

Liste des abréviations :

ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease Domain
α -Glc	α glucose
	α -Man α mannose
β Gal	β Galactose
	BSA Bovine Serum Albumin
	CAM Cell Adhesion Molecules
	CPMV Virus de la Mosaique de la Dolique
CYRN	Cyritestin
FPV	Fowl Pox Virus (Pox virus de Dinde)
FSH	Follicle Stimulating Hormon
GalTase	Galactosyltranférase
GALT	tissus lymphoïdes associés aux ganglions lymphatiques
GlcNAc	N Acétyl glucose
GMQ	Gain moyen quotidien
GnRH	Gonadolibérine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IFN- γ	Interféron γ
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ISCOMS	Immune Stimulating Complexes
	LH Luteinizing Hormon
MALT	Muqueuse associée aux tissus lymphoïdes
mZP3	ZP3 murine
pZP3	ZP3 porcine
RA	Réaction Acrosomique
rVV	Virus de la vaccine recombinant
Th	Cellule T helper
TH2	Cellule T Helper de type 2
TMV	Virus de la Mosaique du Tabac
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
WGA	Wheat Germ Agglutinin
ZP	Zone Pellucide

« Il aimait les animaux,
comme tous ceux dont l'orgueil est
trop grand pour s'accomoder des
hommes. » Malraux A. *La condition
humaine.*

A mes parents et Caro.
Je vous aime et vous dois tout.

A toute ma famille, mes grands parents en particulier, pour les valeurs qu'ils m'ont transmises.

A Seb, l'Anda.

A Cédric, mon Ami.

A Cécile, mon Amour.

Merci pour tout l'amour que vous m'offrez chaque jour.

Mécanismes physiologiques de la fécondation

La régulation des fonctions gonadiques :

Hypothalamus

GnRH

Hypophyse

FSH et LH

Gonades

Spermatogénèse chez le mâle
Folliculogénèse chez la femelle

La fécondation

Capacitation des spermatozoïdes

Fixation primaire par la GalTase sur la ZP3

Fixation secondaire par les CAM sur la ZP2
(PH-20)

Induction de la réaction acrosomique
(récepteur spermatique sp56 ou sp 95)

Réaction acrosomique
(Hyaluronidase, β -N-acétylglucosidase, acrosine)

Reconnaissance et fusion membranaires
(PH-30)

Antigènes candidats pour l'immunocontraception

- **GnRH** : Intérêt chez le mâle et la femelle
- **Antigènes basés sur les spermatozoïdes** : (cobaye = écureuil gris)

Sélection de l'antigène :

- jouer un rôle clef dans le processus de fécondation
- être spécifique des spermatozoïdes et ne pas être exprimé au sein des tissus somatiques
- composant de la surface externe du gamète
- hautement immunogène ou pouvoir le devenir après manipulation
- le gène codant pour l'antigène doit pouvoir supporter des manipulations moléculaires

- **Antigènes de la zone pellucide** :

Chez la truie : les oligosaccharides N-liés de ZP3 α
et une petite partie de ZP3 β

A l'heure actuelle on utilise l'intégralité de la protéine ZP3 porcine

Réponse immunitaire:

Deux problèmes :

- Effets secondaires
- Faiblement immunogène

Antigène brut :

- hautement immunogène mais nombreux effets secondaires
- Influence de la pureté, dose, durée
- Epitopes induisant une réponse des cellules T à la surface de la ZP

Antigène purifié : faiblement immunogène

Stratégies pour augmenter la réponse immunitaire :

- Stimulation du système immunitaire local génital
- Nécessité d'adjuvants pour arriver à un titre élevé en anticorps

Cytokines : détermine à la fois le type et l'amplitude de la réponse immunitaire (RI 5 à 10 fois plus élevée)

Cytokines de types 2 sécrétées par les cellules Th2 :

IL-4 : facteur d'orientation de la RI

IL-5 et IL-6 : jouent un rôle important dans l'activation antigénique des cellules B productrices d'IgA au niveau local

Résultats actuels

GnRH :

