

# Les approches épидидymaires de la contraception masculine

## Epididymal approaches to male contraception

J.-R. Drevet

Reçu le 18 avril 2012 ; accepté le 23 mai 2012  
© SALF et Springer-Verlag France 2012

**Résumé** L'offre en matière de moyens contraceptifs masculins est limitée et, en particulier, à ce jour il n'existe pas de contraception hormonale masculine sur le marché. L'épididyme, dans lequel les spermatozoïdes acquièrent leurs capacités fécondantes et où ils sont stockés, s'avère être un site intéressant à cibler. Cette revue vise à présenter de façon synthétique les quelques pistes prometteuses qui ont émergé ces dernières années.

**Mots clés** Épididyme · Contrôle de la fertilité

**Abstract** The offer in terms of male contraceptives is rather limited and, in particular, there is still no non hormonal pharmacological contraceptive available to date. Epididymis in which spermatozoa become fertile and are stored constitutes an interesting territory to target. This review aims to present concisely some promising trails that have been pursued these late years.

**Keywords** Epididymis · Fertility control

## Introduction générale

En dépit de l'éventail des moyens contraceptifs disponibles, 38 % des grossesses dans le monde sont non désirées et 22 % d'entre elles se terminent par un avortement, suggérant clairement qu'il est nécessaire d'élargir le choix des méthodes contraceptives. Jusqu'à nos jours, les méthodes de contrôle pharmacologique de la fertilité offrant un bon niveau de sûreté, d'efficacité et qui soient aisées à mettre en œuvre ne concernent que la femme [1]. En ce qui concerne les hom-

mes, l'offre en matière de techniques contraceptives est beaucoup plus réduite (préservatif, vasectomie et *coitus interruptus*) et il n'existe pas encore sur le marché de contraceptif pharmacologique masculin réversible. Pourtant, environ un tiers de toutes les méthodes contraceptives utilisées de par le monde repose sur la « coopération » du partenaire masculin. Avec les nouvelles possibilités apportées par l'ère de la biologie moléculaire, il y a maintenant des chances pour que des moyens pharmacologiques de contrôle de la fertilité masculine puissent voir le jour et ainsi, que l'éventail des choix offerts aux hommes s'élargisse afin qu'ils puissent prendre une part plus importante dans la régulation de leur fertilité [2,3]. Parmi les différentes pistes explorées chez le mâle, il est envisagé d'interférer avec les nécessaires étapes de maturation post-gonadique des spermatozoïdes lors de laquelle ils acquièrent leurs capacités fécondantes. Quelques avancées et quelques pistes sans issues dans ce domaine sont évoquées ci-dessous.

## L'épididyme et ses fonctions : des pistes pour le développement de nouvelles stratégies contraceptives

Sommairement, il y a trois approches pharmacologiques possibles de la contraception masculine : 1) interférer avec la production des gamètes mâles dans le testicule ; 2) interférer avec l'acquisition post-testiculaire des capacités fécondantes des spermatozoïdes, en d'autres termes, interférer avec les fonctions de l'épididyme puisque c'est dans ce tubule que les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant et sont préparés aux événements ultimes qui précèdent la fécondation que sont : la capacitation et la réaction acrosomique (pour une revue sur l'épididyme et ses fonctions voir : [4]) ; et enfin, 3) interférer avec les gamètes matures directement. En quoi l'épididyme et les fonctions qui lui sont associées s'avèrent être intéressants dans le but de développer de nouvelles stratégies contraceptives post-testiculaires ?

Les spermatozoïdes produits au sein de la gonade mâle quittent l'épithélium séminifère via la *rete testis* et les canaux

---

J.-R. Drevet (✉)  
Laboratoire GReD « Génétique,  
Reproduction et Développement »,  
UMR CNRS 6293 - INSERM U1103 - Clermont Université,  
24, avenue des Landais, BP 80026,  
F-63171 Aubière cedex, France  
e-mail : joel.drevet@univ-bpclermont.fr

efférents pour entrer dans le tubule épидидymaire. Grâce aux contractions péristaltiques des muscles lisses qui entourent le tubule épидидymaire et à l'écoulement du fluide épидидymaire, les gamètes progressent vers la partie terminale de l'organe et leur lieu de stockage entre deux éjaculations, la queue de l'épididyme ou *cauda*. Ce voyage chez la plupart des mammifères se fait en une dizaine de jours. Bien que les gamètes qui entrent dans l'épididyme apparaissent structurellement complètement différenciés, ils sont fonctionnellement immatures. Cette immaturité se caractérise par l'incapacité des gamètes sortant du testicule à exprimer leur mobilité et à reconnaître et pénétrer un ovule. Ces paramètres fonctionnels (mobilité, pouvoir fécondant) sont graduellement acquis au cours de la descente épидидymaire [5]. In fine, les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme sont eux fonctionnellement compétents et aptes à féconder un ovule. Étant donné le caractère silencieux des spermatozoïdes à l'issue de la spermatogenèse, c'est-à-dire l'absence d'événements de transcription et de traduction propres, toutes les modifications qu'ils subissent pendant la descente dans le tubule épидидymaire sont dues aux activités du fluide épидидymaire et, par extrapolation, aux activités de l'épithélium sécréteur épидидymaire.

Brièvement, toutes les régions (tête, pièce intermédiaire, flagelle), tous les compartiments (acrosome, noyau, fuseau mitochondrial...) et tous les constituants du spermatozoïde (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques) vont être concernés par les événements de la maturation épидидymaire. Bien que l'on soit encore loin de connaître dans le détail toutes les modifications qui accompagnent cette maturation épидидymaire des spermatozoïdes, leur enchaînement ainsi que les conséquences fonctionnelles de ces modifications sur les gamètes, l'on commence à avoir une vision assez claire de certains aspects de cette maturation (pour une revue récente voir : [6]).

À titre d'exemple, il est clair que lors du transit épидидymaire, le profil des protéines de surface du gamète mâle mais aussi des protéines internes est modifié. Cela passe par l'acquisition de nouvelles protéines issues de processus de sécrétions mérocrines<sup>1</sup> de l'épithélium épидидymaire, mais aussi par le transfert de protéines ne possédant pas de signal peptidique de sécrétion via des vésicules lipidiques (dénommées épидидymosomes) provenant de processus de sécrétions apocrines<sup>2</sup> [7].

Cela passe aussi par des événements de modification plus subtile de protéines acquises de novo et/ou déjà présentes sur les gamètes via de la protéolyse ménagée, des événements de glycosylations/déglycosylations différentielles et tout autre

type de modifications post-traductionnelles des protéines (oxydation, phosphorylation, sulfatation, sumoylation<sup>3</sup>).

Les profils lipidiques des gamètes sont de même profondément remaniés pendant la descente épидидymaire des gamètes par des processus à ce jour peu connus mais qui au final confèrent à cette cellule des propriétés membranaires particulières en termes de fluidité, de domaines « raft et non-raft »<sup>4</sup> séquestrant des acteurs de signalisation cellulaire impliqués dans le déclenchement de la capacitation et de la réaction acrosomique (pour des revues récentes voir : [8,9]).

