sur des gels d'électrophorèse en 2D plusieurs antigènes fréquemment reconnus. Il est intéressant de noter que les anticorps produits contre les protéines sous leur forme mature (vasectomie, immunisation) reconnaissent les antigènes préparés par électrophorèse SDS-PAGE, qui est une méthode qui dénature les protéines et qui peut donc modifier la présentation des épitopes (Auer *et al.*, 1995). La technique de Western blot est donc adaptée pour la sélection puis la caractérisation de ces antigènes, même si elle ne permet pas une analyse précise de la réponse immunitaire (épitopes reconnus, isotype d'anticorps produit) qui n'est pas le but de ce travail.

Nous avons sélectionné et séquencé six de ces antigènes. L'analyse des séquences montre que trois des six protéines possèdent des régions transmembranaires, alors que la proportion des protéines localisées sur la membrane des spermatozoïdes varie entre 15% et 7%, suivant les estimations (Meinertz, 1992 ; Diekman et Herr, 1995). Notre démarche expérimentale nous a donc permis d'enrichir efficacement la proportion des protéines de surface parmi les antigènes étudiés.

Ce travail a permis d'identifier six nouvelles protéines du spermatozoïde de renard (*Vulpes vulpes*), et leur intérêt pour un vaccin contraceptif a été étudié. Les antigènes P3 et P7 sont des glycoprotéines dont la séquence déterminée par RACE PCR ne présente pas d'homologie importante avec des protéines connues, mais qui suggère qu'elles pourraient avoir une localisation membranaire. Elles sont donc particulièrement attractives. De même, le sérum dirigé contre la glycoprotéine P5 a permis d'établir que cette nouvelle protéine ne semble pas spécifique d'espèce ou d'organe, mais que les anticorps dirigés contre elle réduisent la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide.

Les trois autres protéines séquencées ne peuvent actuellement pas être utilisées comme antigène pour un vaccin contraceptif, puisqu'elles manquent de spécificité et que leurs homologues ne sont pas accessibles pour les anticorps. Les protéines P4 et P8 présentent de

fortes homologues des protéines mitochondriales, respectivement la NADH deshydrogénase et la cytochrome-C oxydase, tandis que l'antigène P13 présente une homologie avec la protéine spermatique humaine fibrousheatin 2.

Différentes études sont encore nécessaires pour évaluer plus précisément les antigènes sélectionnés en vue de leur utilisation dans un vaccin contraceptif. Le choix des épitopes permettra, lorsque nous aurons déterminé l'intégralité de la séquence de ces protéines, la détermination des vaccins les plus adaptés pour l'immunocontraception. D'autres antigènes spermatiques localisés sur les gels d'électrophorèse en 2D, et non étudiés pour le moment, pourront également être séquencés et caractérisés. Plusieurs méthodes de vaccination devront être envisagées, en fonction de la nature des antigènes (peptide, protéine recombinante, vaccin ADN, ...). Il sera alors possible de passer à l'étude *in vivo* des antigènes purifiés, d'abord sur un modèle souris, afin d'étudier la réaction immunitaire des animaux notamment au niveau des muqueuses, puis sur un modèle renard.

Ce travail présente une stratégie ayant permis la sélection, l'identification et la caractérisation partielle d'antigènes spermatiques. Notre démarche peut également être envisagée dans diverses applications de vaccins contraceptifs dirigés contre des espèces dont les surpopulations posent problème, comme les rats, les souris ou les ragondins. Un autre exemple est celui des chiens errants, dont les sur-effectifs posent de réels problèmes sanitaires et économiques dans certaines régions (DOM-TOM, Inde, ...). L'immunocontraception peut être appliquée à cette espèce. Même s'il est indispensable de ré-évaluer les critères avant de commencer un tel projet, par exemple l'existence de zones d'appâtage pour les chiens rendant moins indispensable la spécificité d'espèce de l'antigène, la démarche suivie pour le renard pourrait être adaptée.

---

# **Bibliographie**

- Adiga P.R., Subramanian S., Rao J., Kumar M. (1997) Prospects of riboflavin carrier protein (RCP) as an antifertility vaccine in male and female mammals. *Hum. Reprod. Update* 3 : 325-334.
- Adoyo P.A, Moore A., Moore H.D. (1995) A strategy for identifying candidate sperm antigens for immunocontraception : isolation of human testis cDNA clones using polyclonal antisera directed against hamster acrosomal membrane preparation. *Int. J. Androl.* 18 : 32-38.
- Afzalpurkar A., Shibahara H., Hasegawa A., Koyama K., Gupka S.K. (1997) Immunoreactivity and in vitro effect on human sperm-egg binding of antibodies against peptides corresponding to bonnet monkey zona pellucida-3 glycoprotein. *Hum. Reprod.* 12 : 2664-2670.
- Aitken R.J., Parslow J.M., Hargreave T.B., Hendry W.F. (1988) Influence of antisperm antibodies on human sperm function. *Br. J. Urol.* 62 : 367-373.
- Allegrucci C., Ronquist G., Nilson B.O., Carlsson L., Lundqvist M., Minelli A., Larson A. (2001) Circulating human antisperm antibodies recognize prostasomes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 46 : 211-219.
- Altschul, S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of proteins database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 : 3389-3402.
- Andersen K. (1978) Fine structure of developing spermatids used as a basis for staging spermatoleosis in the blue fox (*Alopex Lagopus*). *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.* 7: 164-181.
- Andersen Berg K., Paulenz H., Ropstad E. (1998) The spermatogenic cycle in the silver fox (*Vulpes vulpes*) : frequency of the different stages prior and during the breeding season. *Int. J. Androl.* 21 : 377-382.
- Andersen Berg K., Wiger R., Dahl E., Torp T., Farstad W., Krogenaes A., McNeilly A.S., Paulenz H., Ropstad E. (2001) Seasonal changes in spermatogenic activity and in plasma levels of FSH, LH and testosterone, and the effect of immunization against inhibin in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Androl.* 24: 284-294.

- Auer J., Senechal H., De Almeida M. (1997) Sperm-associated and circulating IgA and IgG classes of antibodies recognise different antigens on the human sperm plasma membrane. *J. Reprod. Immunol.* 34 : 121-136.
- Anderson D.J., Alexander N.J. (1983) A new look at antifertility vaccines. *Fertil. Steril.* 40 : 557-571.
- Baba T., Kashiwabara S.I., Watanabe K., Itoh H., Michikawa Y., Kimura K., Takada M., Fukamizu A., Arai Y. (1989). Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J. Biol. Chem.* 264 : 11920-11927.
- Baltz J.M., Williams P.O., Cone R.A. (1990) Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol. Reprod.* 43 : 485-491.
- Bandivdekar AH., Vernekar V.J., Moodbidri S.B., Koide S.S. (2001) Characterization of 80 kDa human sperm antigen responsible for immunoinfertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45 : 28-34.
- Barber M.R., Fayrer-Hosken R.A. (2000-a) Evaluation of somatic and reproductive immunotoxic effects of the porcine zona pellucida vaccination. *J. Exp. Zool.* 286 : 641-646.
- Barber M.R., Fayrer-Hosken R.A. (2000-b) Possible mechanisms of mammalian immunocontraception. *J. Reprod. Immunol.* 46 : 103-124.
- Batova I.N., Richardson R.T., Widgren E.E., O'Rand M.G. (2000) Analysis of the autoimmune epitope of human testicular NASP using recombinant and synthetic peptides. *Clin. Exp. Immunol.* 121 : 201-209.
- Beaton S., Cleary A., ten Have J, Bradley M.P. (1994) Cloning and characterization of a fox sperm protein FSA-1. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 : 761-770.
- Beaton S., ten Have J., Cleary A., Bradley M.P. (1995) Cloning and partial characterization of the cDNA encoding the fox sperm protein FSA-Acr.1 with similarities to the SP-10 antigen. *Mol. Reprod. Dev.* 40 : 242-252.
- Bedford J.M. (1983) Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28 : 109-120.