- faible pouvoir immunogène
- variations individuelles
- application pratique paraît actuellement difficile
- adjuvants
- protéines porteuses

PH-20 :

- Efficacité chez le mâle et la femelle
- Immunisation réversible et sans effets secondaires
- Inefficace chez le lapin

pZP3 :

- Absence de spécificité d'espèce
- Efficacité / sécurité sur le long terme
(Kirkpatrick, 1995)

Intérêts et perspectives de l'immunocontraception

Chez les animaux de compagnie : Intérêt limité pour PH-20 et pZP

Chez les animaux de rente :

- diminution de l'odeur sui generis des carcasses de verrat
- réduire le comportement agressif des animaux pour la mise en lot
- Amélioration de la qualité de la viande

Gestion de la faune sauvage :

Aucune alternative actuelle

Choix de la voie d'administration :

- utilisation de la voie injectable
- utilisation de microorganismes infectieux recombinants
- utilisation de vaccins immunocontraceptifs par voie orale : systèmes viraux végétaux recombinants/ plantes transgéniques

Introduction :

Modes de contraception actuels :

chimique

chirurgicale

Définition immunocontraception

Conclusion :

- Résultats encourageants
- Pas applicable à court terme
- Nombreux débouchés

L'immunocontraception chez l'animal

Thèse

pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

par

Philippe, Pierre, Jacques JACQUEMAIN

Table des matières

<u>I Mécanismes physiologiques de la fécondation.</u>	p.4
A. <u>La régulation des fonctions gonadiques.</u>	p.4
B. <u>La fécondation.</u>	p.5
1. <u>La capacitation.</u>	p.5
2. <u>Reconnaissance-fixation primaire du spermatozoïde à la zone pellucide.</u>	p.6
3. <u>Biologie de la zone pellucide.</u>	p.8
4. <u>Reconnaissance-fixation secondaire du spermatozoïde à la ZP.</u>	p.11
5. <u>La double fixation.</u>	p.14
6. <u>La réaction acrosomique.</u>	p.14
7. <u>Reconnaissance membranaire et fusion.</u>	p.16
8. <u>Activation du zygote.</u>	p.19
<u>II Les différents antigènes candidats pour l'immunocontraception.</u>	p.21
A. <u>Antigène basé sur la gonadolibérine.</u>	p.21
B. <u>Antigènes basés sur les spermatozoïdes.</u>	p.22
1. <u>Molécules de reconnaissance et de fixation.</u>	p.22
2. <u>Récepteurs spermatiques induisant la réaction acrosomique.</u>	p.23
C. <u>Antigènes de la zone pellucide.</u>	p.28
1. <u>Influence du degré de glycosylation, sulfonylation et sialylation des oligosaccharides de la zone pellucide.</u>	p.28
2. <u>ZP3 α et β chez la truie.</u>	p.29
3. <u>Rôle des D mannose et D fructose.</u>	p.31
D. <u>Choix de l'antigène pour éviter les effets secondaires.</u>	p.33
<u>III Réponse immunitaire induite.</u>	p.36
A. <u>Rôle de l'immunisation dans le contrôle de la fécondité.</u>	p.36
1. <u>Organisation du système immunitaire local au niveau du tractus génital.</u>	p.37
2. <u>Par quelle voie stimuler le système immunitaire local génital.</u>	p.38
B. <u>Amélioration de la réponse immunitaire par les cytokines.</u>	p.39
1. <u>Réponse au niveau local et/ou systémique.</u>	p.41
2. <u>Rôle des cytokines de type 2.</u>	p.43
C. <u>Voie d'administration de l'antigène et adjuvants.</u>	p.44