Un autre aspect de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes qu'il est nécessaire d'évoquer concerne la protection et la survie des gamètes en transit et stockés dans la partie terminale du tubule. Comme déjà mentionné plus haut, les spermatozoïdes post-testiculaires sont des cellules silencieuses qui n'ont pas ou très peu d'aptitudes à se défendre contre les agressions auxquelles ils pourraient être soumis. En effet, ces cellules ne peuvent monter des réponses transcriptionnelles et traductionnelles face à un quelconque stress et elles ne peuvent pas non plus compter sur la protection que peut conférer leur équipement enzymatique cytoplasmique étant donné qu'elles ont évacué, en fin de spermatogenèse, l'essentiel de leur cytoplasme résiduel. L'épididyme et le fluide épидидymaire assurent donc, via différentes activités, la protection de ces cellules durant leur transit et pendant les périodes de stockage entre deux éjaculations. Un aspect important de cette protection épидидymaire des spermatozoïdes concerne les capacités antioxydantes du territoire épидидymaire qui contrôlent les atteintes oxydantes du spermatozoïde. Ces dernières constituent une part importante des infertilités mâles en affectant, entre autres, la mobilité des spermatozoïdes et l'intégrité du lot chromosomique paternel (pour une revue récente voir : [10]).

Comprendre tous les aspects de cette maturation post-testiculaire des gamètes est un enjeu, non seulement pour le diagnostic et éventuellement la thérapie des infertilités mâles à spermatogenèse normale (qui au passage représentent la moitié des infertilités mâles), mais aussi pour ce qui nous préoccupe ici, c'est-à-dire le développement de nouvelles stratégies contraceptives post-testiculaires. En effet, l'idée a logiquement émergé qu'interférer de manière réversible avec l'une ou l'autre, voire plusieurs de ces activités épидидymaires, pourrait être utilisé à des fins contraceptives [11-18]. L'analyse de la physiologie de l'épididyme n'a pas mobilisé/ne mobilise pas une importante communauté scientifique, cependant les approches développées ces dix

<sup>1</sup> Sécrétions mérocrines = sécrétions qui se produisent sans la destruction des cellules glandulaires.

<sup>2</sup> Sécrétions apocrines = sécrétions qui se produisent en entraînant la couronne de cytoplasme apical des cellules épithéliales.

<sup>3</sup> Sumoylation = La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible.

<sup>4</sup> Raft and non-raft domains = domaines membranaires de composition lipidique et protéique hétérogènes = radeaux lipidiques membranaires.

dernières années par un petit nombre de groupes ont permis d'appréhender la multiplicité et la complexité des événements de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes. Comme cela a été le cas pour beaucoup d'autres tissus, l'épididyme a bénéficié des récentes techniques d'exploration à grande échelle (transcriptomique et protéomique) qui ont permis d'identifier des gènes et protéines exprimés de façon particulière dans ce territoire [19-31]. Ces approches ont généré de grandes quantités de résultats mettant en lumière des gènes et protéines aux fonctions connues mais aussi des gènes et des protéines dont on ne soupçonnait pas qu'ils étaient exprimés dans l'épididyme. Le problème dans cette profusion de résultats est maintenant de valider la fonction et l'importance de ces gènes et protéines dans la maturation épидидymaire et dans la fertilité mâle et de sélectionner lesquels pourraient se révéler être des cibles contraceptives intéressantes. Par intéressantes, on entend en pratique des protéines ou des activités que l'on puisse cibler pharmacologiquement. C'est à ce niveau que les modèles animaux mutants révèlent leur puissance en permettant d'évaluer spécifiquement l'impact reproductif de l'inactivation d'un gène donné et donc, de son potentiel en tant que piste contraceptive.

De façon conceptuelle, cibler l'épididyme et ses fonctions dans une visée contraceptive peut apparaître attractif, au moins à trois titres qui répondent en partie aux limitations des stratégies hormonales qui visent à bloquer la production des gamètes dans le testicule [32]. Le premier avantage est de ne pas perturber la spermatogenèse et d'agir uniquement sur les paramètres fonctionnels des gamètes issus du testicule. Le second avantage, sur le papier tout au moins, concerne la rapidité d'action ainsi que la rapidité de la réversibilité d'action. En effet, la spermatogenèse est un processus lent qui, chez l'homme, couvre environ dix semaines. Les spermatozoïdes transitent ensuite dix jours environ dans l'épididyme et sont stockés pour un temps dépendant de l'activité sexuelle de l'individu. Un agent épидидymaire de contrôle de la fertilité permettrait d'éviter d'avoir à interférer avec le processus de spermatogenèse et pourrait agir plus rapidement qu'un agent qui affecte la fonction testiculaire. Le troisième avantage réside dans le fait qu'étant donné la multiplicité des modifications apportées aux gamètes pendant la descente épидидymaire, il est peut-être possible de trouver une stratégie (un agent) qui n'implique pas le volet hormonal. Considérant les effets pléiotropes joués par les hormones sur les processus physiologiques en dehors de la gamétogenèse, il serait ainsi possible dans l'absolu de diminuer les effets secondaires inhérents à la prise de contraceptifs hormonaux. Comme c'est aussi le cas pour les cibles testiculaires, la présence d'une barrière sang/épидидyme pose un problème en ce qui concerne les modalités d'administration d'un éventuel agent contraceptif épидидymaire. Cependant, la barrière hémato-épидидymaire est moins solide que la

barrière hémato-testiculaire offrant ainsi théoriquement une plus grande perméabilité [33]. Cibler l'épididyme et ses fonctions pourrait répondre ainsi au moins à deux des cinq critères essentiels mis en avant par les industriels désireux d'optimiser l'offre contraceptive mâle : rapidité d'action et innocuité. Il reste néanmoins à choisir les bonnes cibles pour répondre aux trois autres critères : efficacité, réversibilité et facilité d'usage.

Les éléments qui vont suivre dans la suite de cet article ne prétendent pas être exhaustifs et présenter tous les gènes et protéines épидидymaires qui pourraient s'avérer être potentiellement intéressants dans une visée contraceptive. Je limiterai mon propos à quelques exemples probants et/ou prometteurs qui illustrent que l'épididyme et ses fonctions pourraient permettre de nouvelles approches contraceptives, non hormonales ; ce qui n'est encore pas une réalité. J'évoquerai aussi certaines pistes aujourd'hui abandonnées.

Bien qu'il y ait eu des tentatives précoces de contraception épидидymaire sur modèles animaux reposant sur l'injection directe de composés métalliques (cuivre, zinc et différents dérivés) dans la queue de l'épididyme, provoquant des réponses inflammatoires aux effets spermicides, il ne sera pas fait ici de résumé de ces expériences (à titre d'exemple voir : [34-36]). Ces tentatives ont conduit, dans certains cas, à une infertilité réversible, mais qui souvent s'accompagnait d'altérations tissulaires de l'épididyme, voire à distance, du testicule, associées à une apoptose germinale. La toxicité induite par ces stratégies n'en fait pas des pistes intéressantes en clinique. Quelques tentatives d'interférence avec des sécrétions majeures de l'épididyme ont aussi été testées sans grand succès, avec par exemple, l'utilisation de l'antibiotique pivampicilline qui favorise l'excrétion urinaire de la carnitine ou encore l'utilisation de la catanospermine, un inhibiteur de glucosidase neutre [37]. Pour ces dernières stratégies, même si l'on pouvait baisser la fertilité des animaux traités, cela n'a jamais conduit à une stérilité réversible. Dans les sections suivantes de cette revue, l'accent est donc porté sur des stratégies contraceptives fondées sur des protéines synthétisées et/ou sécrétées par l'épididyme.