- Bérudé B., Sullivan R. (1994) Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kd sperm glycoprotein. *Biol. Reprod.* 51 : 1255-1263.
- Blancou J., Baltazar R.S., Molli I., Stoltz J.F. (1991) Effective postexposure treatment of rabies-infected sheep with rabies immune globuline and vaccine. *Vaccine* 9 : 432-437.
- Bleil J.D., Wasserman P.M. (1990) Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 5563-5567.
- Bleil J.D. Greve J.M., Wasserman P.M. (1988) Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida : role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.* 128 : 376-385.
- Bohring C., Krause W. (2001) Differences in the antigen pattern recognized by antisperm antibodies in patient with infertility and vasectomy. *J. Urol.* 166 : 1178-1180.
- Bohring C., Skrzypek J., Krause W. (2001-a) Influence of antisperm antibodies on the acrosome reaction as determined by flow cytometry. *Fertil. Steril.* 76: 275-280.
- Bohring C., Krause E., Habermann B., Krause W. (2001-b) Isolation and identification of sperm membranes antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol. Hum. Reprod.* 7 : 113-118.
- Boué F., Sullivan R. (1996) Cases of human infertility are associated with the absence of P34H, an epididymal sperm antigen. *Biol. Reprod.* 54 : 1018-1024.
- Boué F., Chaffaux S. (1998) La Fonction testiculaire : application à l'espèce canine. *Rec. Med. Vét.* 174 : 33-37.
- Boué F., Delhomme A., Chaffaux S. (2000) Reproductive management of silver foxes (*Vulpes vulpes*) in captivity. *Theriogenology* 53 : 1717-1728.
- Boué F., Genin B., Verdier Y. (2001) Identification of antibodies against spermatozoa in serum of male wild foxes. *Proc. VIIth International Congress of Andrology, Montréal, June 15-19* : 65-70

- Boué F., Bérudé B., De Lamirande E., Gagnon C., Sullivan R. (1994) Human sperm zona pellucida interaction is inhibited by a antiserum against a hamster sperm protein. *Biol. Reprod.* 51 : 577-587.
- Boué F., Duquesne C., Lassale B., Levèvre A., Finaz C. (1995) FLB1, a human protein of epididymal origin that is involved in sperm-oocyte recognition process. *Biol. Reprod.* 52 : 267-278.
- Bradley M.P. (1994) Experimental strategies for the development of an immunocontraceptive vaccine for the european red fox, *Vulpes vulpes*. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 : 307-317.
- Bradley M.P., Hinds L., Bird P.H. (1997) A bait-delivered immunocontraceptive for the european red fox (*Vulpes vulpes*) by the year 2002 ? *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 111-116.
- Bradley M.P., Eade J., Penhale J., Bird P. (1999) Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *J. Biotechnol.* 73 : 91-101.
- Brenner S. (1998) Praticals database searching. *Trends Supplement* : 9-12.
- Brewis I.A., Wong C.H. (1999) Gamete recognition : sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev. Reprod.* 4 : 135-142.
- Brown R.G., Bowen W.D., Eddington J.D., Kimmins W.C., Mezei M., Parsons J.L., Pohajdak B. (1997) Evidence for a long-lasting single administration contraceptive vaccine in wild grey seals. *J. Reprod. Immunol.* 35 : 43-51.
- Castle P.E., Whaley K.J., Hoen T.E., Moench T.R., Cone R.A. Thomas C., Jenkins (1997) Contraceptive effect of sperm agglutinating monoclonal antibodies in rabbits. *Biol. Reprod.* 56 : 153-159.
- Chan C., Gupta S., Mark G. (1999) Identification of surface linear surface epitopes on the guinea pig sperm membrane protein PH-20. *Life Sci.* 64: 1989-2000.
- Chautan M., Pontier D., Artois M. (2000) Roles of rabies in recent demographic changes in red fox (*Vulpes vulpes*) populations in Europe. *Mammalia* 64 : 391-410.
- Chou P.Y., Fasman G.D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 45 : 145-148.

- Collins S., Menge A.C., Archie J.T., Behrman S.J. (1979) Immunologic response of the rabbit oviduct. *Int. J. Fertil.* 24 : 149-156.
- Coonrod S.A., Herr J.C., Westhusin M.E. (1996) Inhibition of bovine fertilization in vitro by antibodies to SP-10. *J. Reprod. Fertil.* 107 : 287-297.
- Dadoune J.P., Demoulin A. (1991) Structure et fonction du testicule. In : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Eds. Thibault C et Levasseur M.C. Ellipse, Paris, pp 221-250.
- De Almeida M., Zouari R., Jouannet P., Feneux D. (1991) In-vitro effects of anti-sperm antibodies on human sperm movement. *Hum. Reprod.* 6 : 405-410.
- De Jersey J., Bird P.H., Verma N.K., Bradley M.P. (1999) Antigen-specific systemic and reproductive tract antibodies in foxes immunized with *Salmonella typhimurium* expressing bacterial sperm proteins. *Reprod. Fertil. Dev.* 11 : 219-228.
- De Maistre E., Bene M.C., Foliguet B., Touati F., Faure G.C. (1996) Centrifugation on Percoll gradient enhances fluorescent lectin binding on human sperm : a flow cytometric analysis. *Arch. Androl.* 37 : 179-187.
- Diekman A.B., Herr J.C. (1997) Sperm antigens and their use in the development of an immunocontraceptive. *Am.J.Reprod. Immunol.* 37 : 111-117.
- Diekman A.B., Norton E., Klotz K.L., Westbrook V.A., Herr J.C. (1999) Evidence of a unique N-linked glycan associated with human infertility on sperm CD52 : a candidate contraceptive vaccinogen. *Immunol. Rev.* 171 : 203-212.
- Duckworth J.A., Buddle B.M., Scobie S. (1998) Fertility of brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) immunised against sperm. *J. Reprod. Immunol.* 37 : 125-138.
- Edman P. (1956) On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. *Acta Chem. Scand.* 10 : 761.
- Edman P., Begg G. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1 : 80-81.
- Ellerman D.A., Brantua V.S., Martinez S.P., Cohen D.J., Conesa D., 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.

- England G.C.W., Allen W.E. (1989) Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet. Rec.* 15 : 399.
- Esbenhade K., Clegg E.D. (1980) Surface proteins of ejaculated porcine sperm incubated in uterus. *Biol. Reprod.* 23 : 530-537.
- Farstad W. (1998) Reproduction in foxes: current research and future challenges. *Anim. Reprod. Sci.* 53: 35-42.
- Fayrer-Hosken R.A., Dookwath H.D., Brandon C.I. (2000-a) Immunocontrol in dogs. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61 : 365-373.
- Fayrer-Hosken R.A., Grobler D., van Altena J.J., Bertshinger H.J., Kirkpatrick J.F. (2000-b) Immunocontraception of African elephants. *Nature* 407 : 149.
- Fayrer-Hosken R.A., Bertshinger H.J., Kirkpatrick J.F., Grobler D., Lamberski N., Honneyman G., Ulrich T. (1999) Contraceptive potential of the porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Theriogenology* 52 : 835-846.
- Fierro R., Bene M.C., Foliguet B., Faure G.C., Grignon G. (1998) Evaluation of human sperm acrosome reaction and viability by flow cytometry. *Ital. J. Anat. Embryol.* 103 : 75-84.
- Fierro R., Foliguet B., Grignon G., Daniel M., Bene M.C., Faure G.C., Barbarino-Monnier P. (1996) Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction : modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch. Androl.* 36 : 187-196.
- Flickinger C.J., Howards S.S., Bush L.A., Baker L.A., Herr J.C. (1994) Temporal recognition of sperm auto-antigens by IgM and IgG autoantibodies after vasectomy and vasovasotomy. *J. Reprod. Immunol.* 27, 135-150.
- Flickinger C.J., Howards S.S., Bush L.A., Baker L.A., Herr J.C. (1995) Antisperm autoantibody responses to vasectomy and vasovasostomy in Fischer and Lewis rats. *J. Reprod. Immunol.* 28, 137-157.
- Flickinger C.J., Howards S.S., Baran M.L, Pessoa N., Herr J.C. (1997) Appearance of natural antisperm autoantibodies after sexual maturation of normal Lewis rats. *J. Fertil. Immunol.* 33 : 127-145.