D. <u>Résultats immunologiques actuels de l'immunocontraception.</u>	p.49
<u>IV Mécanismes de l'immunocontraception.</u>	p.57
A. <u>Mécanismes de l'immunocontraception anti-GnRH.</u>	p.57
B. <u>Mécanismes de l'immunocontraception anti-PH-20.</u>	p.57
C. <u>Mécanismes de l'immunocontraception anti-pZP3.</u>	p.59
1. <u>Induction d'une réponse en IgG.</u>	p.61
2. <u>Site d'action des anticorps IgG.</u>	p.61
3. <u>Modification de la surface de l'épitope suite à la liaison Ag-Ac.</u>	p.62
4. <u>Absence de spécificité d'espèce de l'immunité anti-ZP.</u>	p.63
<u>V Résultats expérimentaux actuels de l'immunocontraception.</u>	p.64
A. <u>Protocoles d'immunocontraception.</u>	p.64
1. <u>Immunocontraception anti-gonadolibérine.</u>	p.64
2. <u>Immunocontraception anti-PH-20.</u>	p.66
3. <u>Immunocontraception anti-pZP.</u>	p.67
B. <u>Résultats.</u>	p.67
1. <u>Immunocontraception anti-gonadolibérine.</u>	p.67
2. <u>Immunocontraception anti-PH-20.</u>	p.74
3. <u>Immunocontraception anti-pZP.</u>	p.77
C. <u>Discussion.</u>	p.78
1. <u>Immunocontraception anti-gonadolibérine.</u>	p.78
2. <u>Immunocontraception anti-PH-20.</u>	p.82
3. <u>Immunocontraception anti-pZP.</u>	p.83
<u>VI Intérêts et perspectives de l'immunocontraception.</u>	p.84
A. <u>Intérêt de l'immunocontraception chez les animaux de compagnie.</u>	p.84
B. <u>Intérêt de l'immunocontraception chez les animaux de rente.</u>	p.85
C. <u>Perspectives de l'immunocontraception comme outils de gestion de la faune sauvage.</u>	
1. <u>Perspective historique.</u>	p.88
2. <u>Technologie de l'immunocontraception appliquée au contrôle de la faune sauvage.</u>	p.88
3. <u>Intérêt potentiel de l'immunocontraception pour la gestion de la faune sauvage et choix de la voie d'administration.</u>	p.89
Conclusion	p.98

Si la contraception est un thème largement abordé en médecine humaine, la maîtrise de la fonction génitale est également un motif de consultation fréquent en médecine vétérinaire. L'objectif peut être soit d'empêcher la reproduction, soit de supprimer la synthèse de stéroïdes, en raison de leurs effets sur les tumeurs, les carcasses et le comportement. Ainsi, chez les carnivores de compagnie, on cherche à limiter leur prolificité importante ou à éviter les désagréments de la période des chaleurs. On veut également limiter la survenue de tumeurs hormono dépendantes, très fréquentes dans le tissu mammaire. Chez l'animal de production, principalement chez les mâles ou les animaux de réforme, on cherche à optimiser le rendement en viande des carcasses ou à en diminuer une odeur qui les rendent non consommables (chez le verrat). Enfin, on aimerait pouvoir contrôler certaines populations sauvages qui causent parfois des désagréments en déséquilibrant un biotope.

A l'heure actuelle, deux modes de contraception sont classiquement utilisés :

- La contraception chimique est, chez l'animal, beaucoup moins bien maîtrisée que chez l'homme et ne peut constituer qu'un mode de contraception temporaire à cause de ses effets secondaires, principalement cancérogènes.
- La contraception chirurgicale est particulièrement efficace mais irréversible et inutilisable sur les animaux sauvages.

Ainsi l'immunocontraception, si elle peut être efficace sans effets secondaires, de manière réversible et à grande échelle, constituerait à l'évidence un mode de contraception particulièrement adapté à l'animal et représenterait une alternative intéressante aux méthodes actuelles.