## **Protéines et activités épидидymaires dans le « pipeline » des potentiels contraceptifs post-testiculaires**

### **Le cas d'Eppin**

Le laboratoire de biologie de la reproduction à Chapel Hill (Caroline du Nord, États-Unis) en collaboration avec le « *Human Genome Sciences* » programme (Rockville, Maryland, États-Unis) a généré des bibliothèques cADN d'épididyme humain [38] dans le but d'obtenir les séquences de gènes spécifiques de l'épididyme. Parmi les centaines de clones

ADNc obtenus, un ADNc codant potentiellement pour un inhibiteur de protéases spécifique de l'épididyme non identifié à ce jour a été retenu. Le clone a été dénommé EPPIN pour « *EPididymal Protease INhibitor* » [39] et est aussi connu sous le nom générique de SPINLW1. Le gène correspondant a été identifié et ses trois produits ARN messagers codent pour deux isoformes d'une protéine riche en résidus cystéines présentant à la fois un domaine de type KUNITZ et un domaine « *WAP-type four disulfide core* », domaines classiques des inhibiteurs de protéases [39]. Deux des isoformes d'EPPIN (EPPIN-1 et EPPIN-3) présentent un signal peptidique de sécrétion. Chez l'homme, le gène EPPIN est situé sur le chromosome 20 en position 20q12-13.2 [39]. Des polymorphismes génétiques d'EPPIN ont récemment été rapportés, certains étant associés à des infertilités [40]. Bien que d'expression épидидymaire majoritaire, une étude transcriptomique plus détaillée a révélé qu'EPPIN n'est pas strictement épидидyme-spécifique puisque le testicule (les cellules de Sertoli) exprime et sécrète aussi EPPIN qui est ainsi retrouvée en faible proportion à la surface des spermatozoïdes testiculaires. Dans les canaux efférents et dans l'épididyme, l'isoforme EPPIN-1 est sécrétée par les cellules épithéliales et est retrouvée à la fois à la surface des spermatozoïdes et sur la bordure apicale des cellules épithéliales épидидymaires [39]. Dans ces tissus, l'expression d'EPPIN est gouvernée par les androgènes [41-43].

La (les) fonction(s) d'EPPIN a (ont) commencé à émerger quand il est apparu : 1) qu'EPPIN avait la capacité de se lier à la séménogéline (SEMG1), une protéine sécrétée par les vésicules séminales ; 2) qu'EPPIN possédait de façon logique pour un inhibiteur de protéase une activité antimicrobienne [44,45] et enfin ; 3) qu'EPPIN modulait l'activité de la protéase à sérine PSA (*Prostate Specific Antigen*). En effet, il a été montré qu'EPPIN module l'hydrolyse de la séménogéline par la PSA et qu'en l'absence d'EPPIN, la PSA hydrolyse la séménogéline en petits peptides [46]. À l'inverse, en présence d'EPPIN à la surface des gamètes, la séménogéline est partiellement protégée de l'hydrolyse par la PSA [47]. Comment EPPIN se fixe sur le gamète a aussi été élucidé. EPPIN a été trouvée à la surface des gamètes dans un complexe protéique associant la clustérine (CLU) et la lactotransferrine (LTF) [48] réparti en foci le long de la pièce principale de l'axe flagellaire. EPPIN n'a pas de récepteur propre, mais les récepteurs de LTF et CLU contribuent à stabiliser EPPIN dans le complexe à la surface des gamètes. À l'éjaculation, les spermatozoïdes quittent l'épididyme, se mélangent aux sécrétions des vésicules séminales et la séménogéline est ajoutée au complexe EPPIN/LTF/CLU. La fixation de la séménogéline à EPPIN bloque la mobilité progressive rectiligne des gamètes [49]. Quand le fluide prostatique est ajouté à l'éjaculat, la PSA hydrolyse la séménogéline pendant la phase de liquéfaction, libérant ainsi la mobilité progressive rectiligne [50].

L'importance d'EPPIN dans la fonction de reproduction a été testée par une approche immunologique chez des primates non humains (*Macaca radiata*) plutôt qu'en élaborant un modèle murin invalidé pour la raison que la séménogéline n'est pas exprimée chez la souris. Plusieurs singes mâles, qui présentaient un titre d'anticorps anti-EPPIN élevé après immunisation, ont été trouvés infertiles [51], suggérant clairement qu'EPPIN est une protéine importante pour la fonction de reproduction. Chez ces animaux immunisés, la mobilité spermatique et la capacité d'EPPIN à lier la séménogéline sont affectés par les anticorps anti-EPPIN. Deux épitopes dominants, responsables de l'effet contraceptif des anticorps anti-EPPIN ont été identifiés respectivement dans les domaines N et C-terminaux de la protéine [52]. Tout récemment enfin, un anticorps dirigé spécifiquement contre l'épitope du domaine C-terminal a montré un effet inhibiteur puissant sur la mobilité spermatique chez l'homme [50].

Ainsi, l'immunisation avec un anticorps anti-EPPIN résulte en une contraception efficace et réversible qui mime la fixation de la séménogéline sur EPPIN induisant une perte de motilité progressive rectiligne des gamètes. Cette preuve de concept étant établie, l'étape suivante est de rechercher des composés organiques qui pourraient avoir le même effet que l'anticorps anti-EPPIN, c'est-à-dire bloquer le site de fixation de la séménogéline et inhiber la mobilité des spermatozoïdes. Un screening a été réalisé de façon à isoler des composés qui ont la capacité in vitro d'empêcher la fixation de l'anticorps anti-EPPIN [50]. Environ 100 000 composés ont été testés par une approche à haut débit quant à leur capacité à inhiber la mobilité spermatique. Quelques composés se sont avérés efficaces et sont en cours d'études.

Étant donné le mode de fonctionnement d'EPPIN et son étroite interaction avec la séménogéline, une autre voie d'approche pourrait consister à interférer avec la sécrétion de la séménogéline par les vésicules séminales. La preuve de fonctionnement sera plus difficile à établir car comme déjà évoqué plus haut, cette protéine n'est pas exprimée en modèle murin, interdisant une vérification fonctionnelle par la génération d'un modèle KO.