- Flickinger C.J., Bush L.A., Williams M.V., Naaby-Hansen S., Howards S.S., Herr J.C. (1999) Post-obstruction rat sperm auto-antigens identified by two-dimensional gel electrophoresis and western blotting. *J. Reprod. Immunol.* 43 : 35-53.
- Flickinger C.J., Rao J., Bush L.A., Sherman N.E., Oko R.J., Jayes F.C.L., Herr J.C. (2001) Outer dense fiber proteins are dominant postobstruction autoantigens in adult Lewis rats. *Biol. Reprod.* 64 : 1451-1459.
- Florman H.M. (1994) Sequential focal and global elevations of sperm intracellular  $Ca^{2+}$  are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis *Dev. Biol.* 165 : 152-164.
- Focacci M., Quayle A.J., Politxh J.A., Anderson D.J. (1997) Optimized assay for antisperm cell-mediated immunity. *Hum. Reprod.* 12 : 39-44.
- Forsberg M., Fougner J.A., Hofmo P.O., Madej M., Einarsson E.J. (1989) Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *J. Reprod. Fert.* 87: 115-123.
- Fournier-Delpech S., Thibault C. (1991). Acquisition de la fécondance du spermatozoïde. In : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Eds. Thibault C et Levasseur M.C. Ellipse, Paris, pp 251-272.
- Frayne J., Hall L. (1999) The potential use of sperm antigens as target for immunocontraception : past, present and future. *J. Reprod. Immunol.* 43 : 1-33.
- Friberg J. (1974) Immunological studies on sperm-agglutinating sera from men. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 36 (suppl.) : 43-50.
- Friend D.S., Orci L., Perrelet A., Yanagimachi R. (1977) Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J. Cell Biol.* 74 : 561-577.
- Garnier J. (1990) Protein structure prediction. *Biochimie* 72 : 513-524.
- Garrott R.A., Cook J.G., Bernoco M.M., Kirkpatrick J.F., Cadwell L.L., Cherry S., Tiller B. (1998) Antibody response of elk immunized with porcine zona pellucida. *J. Wildl. Dis.* 34 : 539-546.

- George L., Carmichael L. (1984) Antisperm response in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. Am. J. Vet. Res. 45 : 274-281.
- Giegerich R., Meyer F., Schleiermacher C (1996) Genefisher – Software support for the detection of postulated genes. Proceedings of the fourth international conference on intelligent systems for molecular biology, AAAI Press.
- Giroux Wideman V., Jouannet P., Pignot Paintrand I., Feneux D. (1991) Effects of pH on the reactivation of human spermatozoa demembrated with Triton X-100. Mol. Reprod. Dev. 29 : 157-162.
- Gloor S., Bontadina F., Hegglin D., Deplazes P., Breitenmoser U. (2001) The rise of urban fox populations in Switzerland. Mamm. Biol. 66: 155-164.
- Gobert B., Jolivet-Reynaud C., Dalbon P., Barbarino-Monnier P., Faure G.C., Jolivet M., Beneacute M.C. (2001) An immunoreactive peptide of the FSH involved in autoimmune infertility. Biochem. Biophys. Res. Commun. 289 : 819-824.
- Gong X.H., Dubois D.H., Miller D.J. Shur B.D. (1995) Activation of a G protein complex by aggregation of  $\beta$ 1-4 galactosyltransferase on the surface of sperm. Science 269 : 1718-1721.
- Gougoulidis T., Trouson A., Dowsing A. (1999) Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by a monoclonal antibody recognising the TEC-2 epitope on bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 54: 173-178.
- Greenhouse S., Castle P.E., Dean J. (1999) Antibodies to human ZP3 induce reversible contraception in transgenic mice with 'humanized' zonae pellucidae. Hum. Reprod. 14 : 593-600.
- Gye M.C., Park S., Kim Y.S., Ahn H.S. (2001) Mobility shift assay of calcium-binding proteins of mouse epididymal spermatozoa. Andrologia 33 : 193-198.
- Habenicht U.F., Stock G. (1996) Development of new immunocontraceptives - Industrial perspective. Am. J. Reprod. Immunol. 35 : 517-522.
- Haden N.P., Hickox J.R., Whismant S., Hardy D.M. (2000) Systematic characterization of sperm-specific membrane proteins in swine. Biol. Reprod. 63 : 1839-1847.

- Hale G., Rye P.D., Warford A, Lauder I., Brito-Babapulle A. (1993) The glycosylphosphatidylinositol-anchored lymphocyte antigen CDw52 is associated with the epididymal maturation of human spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* 23 : 189-205.
- Hardy C.M., Mobbs K.J. (1999) Expression of recombinant mouse sperm protein sp56 and assessment of its potential for use in as an antigen in an immunocontraceptive vaccine. *Mol. Reprod. Dev.* 52 : 216-224.
- Head J.R., Billingham R.E. (1986) Concerning the immunology of the uterus. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 10 : 76-81.
- Herr J.C. (1996) Update of the center for recombinant gamete contraceptive vaccinogens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35 : 184-189.
- Herr J.C., Thomas D., Bush L.A., Coonrod S., Khole V., Howards S.S., Flinckinger C.J. (1999) Sperm Mitochondria-Associated Cysteine-Rich Protein (SMCP) is an autoantigen in Lewis Rats. *Biol. Reprod.* 61 : 428-435.
- Hjort T. (1999) Antisperm antibodies and infertility: an unsolvable question? *Hum. Reprod.* 14: 2423-2429.
- Holland M.K., Andrews J., Clarke H., Walton C., Hinds L.A. (1997) Selection of antigens for use in a virus-vectored immunocontraceptive vaccine: PH-20 as a case study. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 117-124.
- Hoshi K., Sasaki H., Yanagida K., Sato A., Tsuiki A. (1994) Localization of fibronectin on the surface of human spermatozoa and relation to the sperm-egg interaction. *Fertil. Steril.* 61 : 542-547.
- Hunnicut G.R., Primakoff P., Myles D.S. (1996) Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zone binding. *Biol. Reprod.* 55 : 80-86.
- Hutter H., Hammer A., Blaschitz A., Hartmann M, Mahnert W, Sedlmayr P, Primus G, Rosenkranz C, Gebru G, Henkel R, Dohr G.(1996) The monoclonal antibody GSZ-1 detects a maturation-associated antigen of human spermatozoa that is also present on the surface of human mononuclear blood cells. *J. Reprod. Immunol.* 30 : 115-132.