Nous entendrons dans cette thèse par « immunocontraception », le fait d'empêcher la fécondation par la vaccination. La mise au point de l'immunocontraception nécessite avant tout de déterminer un antigène, indispensable à la fécondation, cible de la contraception. A l'heure actuelle, différentes voies de recherche sont exploitées. La voie la plus prometteuse utilise la glycoprotéine de la zone pellucide ZP3 de l'ovocyte ; cependant, l'immunisation active anti-gonadolibérine et le développement de vaccins immunocontraceptifs basés sur des antigènes de spermatozoïdes constituent d'autres voies de recherche. Dans la première partie de cette thèse, nous présenterons les mécanismes physiologiques de la fécondation. La seconde partie s'intéressera aux antigènes candidats à l'immunocontraception, avant d'envisager dans un troisième temps les différentes réponses immunitaires induites, puis dans une quatrième partie les mécanismes de l'immunocontraception. Nous exposerons enfin les résultats actuels de la vaccination, avant d'aborder les intérêts et les perspectives de l'immunocontraception.

I Mécanismes physiologiques de la fécondation.

Il existe dans la littérature plusieurs milliers de références sur la fécondation dont près de 2000 pour les seuls mammifères, c'est dire qu'un effort considérable de recherche a été fait depuis plus d'un siècle pour décrire la fécondation et comprendre les mécanismes qui aboutissent à la formation d'un zygote, étape initiale dans le développement d'un nouvel être. Les connaissances concernant l'ovulation et les événements cytologiques de la fécondation se sont accrues avec l'arrivée de la microscopie électronique et confocale. A partir des années 80, les études biochimiques et moléculaires ont permis de pénétrer dans les mécanismes et d'identifier le rôle de chacun des deux gamètes.

Quatre étapes ont été mises en évidence :

- l'acquisition de la fécondance du spermatozoïde éjaculé, ou capacitation ;
- la reconnaissance spécifique par le spermatozoïde de l'enveloppe protectrice de l'ovocyte, la zone pellucide, suivie de son franchissement ;
- l'attachement des membranes plasmiques des deux gamètes puis leur fusion qui introduit le spermatozoïde dans l'ovocyte ;
- l'activation du zygote, c'est-à-dire l'induction du premier cycle cellulaire qui permet l'enchaînement des premières divisions cellulaires.

Il n'existe pas d'étude approfondie sur l'ensemble de ces étapes dans une seule espèce. Cependant le rapprochement des connaissances permet de dégager des mécanismes généraux.

La fécondation nécessite la mise en présence puis la reconnaissance et l'attachement du gamète mâle au gamète femelle mais avant tout, il convient de s'intéresser à la formation initiale des gamètes, à savoir l'obtention de spermatozoïdes chez le mâle et d'un ovocyte chez la femelle.

A. La régulation des fonctions gonadiques.

La régulation des fonctions gonadiques peut être interprétée, en première analyse, comme résultant d'un contrôle exercé par l'axe hypothalamo-hypophysaire sur les gonades. En réalité on constate vite que les schémas régulateurs sont plus complexes, d'une part du fait des rétro-contrôles qui s'exercent aussi sur l'hypothalamus, et d'autre part du fait de l'existence de mécanismes indépendants du système hypothalamo-hypophysaire, impliquant l'appareil génital lui-même.

L'hypothalamus du mâle comme celui de la femelle contrôle la libération et la sécrétion de la lutéotropine (Luteinizing Hormon = LH) et de la folliculotropine (Follicle Stimulating Hormon = FSH) hypophysaires par l'intermédiaire d'un décapeptide, la gonadolibérine (Gonadotropin Releasing Hormon = GnRH), déversée dans les vaisseaux du système porte hypophysaire. Ce peptide est identique chez tous les mammifères. Il fut isolé en 1971 et est constitué de dix aminoacides. Sa séquence est la suivante :

P_{Glu}-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (P_{Glu} = pyroglutamine)

Quelques variantes existent chez les oiseaux et les vertébrés inférieurs, mais les aminoacides 1, 2, 4, 9 et 10 sont constants, le segment 3-7 peu variable (Brugère, cours ENVA 2000).

La liaison de la gonadolibérine aux cellules gonadotropes antéhypophysaires a pour conséquence la libération des hormones stockées, immédiatement disponibles, puis, après un temps de latence, la décharge des hormones synthétisées sous l'action de cette même gonadolibérine. La GnRH est donc un facteur de libération et de synthèse de FSH et LH hormones gonadotropes qui permettent les fonctions endocrines et exocrines normales des gonades.