### **La famille des protéines sécrétées riches en cystéines (CRISP)**

La famille CRISP (*cysteine-rich sperm proteins*) des mammifères comporte quatre membres : CRISP1 (aussi dénommée protéine DE ou AEG), CRISP2 (aussi appelée TPX1), CRISP3 et CRISP4. Chez la souris, seules CRISP1 et CRISP4 sont exprimées dans l'épididyme [51,52], CRISP2 est d'expression testiculaire [53] dans les spermatozoïdes en différenciation et CRISP3 est exprimée majoritairement dans les glandes salivaires, le pancréas et la prostate [54]. Les protéines CRISP des mammifères sont membres d'une famille plus large de protéines CRISP retrouvées en



particulier chez les reptiles avec qui elles partagent la caractéristique de contenir 16 résidus cystéines conservés. Chez les reptiles, les protéines CRISP sont trouvées dans les sécrétions salivaires où elles agissent en tant que toxines ayant une action de bloqueur de canaux calciques et potassiques [55-57]. Bien que les fonctions physiologiques et les mécanismes d'action des protéines CRISP de mammifères ne soient pas prouvés, le haut degré d'identité que ces protéines présentent avec leurs orthologues reptiliens laisse supposer une certaine conservation de fonction [58]. Chez l'homme, CRISP1 et CRISP4 sont exprimées dans l'épididyme proximal, et contrairement à la souris CRISP3 a été trouvée fortement exprimée dans la queue de l'épididyme et dans l'ampoule déférentielle [59]. Chez l'homme comme chez la souris, CRISP1 est sécrétée dans la lumière du tubule épидидymaire et est retrouvée à la surface des gamètes dans des localisations distinctes entre les deux modèles puisque chez la souris, CRISP1 est située dans la région dorsale de l'acrosome alors que chez l'homme, CRISP1 est située dans le compartiment post-acrosomal [60]. Deux populations de protéines CRISP1 sont liées aux gamètes, une fraction majoritaire qui présente une association labile et une fraction minoritaire mais avec un accrochage solide. Le décrochage de la fraction labile semble être nécessaire à la capacitation, ce qui a laissé suggérer que CRISP1 pouvait être impliquée dans la prévention d'un déclenchement trop précoce de la capacitation lors du transit et du stockage épидидymaire [58,61]. En ce qui concerne la fraction mineure de CRISP1 solidement ancrée au gamète, il a été montré qu'elle était toujours présente sur le gamète après la capacitation et qu'elle migrait au niveau du segment équatorial pendant la réaction acrosomique [60,62]. Ces observations suggèrent que CRISP1 pourrait aussi participer au processus d'interaction avec la zone pellucide de l'ovule et d'une façon plus générale à la fusion gamétique [60,62,63]. CRISP1 pourrait ainsi être une cible intéressante pour le développement d'un contraceptif post-testiculaire [64]. La génération d'un modèle murin invalidé pour CRISP1 a permis de préciser plus avant l'étendue des fonctions de CRISP1. De façon surprenante, les souris *Crisp1*<sup>-/-</sup> sont fertiles en monte naturelle mais aussi en fécondation in vitro, avec des ovules présentant un cumulus intact [65]. Cependant, les spermatozoïdes des animaux *Crisp1*<sup>-/-</sup> se sont révélés moins efficaces pour féconder in vitro des ovules dépourvus de cumulus et des ovules dépellucidés révélant que CRISP1 joue effectivement un rôle dans l'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide [65,66].

Ainsi, avec ses rôles : 1) d'inhibiteur épидидymaire de la capacitation et ; 2) de modulateur dans l'interaction primaire avec la zone pellucide de l'ovule, CRISP1 offre deux possibilités comme potentielle cible contraceptive. Dans une première option, il serait possible de développer une approche immunocontraceptive dans laquelle des anticorps anti-

CRISP1 pourraient interférer avec la reconnaissance gamétique. Alternativement, comme la stratégie choisie ci-dessus pour EPPIN qui n'implique pas la réponse immune, il sera possible de rechercher un composé pharmacologique qui puisse interférer avec la fonction de CRISP1 dans la liaison à la zone pellucide. Enfin, peut-être encore plus prometteur est d'interférer avec le rôle de CRISP1 dans la prévention de la capacitation. La recherche d'un composé pharmacologique qui puisse inhiber cette fonction décapacitante de CRISP1 dans l'épididyme pourrait conduire à la production de spermatozoïdes capacités prématurément.

### P34H

P34H est, chez l'homme, une protéine spermatique localisée au niveau de la coiffe acrosomale et acquise par les gamètes lors de la maturation épидидymaire, plus précisément lors du passage dans le corps de l'épididyme [67,68]. P34H serait impliquée dans l'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide de l'ovule [68]. P34H présente 71 % d'identité avec une carbonyl réductase tétramérique appartenant à la famille des déshydrogénases / réductases à chaîne courte [68]. P34H constitue chez l'homme un marqueur post-testiculaire de fertilité. Le contenu en P34H de spermatozoïdes issus d'une population d'hommes infertiles idiopathiques est significativement moins élevé que dans un groupe témoin fertile [69,70]. Une étude en double aveugle a aussi mis en avant qu'il existait une corrélation positive entre la quantité de P34H sur les gamètes mâles et le succès reproductif chez des couples ayant recours à la fécondation in vitro [71]. De façon à prouver le rôle joué par cette protéine dans la reproduction, son orthologue rongeur (P26h : « h » pour hamster) a été étudié plus avant. Une approche immunocontraceptive a été utilisée, soit avec la protéine P26h native ou avec une protéine recombinante couplée à un porteur conventionnel : MBP (*Maltose Binding Protein*). Des hamster mâles ont été immunisés et ensuite croisés avec des femelles superovulées. Une diminution de 20 à 25 % de la fertilité a été enregistrée suite à ces protocoles [72]. Par ailleurs, le croisement de femelles hamsters immunisées avec P26h a conduit à une réduction significative du nombre de fœtus viables chez celles ayant un titre d'anticorps sanguin élevé [73]. Ainsi, si P34H se comporte comme P26h, une stratégie immunocontraceptive pourrait éventuellement fonctionner. Une recherche d'épitope immunodominant devra cependant être menée, de façon à augmenter l'efficacité contraceptive. De façon étonnante, la littérature sur P34H et P26h comme cible contraceptive s'est tarie ces dernières années.

### SFP2

SFP2 pour « *sperm flagellar protein 2* » est une protéine candidate récente pour le développement d'une stratégie

contraceptive post-testiculaire. SFP2 fait partie d'un petit groupe de protéines spermatiques d'origine épидидymaire identifiées chez la souris via une approche combinée immunologique et protéomique [74]. Un homologue humain a été caractérisé [75]. Comme dans les cas précédents, la pertinence de SFP2 en tant que cible contraceptive a été testée via des immunisations actives de souris mâles avec deux peptides synthétiques de SFP2. Seul un des deux peptides a permis de générer des titres élevés d'anticorps anti-SFP2 qui reconnaissent la protéine homologue sur les gamètes murins mais aussi les protéines orthologues humaine et de rat [75]. Les analyses histologiques des testicules et des épидидymes des souris immunisées n'ont pas révélé de perturbations des tissus. Les mâles immunisés présentent une réduction très significative de fertilité de l'ordre de 80 % [75]. L'incubation de spermatozoïdes avec le sérum immun anti-SFP2 permet d'obtenir une réduction significative de la mobilité spermatique et de la viabilité sans pour autant conduire à l'agglutination des gamètes. Le titre en anticorps anti-SFP2 chez les animaux immunisés décline 22 semaines après immunisation, et la fertilité des souris est alors complètement restaurée [75]. Ces résultats sont encourageants et font de SFP2 une nouvelle cible pour le développement d'une approche immunocontraceptive.