- Itoh M., Moriyama H., Yano A., Li X., Takeuchi Y. (1998) Mode of migration of normal lymphocytes inside murine testis. *Anat. Rec.* 251 : 152-160.
- Jalkanen L. (1993) Sperm abnormalities in silver fox (*Vulpes vulpes*) semen selected for artificial insemination. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47 : 287-290.
- Jewgenow K., Rohleder M., Wegner I. (2000) Differences between antigenic determinants of pig and cat zona pellucida proteins. *J. Reprod. Fertil.* 119 : 15-23.
- Kalaydjiev S., Vasilevska M., Nakov L. (2000) Common egg envelope antigens are limited to the animal class. *Theriogenology* 53 : 1467-1475.
- Kamada M., Yamamoto S., Takikawa M., Kunimi K., Maegawa M., Futaki S., Ohmoto Y., Aono T., Koide S. (1999) Identification of human sperm protein that interacts with sperm-immobilizing antibodies in the sera of infertile women. *Fertil. Steril.* 72: 691-695.
- Kerr L.E. (1995) Sperm antigens and immunocontraception. *Reprod. Fertil. Dev.* 7 : 825-830.
- Kim Y.H., de Kretser D.M., Temple-Smith P.D., Hearn M.T.W., McFarlane J.R. (1997) Isolation and characterization of human and rabbit sperm tail fibrous sheath. *Mol. Hum. Reprod.* 3 : 307-313.
- Kim Y.H., McFarlane J.R., O'Bryan M.K., Almahbobi G., Temple-Smith P.D., de Kretser D.M. (1999) Isolation and comparison of rat sperm tail outer dense fibres and comparison with rabbit and human spermatozoa using a polyclonal antiserum. *J. Reprod. Fertil.* 116 : 345-353.
- Kirkpatrick J.F., Turner J.W., Liu I.K.M., Fayer-Hosken R., Rurberg A.T. (1997) Case studies in wildlife immunocontraception: wild and feral equids and white-tailed deer. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 105-110.
- Koehler L.K., Platz C.C., Waddell W., Jones M.H., Behrns S. (1998). Semen parameters and electron microscope observations of spermatozoa of the red wolf, *Canis rufus*. *J. Reprod. Fertil.* 114 : 95-101.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.

- Lea I.A., van Lierop M.J., Widgren E.E., Grootenhuis A., Wen Y., Duin M., O'Rand M.G. (1998-a) A chimeric sperm peptide induces antibodies and strain-specific reversible infertility in mice. *Biol. Reprod.* 59 : 527-536.
- Lea I.A., Kurth B., O'Rand M.G. (1998-b) Immune response to immunization with sperm antigens in the macaque oviduct. *Biol. Reprod.* 58 : 794-800.
- Lefèvre A., Martin-Ruiz C, Chokomian S., Duquenne C., Finaz C. (1997) Characterization and isolation of SOB2, a human sperm protein with a potential role in oocyte membrane binding. *Mol. Hum. Reprod.* 3 : 507-516.
- Lefèvre A., Duquenne C., Rousseau-Merck M.F., Rogier E., Finaz C. (1999) Cloning and characterization of SOB1, a new testis-specific cDNA encoding a human sperm protein probably involved in oocyte recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259 : 60-66.
- Légaré C., Thabet M., Picard S., Sullivan R. (2001) Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis. *Biol. Reprod.* 64 : 720-727.
- Lefebvre C., Crête M., Huot J., Patenaude R., Price C. (1999) Annual variation of body composition, reproductive hormones and blood constituents of red foxes. *J. Mammal.* 80: 1163-1172.
- Levy S., Robaire B. (1999) Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biol. Reprod.* 60 : 1392-1401.
- Leyton L., Saling P.M. (1989) 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrate in response to zona binding. *Cell* 57 : 1123-1130.
- Lin Y., Mahan K., Lanthrop W.F. Myles D.G. Primakoff P. (1994) A hyaluronidase activity on the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.* 125 : 1157-1163.
- Lippes J., Ogra S., Tomasi T.B., Torville D.R. (1970) Immunohistochemical localization of IgG, IgA, IgM secretory piece and lactoferrin in the human female genital tract. *Contraception* 1 : 163-183.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Lucas H., Boué F., Jouannet P., Barrière P. (1996) Sperm-zona pellucida interactions : molecular basis. In : Male gametes : production and quality. S. Hamamah et R. Miesusset (Eds) pp 213-236.
- Luckas M.J.M., Buckett W.M., Aird I.A., Johnson P.M., Lewis-Jones D.I. (1998) Seminal plasma immunoglobulin concentrations in autoimmune male subfertility. *J. Reprod. Immunol.* 37 : 171-180.
- Mandal A., Naaby-Hansen S., Wolkowiz M.J., Klotz K., Shetty J., Retief J.D., Coonrod S.A., Kinter M., Sherman N., Cesar F., Flickinger J., Herr J.C. (1999) FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 61 : 1184-1197.
- Martinez M.L., Harris J.D. (2000) Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen. *J. Reprod. Fertil.* 120 : 19-32.
- Massey, F.J., Bernstein, G.S., O'Fallon, W.M., Schuman, L.M., Coulson, A.M., Crozier, R., Mandel, J.S., Benjamin, R.B., Berendes, H.S., Chang, P.C., Detels, R., Emslander, R.F., Korelitz, J., Kurland, L.T., Letow, I.H., McGregor, D.D., Nakamura, R.N., Quiroga, J., Schmidt, S., Spivey, G.H., Sullivan, T., 1984. Vasectomy and health: Results from a large cohort study. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 252 : 1023-1029.
- Masson E., Bruyère-Masson V., Vuillaume P., Lemoyne S., Aubert M. (1999) Rabies oral vaccination of foxes during the summer with the VRG vaccine bait. *Vet. Res.* 30 : 595-605.
- Maurel D., Lacroix A., Boissin J. (1984) Seasonal reproductive endocrine profiles in two wild mammals : the red fox (*Vulpes vulpes L.*) and the European badger (*Meles meles L.*) considered as short-day mammals. *Acta Endocrinol.* 105 : 130-138.
- McDonald, S.W., 2000. Cellular responses to vasectomy. *Int. Rev. Cytol.* 199 : 295-339.
- McLeskey S.B., Dowds C., Carballada R., White R.R., Saling P.M. (1998) Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int. Rev. Cytol.* 177 : 53-113.
- Menge A.C., Naz R.K. (1988) Immunologic reactions involving sperm cells and preimplantation embryos. *Am. J. Reprod. Immunol.* 18: 17-20.

- Meinertz H. (1992) Anti-sperm antibodies in the male: detection and clinical impact Am. J. Reprod. Immunol. 28: 110-116.
- Miller D.J., Macek M.B., Shur B.D. (1992) Complementary between sperm-surface  $\beta$ 1-4 galactosyl-transférase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. Nature 357 : 589-593.
- Miller L.A., Johns B.E., Elias D.J. (1998) Immunocontraception as a wildlife management tool : some perspectives. Wildl. Soc. Bull. 26 : 237-243.
- Miller L.A., Johns B.E., Killian D.J. (2000) Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. Am. J. Reprod. Immunol. 44 : 266-274.
- Miller L.A., Johns B.E., Elias D.J., Crane K.A. (1997) Comparative efficacy of two immunocontraceptive vaccines. Vaccine 15 : 1858-1862.
- Mollova M., Djakova T., Ivanova M., Stamenova M., Kyurchiev S. (1999) Isolation and biological characterization of boar sperm capacitation-related antigen. Am. J. Reprod. Immunol. 42 : 254-262.
- Moore H.D., Jenkins N.M., Wong C. (1997) Immunocontraception in rodents: a review of the development of a sperm-based immunocontraceptive vaccine for the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). Reprod. Fertil. Dev. 9 : 125-129.
- Mori K., Daitoh T., Kamada M., Maeda N., Maegawa M., Hirano K., Irahara M., Aono T. (1993) Blocking of human fertilization by carbohydrates. Hum. Reprod. 8 : 1729-1732.
- Morrissey J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analyt. Biochem. 117 : 307-310.
- Mortarino M., Tedeschi G., Negri A., Ceciliani F., Gottardi L. Maffeo G., Ronchi S. (1998) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. Electrophoresis 19 : 797-801.
- Moudgal N.R., Jeyakumar M., Krishnamurthy H.N., Sridhar S., Krishnamurthy H., Martin F. (1997-a) Development of male contraceptive vaccine - a perspective. Hum. Reprod. Update 3 : 335-346.