La GnRH, via FSH et LH, est responsable de la spermatogenèse chez le mâle : la LH stimule les cellules de Leydig, elles-mêmes à l'origine de la sécrétion de testostérone responsable de la spermatogenèse.

Chez la femelle, la GnRH stimule la FSH, à l'origine du recrutement et de la croissance folliculaire puis de la sélection du follicule dominant, et la LH, dont le pic détermine le moment de l'ovulation.

B. La fécondation.

1. La capacitation.

Avant même la réunion des gamètes, le spermatozoïde doit réaliser un séjour dans les voies génitales femelles pour exprimer sa fécondance. Il y subit une transformation appelée capacitation (Yanagimachi, 1994). C'est essentiellement par l'enlèvement de protéines déposées sur la membrane du spermatozoïde dans l'épididyme ou/et apportées par les glandes annexes et la perte d'une partie du cholestérol intercalé entre les phospholipides membranaires, que le spermatozoïde devient capacité.

2. Reconnaissance - Fixation primaire du spermatozoïde à la zone pellucide.

La reconnaissance spécifique entre gamètes ne met pas en jeu des mécanismes fondamentalement originaux.

Dans beaucoup d'organes, des cellules, pour vivre et se différencier, doivent se fixer sur des lames basales composées de quelques protéines caractéristiques secrétées par les cellules elles-mêmes ; c'est le cas de la cellule de Sertoli qui s'attache à la laminine de la membrane basale du tube séminifère ou des cellules sécrétrices mammaires lors de la formation des acinis sur la lame basale qui les entoure. Pour certaines cellules (cellules neurales, fibroblastes), le système de liaison est connu, c'est une enzyme, la galactosyltransférase (GalTase) qui se fixe à son substrat, les chaînes N-oligosaccharidiques de la laminine ou celles de matrices extracellulaires. Quand la partie intracytoplasmique de la GalTase est lié au cytosquelette de la cellule, la fixation permet également la migration (figure 1) (Thibault, 2000).

Par ailleurs, la fixation entre cellules met en jeu des molécules appelées CAM (Cell Adhésion Molecules) qui ont la caractéristique de se fixer à la membrane plasmique grâce à une liaison covalente avec le glycosylphosphatidylinositol (GPI).

La fixation du spermatozoïde à la zone pellucide fait appel conjointement à ces deux systèmes. La reconnaissance de la zone pellucide (ZP) par le spermatozoïde et/ou sa fixation sont assurées chez la souris et la plupart des mammifères par une galactosyltransférase, ancrée dans la membrane plasmique périacrosomique du spermatozoïde. Cette GalTase se fixe à une chaîne oligosaccharidique de l'une des glycoprotéines de la zone pellucide, la ZP3. La chaîne peptidique de la ZP3 porte des chaînes N-oligosaccharidiques liées à une asparagine et des chaînes O-oligosaccharidiques liées à une sérine/thréonine. Ce seraient ces dernières qui seraient impliquées dans la liaison avec le spermatozoïde (Barber et al., 2000).

Les zones pellucides des autres mammifères étudiés possèdent toutes des molécules de la même famille que la ZP3, présentant de fortes homologies (67-81 % entre souris, hamster, ouistiti et homme). Des mécanismes de fixation analogues peuvent donc exister. Effectivement, une GalTase membranaire a été identifiée sur les spermatozoïdes de taureau, d'étalon, de lapin, de verrat et d'homme.

Il convient donc de décrire la biologie de cette zone pellucide ainsi que le rôle exact des glucides dans la fécondation.