### Stress oxydant épидидymaire et contraception.

#### La fin d'une piste

Un facteur récurrent dans beaucoup d'infertilités mâles est l'observation d'atteintes oxydantes des gamètes. Stress oxydant et infertilité masculine ont été liés dès les travaux pionniers de Thaddeus Man et de ses collaborateurs qui ont observé une corrélation entre le contenu en lipides peroxydés des spermatozoïdes humains et la perte de mobilité [76]. Cette observation a été par la suite corroborée par de nombreuses autres études [77-84]. Le fait que des antioxydants comme l'alphatocophérol puissent restaurer la mobilité spermatique in vivo comme in vitro confirme que la peroxydation lipidique est une cause majeure de la perte de mobilité des gamètes humains [85,86]. MacLeod (1943) [87] fut aussi le premier à démontrer que l'incubation de spermatozoïdes sous des tensions en oxygène élevées conduisait à une perte rapide de leur motilité et que celle-ci pouvait être restaurée par l'addition de catalase suggérant que le peroxyde d'hydrogène est l'espèce oxygénée réactive en cause. Ces résultats ont depuis aussi été confirmés [88] et étendus puisque la peroxydation lipidique induite par l'exposition au peroxyde d'hydrogène ne cause pas seulement une perte de la motilité des gamètes mais altère aussi toutes les fonctions spermatiques qui dépendent de l'intégrité membranaire telles que : la fusion avec l'ovule et l'aptitude à déclencher la réaction acrosomique [76,89,90]. Si on associe à ces observations le haut niveau de protection antioxydante que l'épididyme

assure vis-à-vis des gamètes par la présence dans le fluide d'antioxydants primaires enzymatiques et non enzymatiques [91], il est logiquement venu à l'esprit que l'on pouvait peut-être exploiter cet aspect dans une visée contraceptive. L'idée étant de recréer artificiellement ce qui semble être une cause naturelle répandue d'infertilité masculine. Le peroxyde d'hydrogène lui-même ou des réactifs qui génèrent du peroxyde d'hydrogène au contact des gamètes pourraient se révéler être des agents contraceptifs efficaces. Étant donné que l'exposition directe de spermatozoïdes au peroxyde d'hydrogène perturbe leurs fonctions [92], ce composé pourrait être à la base d'un agent spermostatique topique. Une telle formulation aurait l'avantage de combiner une action spermicide et une action microbicide puisque naturellement la stérilité vaginale est assurée par un pH faible et par du peroxyde d'hydrogène produit par la microflore endogène.

Dans cette perspective attractive de contraception topique via le peroxyde d'hydrogène un écueil est néanmoins apparu. Pour être efficace, un agent spermostatique topique devra agir très rapidement sur des millions de spermatozoïdes, ce que ne pourra accomplir le peroxyde d'hydrogène. Une alternative serait alors d'exposer les gamètes à un stress oxydant pendant la descente épидидymaire en altérant les activités de protection antioxydante de l'environnement luminal. Une telle stratégie a été testée dans un modèle murin invalidé pour un antioxydant primaire enzymatique majeur (la glutathion peroxydase 5, GPx5) sécrété dans le fluide épидидymaire par l'épithélium de la tête de l'épididyme [93]. La plus faible protection antioxydante épидидymaire chez les souris *Gpx5*<sup>-/-</sup> a conduit à des dommages oxydatifs aux spermatozoïdes essentiellement visibles au niveau du noyau spermatique [93]. De tels dommages n'affectent pas la fécondation mais ont conduit à des défauts de développements embryonnaires lorsque des mâles *Gpx5*<sup>-/-</sup> âgés ont été croisés avec des femelles sauvages [93]. Ce résultat met en exergue un autre écueil d'une approche contraceptive pro-oxydante épидидymaire qui est que le stress oxydant est associé aux dommages à l'ADN du spermatozoïde avec de possibles conséquences sur le développement embryonnaire et l'éventuelle transmission à la descendance d'anomalies génétiques [93,94]. En écho à ces observations en modèle murin, il est à noter que des niveaux élevés de dommages à l'ADN spermatique ont été reliés chez l'homme à des anomalies du développement embryonnaire préimplantatoire, l'augmentation des taux d'avortements précoces et l'augmentation de la morbidité dans la descendance illustrée par une fréquence accrue de pathologies monogéniques dominantes, d'infertilité et de cancers [95]. Dans un passé assez récent, deux avancées avaient permis de comprendre certaines infertilités masculines spontanées : les délétions du chromosome Y et le constat, déjà cité plus haut, que de nombreux cas d'infertilité mâle étaient associés à des dommages oxydatifs aux spermatozoïdes.

Bien que les mécanismes responsables de délétions spontanées du chromosome Y chez les hommes infertiles ne soient pas encore résolus, deux hypothèses sont mises en avant. Une hypothèse est qu'il y aurait des événements de recombinaison intrachromosomique dans la lignée germinale du père impliquant de larges blocs de séquences répétées [96]. Une autre hypothèse serait que ces événements de recombinaisons surviendraient post-fécondation, quand l'œuf fécondé tente de réparer les dommages du noyau paternel. Dans la première hypothèse, les délétions du chromosome Y seraient détectables dans les gamètes du père, alors que dans la seconde suggestion, les délétions ne seraient visibles que dans la descendance mâle, les spermatozoïdes du père ne présentant alors qu'un taux élevé de dommages à l'ADN. De tels dommages à l'ADN des spermatozoïdes sont très largement répandus chez l'homme et étroitement corrélés à l'infertilité. L'étiologie de ces dommages est associée au stress oxydant dans la lignée germinale [95]. Ainsi, les principales causes d'infertilité mâle spontanée : délétion du chromosome Y et atteintes oxydatives du noyau gamétique pourraient être liées entre elles [97].

À la lumière de ces développements et des conséquences que l'induction d'un stress oxydant épидидymaire pourrait avoir sur les spermatozoïdes, une telle approche contraceptive a été abandonnée.

#### **Une autre piste abandonnée : interférer avec les capacités des spermatozoïdes à réguler leur volume**

Une des toutes premières observations d'une infertilité post-testiculaire a été le phénotype « Dag » du nom du taureau de la race Jersey affecté [98]. Les spermatozoïdes de cet animal présentaient une angulation caractéristique de 180° du flagelle à la jonction de la pièce intermédiaire et de la pièce principale. Un tel phénotype a ensuite été retrouvé chez de nombreux taureaux infertiles de différentes races ainsi que chez des verrats, des chiens et des étalons [99]. Le phénotype spermatique a été assez rapidement associé à des dysfonctions de l'épididyme et fut la première démonstration qu'une ou des altérations de la maturation épидидymaire pouvait résulter en une infertilité. Quelques vingt années plus tard, un phénotype similaire (spermatozoïdes angulés + infertilité) a été retrouvé dans plusieurs lignées de souris transgéniques invalidées pour des gènes exprimés dans la partie proximale de la tête de l'épididyme, le segment initial [99]. Ainsi, un dysfonctionnement dans le segment initial de la tête de l'épididyme résultait en une infertilité associée à des déficiences fonctionnelles des spermatozoïdes. L'exploration de ces modèles transgéniques a montré que l'angulation flagellaire découle de l'incapacité des spermatozoïdes à réguler leur volume dans des situations hypotoniques comme c'est le cas lors de l'éjaculation et lorsqu'ils arrivent dans les voies