- Moudgal N.R., Murthy G.S., Prasanna Kumar K.M., Martin F., Suresh R., Medhamurthy R., Patil S., Sehgal S., Saxena B.N. (1997-b) Responsiveness of human male volunteers to immunization with ovine follicle stimulating hormone vaccine : results of a pilot study. *Hum. Reprod.* 12 : 457-463.
- Muller L.I., Warren R.J., Evans D.L. (1997) Theory and practice of immunocontraception in wild mammals. *Wildlife Soc. B.* 25 : 504-514.
- Myogo K., Yamano S., Nakawa K., Kamada M., Maegawa M., Irahara M., Aono T. (2001) Sperm-immobilizing antibodies block capacitation in human spermatozoa *Arch. Androl.* 47: 135-142.
- Naaby-Hansen S., Herr J.C. (1995) A 2-D protein database for the human spermatozoa. *J. Androl.* 16 : 27a.
- Naaby-Hansen S., Flickinger C.J., Herr J.C. (1997) Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56 : 771-787.
- Nakamura S., Tsuji Y., Komori S., Koyama K. (1984) Identification and characterization of a sperm peptide antigen recognized by a monoclonal antibody derived from a vasectomised mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 : 1503-1509.
- Naz R.K. (1999) Vaccine for contraception targeting sperm. *Immunol. Rev.* 171 : 193-202.
- Naz R.K. (2000) Fertilization-related sperm antigens and their immunocontraceptive potentials. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44 : 41-46.
- Naz R.K., Zhu X. (1998) Recombinant Fertilization Antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol. Reprod.* 59 : 1095-1100.
- Naz R.K., Zhu X. (2001) Molecular cloning and sequencing of a novel cDNA encoding for a protein involved in human sperm function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 : 911-917.
- Naz R.K., Bradford C.R., Menge A.C. (1984) Isoantigenicity of rabbit sperm, testis, and their extracts as demonstrated by Western blot enzyme immunobinding procedure. *Arch. Androl.* 13 : 279-287.

- Naz R.K., Zhu X., Kadam A.L. (2000) Identification of human sperm peptide sequence involved in egg binding for immunocontraception. *Biol. Reprod.* 62 : 318-324.
- Naz R.K., Leslie M.H., Zhu X (2001) Inhibition of murine sperm-oolemma binding by antibodies to an oocyte membrane (OM) antigens : implication in contraceptive vaccine development. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45 : 52-61.
- Naz R.K., Deutsch J., Phillips T.M., Menge A.C., Fish H. (1989) Sperm antibodies in vasectomized men and their effects on fertilization. *Biol. Reprod.* 41 : 163-173.
- Nettles V. F. (1997) Potential consequences and problems with wildlife contraceptives. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 137-143.
- Norton E.J., Diekman A.B., Westbrook V.A., Flickinger C.J., Herr J.C. (2001) RASA, a recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibody directed against the human sperm surface: implications for novel contraceptives. *Hum. Reprod.* 16: 1854-1860.
- Oehninger S. (2001) Molecular basis of human sperm-zona pellucida interaction. *Cells Tissues Organs* 168 : 58-64.
- O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007-4021.
- O'Hern P.A., Bambra C.S., Isahakia M., Goldberg E. (1995) Reversible contraception in female baboons immunised with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase. *Biol. Reprod.* 25 : 621-628.
- Oliphant G. (1976) Removal of sperm bound seminal plasma component as a prerequisite to induction of rabbit acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 27 : 28-38.
- O'Rand M.G., Lea I.A. (1997) Designing an effective immunocontraceptive. *J. Reprod. Immunol.* 36 : 51-59.
- O'Rand M.G., Widgren E.E., Fischer S. (1988) Characterization of rabbit sperm membrane autoantigen, RSA, as a lectin-like zona binding protein. *Dev. Biol.* 129 : 231-240.
- Osadchuk L. (1996) Steroid hormones and reproductive behaviour in silver fox males. *Procc; 1<sup>st</sup> international symposium on physiology and ethology of wild and zoo animals.* September 18-21, Berlin, Allemagne, pp 164-169.

- Osadchuck L. (1999) A comparative study of sperm, sexual hormone concentrations and sexual activity in yearling and adult males of the silver fox (*Vulpes vulpes*). Anim. Sci. 68 : 723-729.
- Paolicchi F.A., Casaro P.A., Gimeno E.J., Kortebani L.G., Mazzoli A.B. (2000) Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Ruminant Res. 36: 7-15.
- Parker J.M.R., Guo D., Hodges R.S. (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. Biochemistry 25 : 5425-5432 .
- Parry R.V., Barker P.J. Jones R. (1992) Characterization of Low Mr Zona Pellucida Binding Proteins from boar spermatozoa and seminal plasma. Mol. Reprod. Dev. 33 : 108-115.
- Paterson M., Jennings Z.A., van Duin M., Aitken R.J. (2000) Immunocontraception with zona pellucida proteins. Cells Tissues Organs 166 : 228-232.
- Paterson M., Wilson M.R., Jennings Z.A., van Duin M., Aitken R.J. (1999) Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in homologous primate model. Mol. Hum. Reprod. 5 : 342-352.
- Pelletier M. (1998) Blood-testis barriers in male reproductive system. In : Martinez-Garcia F., Regadera J (eds) Male Reproduction. Churchill Communication Europe Espana, Madrid, Spain, pp. 183-195.
- Pennisi E. (1996) Teetering on the brink of danger. Sciences 271 : 1665-1667.
- Perez Martinez S., Conesa D., Cuasnicu P.S. (1995) Potential 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.
- Petersen C., Füzesi L., Hoyer-Fender S. (1999) Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of 70 kDa. Mol. Hum. Reprod. 5: 627-635.

- Primakoff P. (1994) Sperm proteins being studied for use in a contraceptive vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* 31 : 208-210.
- Primakoff P., Hyatt H., Myles D.G. (1985) A role for migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the zona pellucida. *J. Cell Biol.* 101 : 2239-2244.
- Primakoff P., Hyatt H., Tredick-Kline J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.* 104 : 141-149
- Primakoff P, Lathrop W, Bronson R, (1990) Identification of human surface glycoproteins recognized by autoantiseria from immune infertile men, women, and vasectomized men. *Biol. Reprod.* 42 : 929-942.
- Primakoff P., Woolman-Gamer L., Tung K.S., Myles D.G. (1997) Reversible contraceptive effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. *Biol. Reprod.* 56 : 1142-1146.
- Primakoff P., Lathrop W., Woolman L., Cowan A., Myles D. (1988) Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature* 335 : 543-546.
- Rabilloud T. (2001) Protéomes et analyse protéomique : réalité et perspectives. *Spectra Analyse* 219 : 9-15.
- Ruette S. (1993) Attractivité des appâts-vaccins antirabiques : revue bibliographique et études expérimentales. Thèse Doct. Vét., Nantes, 218 pages.
- Saez F.J., Madrid J.F., Alonso E., Hernandez F. (2000) Lectin histochemical identification of the carbohydrate moieties on N- and O-linked oligosaccharides in the duct cells of the testis of an amphibian urodele, the Spanish newt (*Pleurodeles waltl*). *Histochem. J.* 32 : 717-724.
- Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Samuel T, Kolk A.H., Rumke P. (1978) Studies on the immunogenicity of protamines in humans and experimental animals by means of a micro-complement fixation test. *Clin. Exp. Immunol.* 33 : 252-260.