Figure 1 : **A.** Fixation du spermatozoïde à la partie oligosaccharidique de la ZP3 (ZP3-OS) par sa galactosyltransférase (GalT). **B.** Analogie avec la fixation du fibroblaste sur la laminine (la) d'une lame basale. La migration implique que la queue cytoplasmique de la GalT se fixe progressivement au cytosquelette(Cyt).**C.**La fixation progressive de toute la surface antérieure de la tête du spermatozoïde (vue de profil) fait qu'il ne migre pas mais se couche sur la zone pellucide. Des récepteurs spermatiques fixent la partie protéique de la ZP3 (ZP3-Pr) ce qui entraîne la réaction acrosomique. Les membranes acrosomique externe et plasmique fusionnent ponctuellement formant une collerette qui glisse jusqu'à la pièce intermédiaire. Des enzymes acrosomiques coupent localement les liaisons des protéines ZP1 et ZP2-ZP3 facilitant ainsi la pénétration du spermatozoïde (Shur et al., 1982 ;Miller et al.,1993)

3. Biologie de la zone pellucide.

La zone pellucide est une matrice extra cellulaire qui entoure tous les ovocytes de mammifères, protège l'ovocyte, permet la fécondation, puis protège l'embryon jusqu'à l'éclosion (Wolgemuth et al., 1984). La zone pellucide présente trois glycoprotéines majeures conventionnellement appelées ZP1, ZP2 et ZP3. Ces glycoprotéines ont également été appelées ZPA, ZPB et ZPC (Harris et al., 1994). Cette nomenclature fait référence aux classes majeures de gènes et a été définie par la taille des ARN messagers (= taille de l'ADN complémentaire), ZPA est le plus gros et ZPC le plus petit. Ces glycoprotéines présentent un poids moléculaire variable selon les espèces, celui de ZP1 variant de 80 à 200kDa, celui de ZP2 de 50 à 120 kDa, et celui de ZP3 de 45 à 110 kDa. Chez la truie, ces trois glycoprotéines sont appelées ZP1, ZP3 α et ZP3 β (Hasegawa et al., 1994). La zone pellucide apparaît initialement quand les cellules de la granulosa entourant le follicule passent de l'état de cellules squameuses à l'état de cellules cuboïdales (Guraya, 1974), et la croissance de la zone pellucide correspond exactement à la croissance de l'ovocyte. La surface adjacente des cellules de la granulosa à l'ovocyte présente des microvillosités (Baca et Zamboni, 1967) et des jonctions serrées (gap junctions) prennent place entre les microvillosités des cellules de la granulosa et l'ovocyte. Chez la vache, les jonctions serrées se forment lors du passage de follicule primaire au follicule secondaire. Ces jonctions serrées semblent nécessaires à la croissance de l'ovocyte en permettant l'apport de métabolites et d'autres nutriments à l'ovocyte (Schultz, 1986 ; Wasserman et Albertini, 1994 ; Wasserman et al., 1996). La ZP remplit l'espace entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa, et constitue une membrane perméable et sélective qui a des fonctions structurales vis-à-vis de l'ovocyte (Sellens et Jenkinson, 1975). La microscopie photonique et la microscopie électronique ont démontré que la ZP des mammifères présente différentes couches ayant respectivement des propriétés physiques et biochimiques. Un ovocyte préovulatoire présentant une zone pellucide à deux couches a été observé chez le cheval, la couche externe étant plus épaisse que la couche interne (Vogelsang et al., 1987). La microscopie en lumière polarisée de la ZP du hamster a révélé une structure multilaminaire dans laquelle les filaments de la couche externe sont orientés tangentiellement et ceux de la couche interne radialement (Keffe et al., 1997).

Les glycoprotéines ZP interviennent d'une part dans la structure de la zone pellucide. Chez la truie, la première famille de glycoprotéines de la zone pellucide (pZP1) est responsable de l'intégrité structurale de la matrice des cellules périovocytaires (cumulus oophorus) (Dunbar et Bundman, 1987) et chez la souris, la dimérisation de ZP2 et ZP3 est



nécessaire pour établir l'intégrité structurale de la zone pellucide (Wasserman et al., 1996). D'autre part, les chaînes oligosaccharidiques de la ZP jouent un rôle dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte à la fois chez les mammifères et les invertébrés.