génitales femelles. Le gonflement qui en résulte est à l'origine de tensions membranaires qui génèrent l'angulation [100]. Les spermatozoïdes, comme n'importe quelle cellule somatique, régulent leur volume par l'efflux d'osmolytes et d'eau associée à ces derniers. Donc, si dans les modèles évoqués ci-dessus les spermatozoïdes n'arrivent plus à réguler leur volume en situation hypotonique, c'est soit parce qu'ils sont exposés lors de leur transit dans l'épididyme déficient de ces animaux transgéniques à une situation hypotonique induisant la perte d'osmolytes, soit parce qu'ils ont une provision plus faible en ces osmolytes. L'osmolarité du fluide épидидymaire n'a pas été trouvée différente entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques. Par contre, le contenu en différents osmolytes classiques (carnitine, taurine, myo-inositol, glutamate) des spermatozoïdes des modèles transgéniques est réduit [101,102]. Ainsi, les provisions en osmolytes assurées lors de la descente des gamètes dans le tubule épидидymaire [103] sont amoindries dans les modèles transgéniques. L'idée a alors émergé que si l'on pouvait interférer avec l'apport épидидymaire d'osmolytes aux gamètes lors de leur maturation épидидymaire ou bloquer le relargage de ces osmolytes dans les situations hypotoniques auxquelles ils devront faire face, l'on pourrait éventuellement s'approcher du contexte « DAG » ou de celui rencontré dans les modèles murins transgéniques et ainsi induire une stérilité. En théorie, ceci peut être réalisé en : 1) bloquant la sécrétion épидидymaire d'osmolytes ; 2) bloquant l'import de ces osmolytes dans les gamètes ou ; 3) bloquant l'efflux de ces osmolytes hors des gamètes dans les situations hypotoniques post-éjaculation. Les analyses à grande échelle du transcriptome et du protéome épидидymaire n'ont pas permis de mettre à jour des enzymes et des transporteurs responsables de la sécrétion d'osmolytes qui soient spécifiques de l'épididyme qui auraient pu être ciblés pharmacologiquement. Par contre, concernant l'efflux d'osmolytes spermatiques dans des situations hypotoniques, plusieurs canaux pouvant médier l'export d'osmolytes ont été trouvés sur les spermatozoïdes d'espèces variées incluant l'homme [104]. Malgré le fait que des inhibiteurs spécifiques de ces canaux existent et qu'ils pourraient ainsi être de bons candidats pour une contraception post-testiculaire, aucun de ces inhibiteurs ne présente d'effets irréversibles ou suffisamment longs dans le temps pour répondre au critère d'efficacité requis. Cette voie de recherche qui semblait prometteuse à l'origine n'est plus au devant de la scène aujourd'hui.

## **Conclusions**

Bien que l'idée de cibler l'épididyme et les modifications qu'il induit sur les gamètes mâles pour le développement de nouvelles stratégies contraceptives post-testiculaires et non hormonales soit particulièrement attractive, il faudra

encore quelques années avant qu'un tel agent contraceptif soit sur le marché. L'idée est apparue tôt et a de solides fondements qui sont essentiellement : plus faible innocuité liée à l'absence d'interférence avec la fonction testiculaire et la régulation hormonale complexe de l'axe hypothalamogonadique, possibilité d'action plus rapide à la fois dans l'acquisition de la stérilité et la réversion de cette stérilité comparée au blocage de la spermatogenèse. Cependant, le manque de connaissances fondamentales sur la physiologie de l'épididyme des mammifères, la masse critique de la communauté scientifique internationale impliquée dans ce domaine et son corollaire, le faible niveau des financements académiques et privés pour soutenir les efforts des scientifiques et cliniciens ont considérablement freiné la progression des connaissances dans ce secteur [105]. Ces dix dernières années ont cependant apporté beaucoup de nouveautés à l'origine de pistes très prometteuses. Ceci a été rendu possible par l'arrivée des technologies d'investigation à grande échelle qui ont permis d'identifier le transcriptome et le protéome épididymaires des mammifères révélant ainsi un éventail de cibles contraceptives potentielles répondant aux critères de spécificité d'expression et de possible ciblage pharmacologique. Les progrès récents ont aussi été rendus possibles par l'impulsion donnée par la constitution de réseaux de recherche internationaux dans un partenariat public-privé unique. Pour mémoire, le réseau AMPPA « *Applied Molecular Pharmacology for Post-testicular Activity* » soutenu de 1999 à 2007 par la Fondation Rockefeller (New-York, États-Unis), la ESRF « *Ernst Schering Research Foundation* » (Berlin, Allemagne) et le CONRAD « *Contraceptive Research and Development* » (New-York, États-Unis) ont grandement stimulé et facilité les interactions entre chercheurs s'intéressant à l'épididyme et à ses fonctions en tant que cible contraceptive. Il est regrettable que de telles actions n'aient pas été plus pérennes et que l'industrie pharmaceutique se soit complètement détournée de ce secteur. Pourtant, la croissance démographique mondiale, le nombre alarmant de grossesses non désirées à l'échelle de la planète, le désir manifesté par les hommes de prendre une part plus active et de partager le contrôle de leur fertilité et la planification familiale [3,106] plaident pour une extension de l'offre contraceptive masculine.

À la vue des derniers développements présentés ci-dessus, il semble que l'immunocontraception avec cible spermatique d'acquisition post-testiculaire soit une des stratégies prisées. Les vaccins contraceptifs sont testés depuis de nombreuses années et ce à plusieurs niveaux puisqu'ils peuvent cibler la production des gamètes (vaccins contre LH/GnRH), les fonctions gamétiques (vaccins contre des antigènes spermatiques ou contre les protéines de la zone pellucide de l'ovule) ou indirectement le zygote fécondé (vaccin contre la hCG) (pour revue, voir : [107,108]). Néanmoins, quelques écueils demeurent quant à la variabilité interindi-

duelle des réponses immunes nécessitant le développement d'approches plus élaborées. Des solutions sont en ligne de mire avec : la sélection d'épitopes plus immuns sur les protéines ciblées, l'utilisation de cibles combinées, le développement d'anticorps synthétiques de type scFv « *single chain variable fragment antibodies* » [109,110] lesquels, dépourvus du fragment constant, minimisent certains versants de la réponse immuno-anticorps-dépendante.

Les approches pharmacologiques directes qui viseraient à inhiber des fonctions épididymaires de façon à rendre les gamètes non féconds sont toujours en attente. Seule EPPIN, abordée ci-dessus, offre à ce jour une alternative intéressante à l'immunocontraception, puisque des composés organiques, qui ont la capacité de bloquer un des sites d'action de la protéine (fixation de la séménogéline) résultant en une inhibition de la mobilité des gamètes, sont en cours d'étude [50].