- Santhanam R., Naz R.K. (2001) Novel human testis-specific cDNA: molecular cloning, expression and immunobiological effects of the recombinant protein. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 1-12.
- Sarre S.D., Aitken N., Clout M.N., Ji W., Robins J., Lambert D.M. (2000) Molecular ecology and biological control: the mating system of a marsupial pest. *Mol. Ecol.* 9 : 723-733.
- Schwaab V., Lareyre J.J., Vernet P., Pons E., Faure J., Dufaure J.P., Drevet J.R. (1998) Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxydase proteins found in the mouse epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 53 : 157-162.
- Serres C., Kann M. (1984) Motility induction in hamster spermatozoa from caput epididymis : effect of forward motility protein (FMP) and calmodulin inhibitor. *Reprod. Nutr. Develop.* 24 : 81-94.
- Setchell B.P., Maddocks S., Brooks D.E., (1994) Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of the male reproductive tract. In : *The physiology of Reproduction* (Eds) Knobil K., Neill J.D., Greenwald G.S., Markert C.L. et Pfaff D.W. Raven Press, New-York, pp 1363-1434.
- Shetty J., Diekman A., Jayes F., Naaby-Hansen S., Flickinger C., Herr J. (2001) Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: identification of immunocontraceptive candidates. *Electrophoresis* 22 : 3053-3066.
- Shigeta M., Hasegawa A., Hamada Y., Koyama K. (2000) Analysis of B cell epitopes of a glycoprotein porcine zona pellucida (pZP1). *J. Reprod. Immunol.* 47 : 159-168.
- Singh J.P., Babcock D.F., Lardy H.A. (1978) Increased calcium-ion influx is a component of capacitation spermatozoa. *Biochemistry J.* 172 : 549-556.
- Singh M., Das S.K., Suri S., Singh O., Talwar G.P. (1998) Regain of fertility and normality of progeny born during below protective threshold antibody titers in women immunized with the HSD-hCG vaccine. *Am J. Reprod. Immunol.* 39 : 395-398.
- Sirivaidyapong S., Bevers M., Colenbrander B. (1999) Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. *J. Androl.* 20 : 537-544.

- Skutelsky E., Ranen E., Shalgi R. (1994) Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *J. Reprod. Immunol.* 100 : 35-40.
- Snell W.J., White J.M. (1996) The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 85 : 629-637.
- Soliman H.A., Olesen H. (1976) Concentration of the secretory IgA of seminal fluid in normal subjects, in decreased fertility and in azoospermia. *Clin. Chim. Acta* 69 : 543.
- Stöhr K., Meslin F.X. (1997) Zoonoses and fertility control in wildlife - requirements for vaccines. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 149-155.
- Subramania S., Karande A.A., Adiga P.R. (2000) Immunocontraceptive efficacy of synthetic peptides corresponding to major antigenic determinants of chicken riboflavin carrier protein in the female rats. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44 : 184-191.
- Suppo C., Naulin J.M., Langlais M., Artois M. (2000) A modelling approach to vaccination and contraception programmes for rabbies control in fox populations. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267 : 1575-1582.
- Takikawa M., Kamada M., Maegawa M., Yamano S., Irahara M., Aono T., Futaki S., Ohmoto Y., Koide S.S. (2001) Evaluation of two sperm antigens, rSMP and YWK-II, as targets for immunocontraception. *Zygote* 9 : 145-151.
- Talwar G.P., Singh O.M., Gupta S.K., Hasnain S.E., Pal R., Majumbar S.S., Vrati S., Mukhopadhyay A., Srinivasan J., Deshmukh U., Ganga S., Mandokhot A., Gupta A. (1997) The HSD-hCG vaccine prevents pregnancy in women: feasibility study of a reversible safe contraceptive vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37 : 153-160.
- Ten Have J, Beaton S, Bradley MP (1998) Cloning and characterization of the cDNA encoding the PH-20 protein in the European red fox *Vulpes vulpes*. *Reprod. Fertil. Develop.* 10 :165-172.
- Towbin H., Staechelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.U.S.A.* 76 : 4350-4354.
- Tung K.S. (1998) Autoimmune disease of the testis and the ovary. In *The Autoimmune disease* pp 687-704. Eds NR Rose and IR Mackay. Academic Press, New York

- Tung K.S., Ellis L.E., Childs G.V., Dufau M. (1984) The dark milk : a model of male infertility. *Endocrinology* 114 : 922-929.
- Tung K.S, Primakoff P., Woolman-Gamer L., Myles D.G. (1997) Mechanism of infertility in male guinea pigs immunized with sperm PH-20. *Biol. Reprod.* 56 : 1133-1141.
- Turner R.M.O., Eriksson R.L.M., Gerton G.L., Moss S.B. (1999) Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Mol. Hum. Reprod.* 5 : 816-824.
- Turner R.M.O., Musse M.P., Mandal A., Klotz K., Jayes F.C.L., Herr J.C., Gerton G.L., Moss S.B., Chemes H.E. (2001) Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J. Androl.* 22: 302-315.
- Tuytens F.A.M., Macdonald D.W. (1998) Fertility control: an option for non-lethal control of wild carnivores? *Anim. Welfare* 7 : 339-364.
- Vanage G.R., Garde S.V., Sheth A.R., Gopalkrishnan K. (1992) Passive immunization against prostatic inhibin peptide as a male contraceptive. *Int. J. Androl.* 15: 114-126.
- Vanage G.R., Mehta P.B., Moodbidri S.B., Iyer K.S. (2000) Effect of immunization with synthetic peptide corresponding to region 1-17 of human seminal plasma inhibin on fertility of male rats. *Arch. Androl.* 44 : 11-21.
- Veräjänkörva E., Martikainen M., Saraste A., Sundström J., Pöllänen P. (1999) Sperm antibodies in rat models of male hormonal contraception and vasectomy. *Reprod. Fertil. Dev.* 11 : 49-57.
- Vernet P., Faure J., Dufaure J.P., 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.
- Von heijne G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 8 : 249-254 .
- Vuillaume P., Aubert M., Demerson J.M., Cliquet F., Barrat J., Breitenmoser U. (1997) Vaccination des renards contre la rage par dépôt d'appâts vaccinaux à l'entrée des terriers. *Ann. Méd. Vét.* 141 : 55-62.