Les lectines ont été utilisées pour caractériser la formation des chaînes oligosaccharidiques au niveau de la zone pellucide dans de nombreuses espèces comprenant la souris (Wu et al., 1984), le rat (Aviles et al., 1994) et la truie (Dunbar et Bundman, 1987). Les lectines sont des protéines de liaison à des sucres d'origine non immunitaire qui agglutinent les cellules et/ou précipitent les glycoconjugués qui présentent des saccharides complémentaires appropriés (Goldstein et al., 1980). La réactivité des glucides de la zone pellucide aux lectines est variable selon l'espèce. Ainsi, Skutelsky et al. (1994) ont démontré que la distribution des glucides de la zone pellucide est différente entre les lapins, les chats, les chiens, les porcins, et suggèrent que ces différences seraient impliquées dans la spécificité d'espèce de la fécondation. Ils ont démontré que la ZP du chien présente en périphérie les glucides suivants : un résidu α glucose (α -Glc), un résidu α mannose (α -Man), un acide sialique et /ou un résidu glucose GlcNAc (N Acétyl glucose). La ZP du chat possède un résidu β galactose (β -Gal). De nombreuses études ont été réalisées pour explorer la mise en place des glucides de la zone pellucide chez le chien, le chat et l'éléphant (Barber et al., 1999). En utilisant un large panel de lectines, il a été démontré que les zones pellucides de chien (Skutelsky et al., 1994), de chat (Skutelsky et al., 1994) et d'éléphant possèdent toutes une terminaison Gal- β (1,4), une terminaison Gal- β (1,3)-GalNAc, et un résidu à noyau fucosyl. Le principal sucre qui différencie ces espèces est l'acide sialique : le chat présente une liaison à l'acide sialique de type α -2,6, le chien présente une liaison α -2,3, et l'éléphant présente les deux types de liaison. Alors que chez la souris on suggère que la bioactivité de la glycoprotéine mZP3 (récepteur primaire du spermatozoïde chez la souris) ne nécessite pas d'acide sialique (Liu et al., 1997). L'acide sialique a également été mis en évidence dans la ZP humaine (Barshira Maymon et al., 1994). Des différences de réactivité aux lectines ont également été mises en évidence entre les ZP de chèvre, de brebis et de truie (Parillo et al., 1996). Ces études suggèrent également que les différences de glycosilation des glycoprotéines de la ZP entre espèces peuvent jouer un rôle dans la spécificité d'espèce de la fécondation.

D'autre part, les travaux avec les lectines montrent que le stade de l'ovocyte influence la nature des glucides présents sur la ZP. Shagi et al. (1991) ont montré que les glucides de la ZP du rat sont différents entre l'ovocyte intra folliculaire (ovocyte retiré chirurgicalement des follicules) et l'ovocyte après ovulation. L'ovocyte folliculaire est reconnu par seulement trois lectines, contrairement à l'ovocyte post-ovulatoire qui est reconnu par huit lectines. On ne sait

pas si ce changement est dû à l'environnement endocrinien particulier au moment de la fécondation ou à l'incorporation de glycoprotéines de l'oviducte. La distribution des β -Gal de la ZP d'un ovocyte de rat est également modifiée suite à la fécondation. Cela peut suggérer l'implication des β -Gal dans le blocage de la polyspermie (Raz et al., 1996).

L'hypothèse selon laquelle les glucides jouent un rôle dans la fécondation a été confirmée par les recherches de Segall et Lennarz (1979). Bien que le processus de la fécondation diffère entre les différentes espèces, il y a une conservation universelle du rôle des glucides dans l'interaction ovocyte-spermatozoïde.