**Conflit d'intérêt :** l'auteur déclare ne pas avoir de conflit d'intérêt.

## Références

- Fathalla MF (2001) The contraceptive technology revolution. In: Raff WK, Fathalla MF, Saad E (eds) *New pharmacological approaches to reproductive health and healthy aging*. Ernst Schering Research Foundation Workshop Supplement 8. Springer-Verlag, Berlin, pp 69-81
- Stock G, Habenicht UA (1999) Collaboration between industry and academia-prospects for male fertility control. *Int J Gynecol Obstet* 67:85-92
- Page ST, Amory JK, Bremner WJ (2008) Advances in male contraception. *Endocr Rev* 29:465-93
- Robaire B, Hinton BT (2002) *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 575
- Cummins JM, Orgebin-Crist MC (1971) Investigations into the fertility of epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 5:13-9
- Cornwall GA (2009) New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15: 213-27
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J (2007) Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 9:483-91
- Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, et al (2011) Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 13:395-405
- Saez F, Ouvrier A, Drevet JR (2011) Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl* 13:11-7
- Nobranc A, Kocer A, Chabory E, et al (2011) Glutathione peroxidases (GPx) at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *J Androl* 32:641-50
- Reyes A, Chavarria ME (1981) Interference with epididymal physiology as possible site of male contraception. *Arch Androl* 7:159-68
- Comhaire FH (1994) Male contraception: hormonal, mechanical and other. *Hum Reprod* 9:586-90



13. Cooper TG, Yeung CH (1999a) Approaches to post-testicular contraception. *Asian J Androl* 1:29–36
14. Cooper TG, Yeung CH (1999b) Recent biochemical approaches to post-meiotic testicular, epididymal contraception. *Hum Reprod update* 5:141–52
15. Wang C, Swerdloff RS (2002) Male contraception. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16:193–203
16. Cooper TG (2002) The epididymis as a target for male contraception. In: B. Robaire, BT Hinton (eds) *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 483–502
17. Khole V (2003) Epididymis as a target for contraception. *Indian J Exp Biol* 41:764–72
18. Sipilä P, Jalkanen J, Huhtaniemi IT, Poutanen M (2009) Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception. *Reproduction* 137:379–89
19. Jervis KM, Robaire B (2001) Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod* 65:696–703
20. Penttinen J, Pujianto DA, Sipilä P, et al (2003) Discovery in silico and characterization in vitro of novel genes exclusively expressed in the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 17:2138–51
21. Hsia N, Cornwall GA (2004) DNA microarray analysis of region-specific gene expression in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 70:448–57
22. Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, et al (2005) The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 73:404–13
23. Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F (2006) Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol* 250:36–42
24. Oh J, Lee J, Woo JM, et al (2006) Systematic identification and integrative analysis of novel genes expressed specifically or predominantly in mouse epididymis. *BMC Genomics* 7:314
25. Yuan H, Liu A, Zhang L, et al (2006) Proteomic profiling of regionalized proteins in rat epididymis indicates consistency between specialized distribution and protein functions. *J Proteome Res* 5:299–307
26. Zhang JS, Liu Q, Li YM, et al (2006) Genome-wide profiling of segmental-regulated transcriptomes in human epididymis using oligo microarray. *Mol Cell Endocrinol* 250:169–77
27. Sipilä P, Pujianto DA, Shariatmadari R, et al (2006) Differential endocrine regulation of genes enriched in initial segment and distal caput of the mouse epididymis as revealed by genome-wide expression profiling. *Biol Reprod* 75:240–51
28. Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, et al (2007) The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biol Reprod* 76:561–70
29. Thimon V, Koukoui O, Calvo E, Sullivan R (2007) Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. *Mol Hum Reprod* 13:691–704
30. Li JY, Wang HY, Liu J, et al (2008) Transcriptome analysis of a cDNA library from adult human epididymis. *DNA Res* 15:115–22
31. Li J, Liu F, Liu X, et al (2011) Mapping of the human testicular proteome and its relationship with that of the epididymis and spermatozoa. *Mol Cell Proteomics* 10:M110.004630
32. Kopf GS (2008) Approaches to the identification of new nonhormonal targets for male contraception. *Contraception* 78:S18–22
33. Mital P, Hinton BT, Dufour JM (2011) The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 84:851–8
34. Zhang XG, Xu Y, Qian SZ (1987) Injection of copper powder into epididymides via vas deferens on male fertility. *Adv Contracept Deliv Syst* 3:167–71
35. Skandhan KP (1988) Copper: a possible male contraceptive. *Adv Contracept Deliv Syst* 4:37–40
36. Fahim MS, Wang M, Sutcu MF, et al (1993) Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception* 47:107–22
37. Yeung CH, Cooper TG (1994) Study of the role of epididymal alpha-glucosidase in the fertility of male rats by the administration of the enzyme inhibitor castanospermine. *J Reprod Fertil* 102:401–10
38. Hamil KG, Sivashanmugan P, Richardson RT, et al (2000) HE2b and HE2g, new members of an epididymis-specific family of androgen-regulated proteins in human. *Endocrinol* 141:1245–53
39. Richardson RT, Sivashanmugan P, Hall SH, et al (2001) Cloning and sequencing of human *Eppin*: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene* 270:93–102
40. Ding X, Zhang J, Fei J, et al (2010) Variants of the EPPIN gene affect the risk of idiopathic male infertility in the Han-Chinese population. *Hum Reprod* 25:1657–65
41. Denolet E, De Gendt K, Allemeersch J, et al (2006) The effect of a Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol Endocrinol* 20:321–34
42. Schauwaers K, De Gendt K, Saunders PTK, et al (2007) Loss of androgen receptor binding to selective androgen response elements causes a reproductive phenotype in a knocking mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4961–6
43. Willems De Gendt K, Allemeersch J, et al (2009) Early effects of Sertoli cell-selective androgen receptor ablation on testicular gene expression. *Int J Androl* 38:507–17
44. Yenugu S, Richardson RT, Sivashanmugan P, et al (2004) Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen regulated sperm bound protein with a whey acidic protein motif. *Biol Reprod* 71:1484–90
45. Wang Z, Widren EE, Sivashanmugan P, et al (2005) Association of EPPIN with semenogelin on human spermatozoa. *Biol Reprod* 72:1064–70
46. Wang Z, Widgren EE, Richardson RT, O’Rand MG (2007a) EPPIN: a molecular strategy for male contraception. In: Roldan E, Gomendio M (eds). *Spermatology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. *Soc Reprod Fert Supplement* 65:535–42
47. O’Rand MG, Widgren EE, Wang Z, Richardson RT (2006) EPPIN: an effective target for male contraception. *Mol Cell Endocrinol* 250:157–62
48. Wang Z, Widgren EE, Richardson RT, O’Rand MG (2007) Characterization of an EPPIN protein complex from human semen and spermatozoa. *Biol Reprod* 77:476–84
49. Mitra A, Richardson RT, O’Rand MG (2010) Analysis of recombinant human semenogelin as an inhibitor of human sperm motility. *Biol Reprod* 82:489–98
50. O’Rand MG, Widgren EE, Hamil KG, et al (2011) Epididymal protein targets: a brief history of the development of EPPIN as a contraceptive. *J Androl* 32:698–704
51. O’Rand MG, Widgren EE, Sivashanmugan P, et al (2004) Reversible immuno-contraception in male monkeys immunized with EPPIN. *Science* 306:1189–90
52. O’Rand MG, Widgren EE, Beyler S, Richardson RT (2009) Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-EPPIN antibodies from infertile male monkeys: effect on cAMP. *Biol Reprod* 80:279–85
53. Eberspaecher U, Roosterman D, Kratzschmar J, et al (1995) Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Mol Reprod Dev* 42:157–72
54. Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M (2005) Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol Reprod* 72:1268–74