- Walter G.R., Feather K.D., Davis P.D., Hines K.K. (1995) SuperSignal™ CL-HRP : a new enhanced chemiluminescent substrate for the development of the horsedatish peroxisade label in Western blot applications. *J. NIH Res.* 7 : 76.
- Weeratna R.D., McCluskie M.J., Xu Y., Davis H.L. (2000) CpG DNA induces stronger immune response with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 18 : 1755-1762.
- Wen Y., Richardson R.T., O'Rand M.G. (1999) Processing of the sperm protein Sp17 during the acrosome reaction and characterization as a calmodulin binding protein. *Dev. Biol.* 206 : 113-122.
- Westhoff W.E., Slootstra J.W., Puijk W.C., van Leeuwen L., Schaaper W.M., Oonk H.B., Meloen R.H. (1997) In vitro inhibition of the biological activity of follicle-stimulating hormone by anti-peptide antisera representing the human follicle-stimulating hormone beta subunit sequence 33-53. *Biol. Reprod.* 56 : 460-468.
- Williams C.K. (1997) Development and use of virus-vectored immunocontraction. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 169-178.
- Witkin S.S., Higgin P.J., Bendich A. (1978) Inhibition of viral reverse transcriptase and human sperm DNA polymerase by anti-sperm antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 33 : 244-251.
- Wu W., Welsh M.J. (1996) Rapid Coomassie blue staining and destaining of polyacrylamide gels. *Biotechniques* 20 : 386-388.
- Xu J. (1998) Identification and characterisation of fox testis/sperm kinectin. Thèse de Doctorat Biochimie et Biologie Moléculaire, Camberra, Australie, 191 pages.
- Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In : *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil et J.D. Neill, eds., New York, Raven Press, pp 189-317.
- Yeung C.H., Cooper T.G., Nieschlag E. (1997) Human epididymal secreted protein CD52 on ejaculated spermatozoa : correlations with semen characteristics and the effect of its antibody. *Mol. Hum. Reprod.* 3 : 1045-1051.
- Zhu X., Naz R.K. (1997) Fertilization antigen-1: cDNA cloning, testis-specific expression and immunocontraceptive effects. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 94 : 4704-4709.
- Zhu X., Naz R.K. (1998) Cloning and sequencing of cDNA encoding for a human sperm antigen involved in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 176-183.

- Zhu X., Naz R.K. (1999) Comparison of ZP3 protein sequences among vertebrate species: to obtain a consensus sequence for immunocontraception. *Front. Biosci.* 4: 212-215.
- Zhu G.Z., Lin Y., Myles D.G., Primakoff P. (1999) Identification of four novel ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilization. *Gene* 234 : 227-237.
- Zraly Z., Bendova J., Sisak M., Diblikova I., Svecova D., Zajicova A., Veznik Z. (1998) Occurrence of antibodies to the sperms in the blood sera of bull and boars. *Vet. Med. Czech.* 43 : 137-144.

---

# **Annexes**

# 1. Liste des publications suscitées par ce travail

## Publications internationales :

2001. VERDIER Y. ; CHAFFAUX S. ; BOUÉ F. Identification of post-vasectomy sperm auto-antigens in fox (*Vulpes vulpes*) by two-dimensional gel electrophoresis and western blotting *Journal of Reproductive Immunology*, in press .
2001. VERDIER Y. ; ROUET N. ; ARTOIS M. ; BOUÉ F. Partial characterisation of sperm antigens in foxes (*Vulpes vulpes*). *Journal of Andrology*, in press

## Publications dans des livres de congrès :

2001. VERDIER Y. ; ROUET N. ; FARRÉ G. ; BOUÉ F. Identification of antigenic fox spermatozoa surface proteins for use in a contraceptive vaccine. *Proceedings of the VIIth International congress of Andrology, June 15-19 Montreal, Canada : 557-563*
2001. BOUÉ F. ; GENIN B. ; VERDIER Y. . Indentification of antibodies against spermatozoa in serum of male wild foxes. *Proceedings of the VIIth International congress of Andrology, June 15-19, Montreal, Canada : 65-70.*
1999. VERDIER Y. ; ARTOIS M. ; BOUE F. Recherche d'un vaccin contraceptif spécifique du renard. *13<sup>th</sup> Francophone Symposium of Mammalogy, October 23-24, Maisons-Alfort, in press*

## Communications :

2001. BOUÉ F. ; ROUET N. ; FARRE G. ; VERDIER Y. Challenge and strategy for the development of an immunocontraceptive vaccine specific to the red fox (*Vulpes vulpes*). *Communication orale, 5<sup>th</sup> International symposium on fertility control in wildlife, August 1-22, Skukuza Afrique du Sud.*
2002. VERDIER Y. ; ROUET N. ; FARRÉ G. ; BOUÉ F. Identification of antigenic fox spermatozoa surface proteins for use in a contraceptive vaccine. *Poster, 7<sup>th</sup> International Congress on Andrology, June 15-19, Montréal, Canada*
2001. BOUÉ F. ; GENIN B. ; VERDIER Y. . Indentification of antibodies against spermatozoa in serum of male wild foxes. *Poster, 7<sup>th</sup> International Congress on Andrology, June 15-19, Montréal, Canada.*
2000. BOUÉ F. ; ARTOIS M. ; VERDIER Y. Challenge and strategy for the development of an immunocontraceptive vaccine specific to the red fox. *Oral communication, Workshop « Control of reproduction in zoo- and wildlife animals », Berlin*

- 
2000. VERDIER Y. ; ROUET N. ; FARRE G. ; MUNIER M. ; ARTOIS M. ; BOUÉ F. Challenge and strategy for the development of an immunocontraceptive vaccine specific to the red fox. *Oral Communication, 4<sup>th</sup> Workshop SAR-LOR-LUX, September 25, Nancy, France.*
1999. VERDIER Y. ; ARTOIS M. ; BOUE F. Recherche d'un vaccin contraceptif spécifique du renard. *Poster, 13<sup>th</sup> Francophone Symposium of Mammalogy, October 24-25, Maisons-Alfort, France*
1999. VERDIER Y. CHAFFEAUX S. ; ARTOIS M. ; BOUÉ F. Characterization of sperm antigens for use as a target for immunocontraception in red fox (*Vulpes vulpes*) *Poster, 15<sup>th</sup> Annual meeting of the ESHRE, June 26-30, Tours, France.*

## 2. Annexes techniques<sup>2</sup> :

### 2.1 : Code des acides aminés

Acide aminé	Code	PM (dalton)	Codons
Alanine (Ala)	A	89	GCA ; GCC ; GCG ; GCU
Arginine (Arg)	R	174	AGA; AGG; CGA; CGC; CGG; CGT
Asparagine (Asn)	N	132	AAC; AAT
Ac. Aspatique (Asp)	D	133	GAC ; GAU
Cystéine (Cys)	C	121	UGC ; UGU
Ac. Glutamique (Glu)	E	147	GAA ; GAG
Glutamine (Gln)	Q	146	CAA ; CAG
Glycine (Gly)	G	75	GGA; GGC; GGG; GGU
Histidine (His)	H	155	CAC; CAU
Isoleucine (Ile)	I	131	AUA; AUC; AUU
Leucine (Leu)	L	131	CUA ; CUC ; CUG ; CUU ; UUA ; UUG
Lysine (Lys)	K	146	AAA ; AAG
Méthionine (Met)	M	149	AUG
Phénylalanine (Phe)	F	165	UUC ; UUU
Proline (Pro)	P	115	CCA ; CCC ; CCG ; CCU
Serine (Ser)	S	105	AGC; AGU; UCA; UCC; UCG; UCU
Threonine (Thr)	T	119	ACA; ACC; ACG; ACT
Tryptophane (Trp)	W	204	UGG
Tyrosine (Tyr)	Y	181	UAC ; UAU
Valine (Val)	V	117	GUA ; GUC ; GUG ; GUU

### 2.2 : Code des acides nucléiques

A	Adénine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine
M	A ou C
R	A ou G
W	A ou T
S	C ou G
Y	C ou T
K	G ou T
V	A ou C ou G
H	A ou C ou T
D	A ou G ou T
B	C ou G ou T
N	A ou C ou G ou T

<sup>2</sup> D'après Lewin B. (1999) Gene VI. De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1268 pages.