55. Mizuki N, Sarapata DE, Garcia-Sanz JA, Kasahara M (1992) The mouse male germ cell-specific gene *Tpx-1*: molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm Genome* 3:274–80
56. Haendler B, Kratzschmar J, Theuring F, Schleuning WD (1993) Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology* 133:192–8
57. Morissette J, Kratzschmar J, Haendler B, et al (1995) Primary structure and properties of heliothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. *Biophys J* 68:2280–8
58. Yamazaki Y, Morita T (2004) Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicol* 44:27–31
59. Guo M, Teng M, Niu L, et al (2005) Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein STECRISP reveals that the cysteine-rich domain has a K<sup>+</sup> channel inhibitor-loke fold. *J Biol Chem* 280:12405–12
60. Roberts KP, Ensrud KM, Wooters JL, et al (2006) Epididymal secreted protein CRISP1 and sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 250:122–7
61. Udby L, Bjartell A, Malm J, et al (2005) Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J Androl* 26:333–42
62. Cohen DJ, Da Ros VG, Busso D, et al (2007) Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. *Asian J Androl* 9:528–32
63. Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM, Hamilton DW (2003) Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod* 69:572–81
64. Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, et al (2007) A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod* 77:848–54
65. Ellerman DA, Busso D, Maldera JA, Cuasnicú PS (2008) Immun contraceptive properties of recombinant sperm protein DE: implications for the development of novel contraceptives. *Fertil Steril* 89:199–205
66. Ellerman DA, Cohen DJ, Weigel Muñoz M, et al (2010) Immunologic behavior of human cysteine-rich secretory protein 1 (hCRISP1) in primates: prospects for immun contraception. *Fertil Steril* 93:2551–6
67. Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, et al (2008) Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol* 320:12–8
68. Cohen DJ, Maldera JA, Vasen G, et al (2011) Epididymal Protein CRISP1 Plays Different Roles During the Fertilization Process. *J Androl* 32:672–8
69. Boué F, Blais J, Sullivan R (1996) Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* 54:1009–17
70. Légaré C, Gaudreault C, St-Jacques S, Sullivan R (1999) P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology* 140:3318–27
71. Boué F, Sullivan R (1996) Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. *Biol Reprod* 54:1018–24
72. Moskovtsev SI, Jarvi K, Légaré C, et al (2007) Epididymal P34H protein deficiency in men evaluated for infertility. *Fertil Steril* 88:1455–7
73. Sullivan R, Légaré C, Villeneuve M, et al (2006) Levels of P34H, a sperm protein of epididymal origin, as a predictor of conventional in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 85:1557–9
74. Gaudreault C, Montfort L, Sullivan R (2002) Effect of immunization of hamsters against recombinant P26h on fertility rates. *Reproduction* 123:307–13
75. Dubé E, Legaré C, Gaudreault C, Sullivan R (2005) Contraceptive responses of female hamsters immunized with recombinant sperm protein P26h. *Contraception* 72:459–67
76. Khan SA, Suryawanshi AR, Ranpura SA, et al (2009) Identification of novel immuno-dominant epididymal sperm proteins using combinatorial approach. *Reproduction* 138:81–93
77. Khan SA, Jadhav SV, Suryawanshi AR, et al (2011) Evaluation of contraceptive potential of a novel epididymal sperm protein SFP2 in a mouse model. *Am J Reprod Immunol* 66:185–98
78. Jones R, Mann T, Sherins RJ (1978) Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proc R Soc Lond B* 201:413–7
79. Jones R, Mann T, Sherins RJ (1979) Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531–7
80. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 8:338–48
81. Aitken RJ, Clarkson JS (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. The Walpole Lecture. *J Reprod Fertil* 83:459–69
82. Aitken RJ, Fisher H (1994) Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays* 16:259–68
83. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998) Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malonyldialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl* 21:81–94
84. Sharma RK, Agarwal A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48:835–50
85. Aitken RJ (1999) The human spermatozoa-a cell in crisis? The Amoroso Lecture. *J Reprod Fertil* 115:1–7
86. Aitken RJ (2004) Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruit of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev* 16:655–64
87. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 40:183–97
88. Suleiman SA, Elamin AM, Zaki ZMS, et al (1996) Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 17:530–7
89. MacLeod J (1943) The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 138:512–8
90. Aitken RJ (2002) Active oxygen in spermatozoa during epididymal transit. In: Robaire B, Hinton BT (Eds), *The epididymis from molecules to clinical practice*. Plenum Press, New York, pp 325–8
91. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D (1993) Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation and human sperm function. *J Reprod Fertil* 98:257–65
92. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D (1993) Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 35:302–15
93. Drevet JR (2011) Protection of epididymal spermatozoa from oxidative stress. In: Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG (eds) *Studies on men's health and fertility- Oxidative stress in applied basic research and clinical practice*. Springer, New York. In press
94. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59:1037–46
95. Chabory E, Damon C, Lenoir A, et al (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 (GPx5) contributes to the maintenance of sperm DNA integrity. *J Clin Invest* 119:2074–85
96. Aitken RJ (2009) GPx5 protects the family jewels. *J Clin Invest* 119:1849–51
97. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE (2004) Seeds of concern. *Nature* 432:48–52

98. Vogt PH (2005) Azoospermia factor (AZF) in Yd11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 10:81–93
99. Aitken RJ, Krausz C (2001) Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122:497–506
100. Blom E (1966) A new sterilizing and hereditary defect (the « DAG defect ») located in the bull sperm tail. *Nature* 209:739–40
101. Cooper TG, Barfield JP (2006) Utility of infertile male models for contraception and conservation. *Mol Cell Endocrinol* 250:206–11
102. Yeung CH, Anapolski M, Cooper TG (2002) Measurement of volume changes in mouse spermatozoa using an electronic sizing analyzer and a flow cytometer: validation and application to an infertile mouse model. *J Androl* 23:522–8
103. Xu YX, Wagenfeld A, Yeung CH, et al (2003) Expression and location of the taurine transporter in the epididymis of infertile c-ros receptor tyrosine kinase-deficient and fertile heterozygous mice. *Mol Reprod Dev* 64:144–51
104. Yeung CH, Anapolski M, Setiawan I et al (2004) Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile c-ros transgenic mice. *J Androl* 25:216–23
105. Jeulin C, Lewin LM (1996) Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2:87–102
106. Martin CW, Anderson RA, Cheng L, et al (2000) Potential impact of hormonal male contraception: cross-cultural implications for development of novel preparations. *Hum Reprod* 15:637–45
107. Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG (2006) Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 250:98–105
108. Turner TT (2011) Looking to the Future of Epididymal Research: Why This, Why Now? *J Androl* 32:705–10
109. Naz RK, Gupta SK, Gupta JC, et al (2005) Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. *Hum Reprod* 20:3271–83
110. Naz RK (2009) Development of genetically engineered human sperm immuno-contraceptives. *J Reprod Immunol* 83:145–50

## Sign up for SpringerAlerts

The best way to keep you up-to-date with new developments in your field!

You can customize your SpringerAlerts to deliver exactly the information you need!

We offer

- ▶ Table of Contents Alerts for Journals
- ▶ Table of Contents Alerts for Book Series
- ▶ New Book Alert

As an alerts subscriber, you will receive

- ▶ Reliable news about journals and upcoming books
- ▶ Special offers – be the first to know about free online access to journals and discounts on books

[springer.com/alerts](http://springer.com/alerts) – fast, free and flexible