### 2.3 : Glossaires des principaux termes de biologie moléculaire utilisés

ADN polymérase	Enzyme qui synthétise un ou plusieurs brins fils d'ADN sous la direction d'une matrice d'ADN.
ADNc	Copie en ADN double brin d'un ARN messager.
Amorce	Courte séquence d'ADN ou d'ARN complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à son recopiage par une polymérase.
Amplicons	Fragment d'ADN produit par PCR.
Anticorps	Protéine (immunoglobuline) produite par des lymphocytes B, qui reconnaît un antigène étranger spécifique et déclenche ainsi la réaction immunitaire.
Antigène	Molécule capable d'induire une réponse immunitaire.
ARNase	Enzyme dont le substrat est l'ARN.
Bactériophage	Virus utilisant comme cellule hôte une bactérie. Egalement abrégé en « phage ».
Banque d'ADNc	Ensemble de fragments clonés représentant l'ensemble des gènes exprimés dans un tissu.
Cadre de lecture ouvert (ORF)	Ouverture du cadre de lecture, commençant par un codon initiateur (ATG) et se terminant par un codon non-sens.
Clonage	Production en grandes quantités de copies d'un fragment particulier d'ADN.
Dalton	Unité de masse correspondant à 1,007825 unité de masse atomique.
Fragment de Klenow	ADN polymérase I qui ne comporte que l'activité ADN polymérase et exonucléase 3'-5', l'activité exonucléase 5'-3' ayant été supprimée.
Genewalking	Technique de séquençage « pas à pas » de l'ADN, utilisant les résultats d'un séquençage pour définir une nouvelle amorce permettant le séquençage suivant.
Plasmide	ADN circulaire susceptible d'être répliqué d'une manière autonome dans une bactérie, servant de vecteur pour le clonage.
Plasmide	ADN circulaire extrachromosomique autonome, qui s'auto-réplique.

---

Point Isoélectrique	pH auquel la charge d'une protéine est nulle.
Queue	Séquence non traduite située à l'extrémité 3' d'un ARNm, après le codon de terminaison.
Southern blot	Transfert d'ADN d'un gel sur une membrane où il peut être hybridé avec un acide nucléique complémentaire.
Température de fusion (T <sub>m</sub> )	Température à laquelle la moitié des double-brins sont dissociés lors de la dénaturation thermique d'un acide nucléique.
Tête	Séquence non traduite présente à l'extrémité 5' des ARNm, qui précède le codon d'initiation.
Vecteur de clonage	Plasmide à l'intérieur duquel un fragment d'ADN peut être incorporé en vue d'être cloné.
Western blot	Transfert de protéines dénaturées d'un gel d'acrylamide sur une membrane où il peut être hybridé avec un anticorps.

Nom : Monsieur VERDIER  
Prénom : Yann

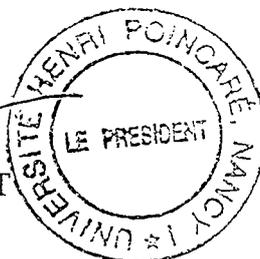
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT  
Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER n° 654

Nancy, le 23 septembre 2002

Le Président de l'Université

C. BURLET



L'objectif de ce travail est d'identifier des antigènes du spermatozoïde de renard (*Vulpes vulpes*), en vue de leur utilisation dans un vaccin contraceptif. Pour cela, nous avons produit des sérums reconnaissant des protéines de surface du spermatozoïde par immunisation de lapins et de renards et par vasectomie de renards. Ces sérums nous ont permis de sélectionner par Western blot 7 protéines particulièrement antigéniques, nommées P3, P4, P5, P8, P11 et P13. Le séquençage NH<sub>2</sub>-terminal de 6 de ces protéines a été réalisé, puis des fragments de l'ADN codant ces antigènes ont été amplifiés par RACE ou RT-PCR. Deux de ces fragments ont été utilisés comme sonde pour le criblage d'une banque d'ADNc de testicule de renard, que nous avons réalisée, permettant le séquençage de l'ADN codant les antigènes P8 et P13. Afin de caractériser ces antigènes, des sérums polyclonaux monospécifiques ont été produits chez la souris, permettant pour la protéine P5 l'étude de la spécificité d'espèce, de la spécificité d'organe, son immunolocalisation, et l'évaluation de l'effet des anticorps sur la mobilité des spermatozoïdes et sur la liaison à la zone pellucide. D'autre part, la caractérisation biochimique (recherche de glycosylation) a été réalisée pour les 7 antigènes.

Les protéines P4 et P8 présentent de fortes homologues avec des protéines mitochondriales, respectivement la NADH deshydrogénase et la cytochrome-C oxydase. P13 présente une forte homologie avec la protéine spermatique humaine *fibrousheatin 2*. Les antigènes P3 et P7 sont des glycoprotéines dont la séquence déterminée par RACE PCR ne présente pas d'homologie importante avec des protéines connues, mais suggère qu'elles pourraient avoir une localisation membranaire. Le sérum dirigé contre la glycoprotéine P5 a permis d'établir que cette protéine inconnue ne semble pas spécifique d'espèce ou d'organe, mais que les anticorps dirigés contre cette protéine réduisent la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide.

Ce travail présente une stratégie ayant permis la sélection et l'identification d'antigènes spermatiques. Différentes études sont encore nécessaires pour déterminer la séquence et les propriétés de ces antigènes. La recherche d'épitopes spécifiques et d'une formulation vaccinale adaptée pourrait permettre leur utilisation dans un vaccin contraceptif.

---

#### **Selection, identification and partial characterisation of fox (*Vulpes vulpes*) sperm antigen for use in a contraceptive vaccine**

The aim of this work was to identify antigenic proteins on fox (*Vulpes vulpes*) spermatozoa, in order to develop a contraceptive vaccine. First, we obtained antisera directed against sperm surface proteins by rabbit and fox immunisation, and by fox vasectomy. Using this sera for Western blotting, 7 highly antigenic proteins were selected. They were named P3, P4, P5, P8, P11 and P13. Out of these 7 proteins, 6 were microsequenced by using Edman chemistry. Then, we obtained the cDNA encoding the 6 antigens by using RACE PCR or RT-PCR. Two PCR products were used as probes for the screening of a fox testis cDNA library realised in our lab. This allowed us to identify, clone and sequence the cDNA encoding P8 and P13. In order to characterise the selected antigens, we produced mouse polyclonal sera. This allowed us, for the protein P5, to assess the species and organ specificity, to localise them on the spermatozoa, and to assess the effect of these antisera on the zona pellucida-sperm binding, and on the sperm mobility. The glycolysation was equally studied for the 7 antigens.

P4 and P8 have homology with mitochondria proteins: NADH deshydrogenase and cytochrome-C oxydase respectively. P13 has homology with the human sperm protein *fibrousheatin 2*. The sequence of the glycoproteins P3 and P7, determined using RACE PCR, does not show similarity with any protein, and suggest that they are transmembrane proteins. P5 is a new protein which is not fox-specific and not sperm-specific. However, the antisera directed against P5 decrease the sperm-zona pellucida binding.

This manuscript describe a strategy which allowed the selection and the identification of sperm antigens. Many studies are necessary in order to determine the full sequence and properties of these antigens. The determination of specific epitopes and of adapted delivery system could allows their use in a contraceptive vaccine.

---

**Discipline :** Génie biologique et médical

**Mots-clés :** Immunocontraception ; antigène spermatique ; anticorps anti-spermatozoïde ; *Vulpes vulpes* ; spermatozoïde ; électrophorèse en deux dimensions ; clonage ; séquençage

**Intitulé et adresse du laboratoire :**

AFSSA - Laboratoire d'études et de recherches sur la rage et la pathologie des animaux sauvages  
Domaine de Pixérécourt, BP9, F-54220 Malzéville