Chez la souris, il a été suggéré que les oligosaccharides O-liés sur les glycoprotéines mZP3 étaient les récepteurs primaires des spermatozoïdes sur la ZP (Florman et Wasserman, 1985 ; Bleil et Wasserman, 1988). Ces études ont montré que les oligosaccharides purifiés O-liés de la protéine mZP3 se lient à la tête du spermatozoïde de souris et empêchent ainsi la liaison avec l'ovocyte *in vitro*. Plus précisément, un résidu galactose situé au niveau de la terminaison libre de l'oligosaccharide O-lié est essentiel à la liaison du spermatozoïde à mZP3. D'autres études montrent que les résidus GlcNAc de la glycoprotéine mZP3 de la zone pellucide serviraient de récepteur primaire au spermatozoïde (Shur et al., 1982 ; Miller et al., 1993) : ces résidus GlcNAc se lient à des β -1,4-galactosyltransférases sur la partie antérieure de la tête du spermatozoïde (Miller et al., 1992). Des GalTase ont également été identifiées sur la membrane plasmique des spermatozoïdes d'étalon et de taureau (Fayrer-Hosken et al., 1991) et plus généralement, la GalTase a été retrouvée sur la portion antérieure des cellules spermatiques de toutes les espèces, qui est le site de liaison du spermatozoïde à la zone pellucide. Cependant, quand on compare les quantités de GalTase exprimées sur les cellules spermatiques de six espèces différentes (Larson et Miller, 1997), on observe que les spermatozoïdes du cobaye, de la souris et du rat ont un niveau plus élevé que les spermatozoïdes de taureau, de porc, et de lapin. Le développement d'une lignée de souris délétée en GalTase (*gt*^{-/-}) révèle que les spermatozoïdes de ces mâles *gt*^{-/-} sont incapables d'effectuer la réaction acrosomique en réponse soit aux mZP3, soit aux anticorps anti-galactosyltransférase, comme le font des spermatozoïdes normaux (Lu et Shur, 1997).

Une étude plus récente a utilisé des néoglycoprotéines (glycoprotéine synthétique associée à un résidu sucre connu conjugué à des albumines sériques bovines) pour traiter des spermatozoïdes de souris capacités, afin de voir si les spermatozoïdes subissent une réaction

acrosomique (Loeser et Tulsiani, 1999). Ces recherches ont montré, de manière significative, qu'un plus grand nombre de spermatozoïdes de souris subissent la réaction acrosomique en présence des GlcNAc-BSA qu'en son absence, et que le glucose-BSA et le galactose-BSA n'ont aucun effet. De plus, lorsque les mêmes sucres non conjugués à la BSA sont mis en présence des préparations de spermatozoïdes, aucun d'entre eux ne provoque la réaction acrosomique ou ne bloque l'induction de la réaction acrosomique par les néoglycoprotéines. Cela suggère que certains sucres peuvent induire la réaction acrosomique, mais qu'ils doivent être conjugués à une protéine centrale. GlcNAc étant le substrat de la GalTase, ces résultats montrent que GlcNAc associée à une protéine centrale et la GalTase sont impliquées dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte et la réaction acrosomique.

4. Reconnaissance - Fixation secondaire à la zone pellucide.

D'autres systèmes de fixation à des saccharides peuvent intervenir telles l' α -D-mannosidase chez le rat et l'homme ou des protéines se comportant comme des lectines, c'est le cas des spermadhésines du verrat, AWNs, et du récepteur du galactose du spermatozoïde du rat, RSGr (voir tableau 1 et fig. 2).

L'apex du spermatozoïde entre le premier en contact avec la zone pellucide et c'est à ce niveau que débute la fixation, puis le nombre de sites de fixation augmente et la tête du spermatozoïde se couche à plat sur la zone pellucide (Fig.1C)

Le second système d'adhésion cellulaire, comparable à celui de protéines liant des cellules, les Cell Adhesion Molecules (CAMs), est également présent.

La PH-20, identifiée chez le cobaye sur la membrane plasmique post acrosomique et sur la membrane acrosomique interne (Myles et Primakoff, 1997) appartient à cette catégorie de molécules qui sont liées à la membrane plasmique par le GPI (glycosylphosphatidylinositol) : en effet, en présence d'une phospholipase C qui rompt la liaison phosphate du GPI, une partie de la PH-20 est libérée et le taux de la fécondation est réduit de 60 %.

La première indication concernant la fonction précise de la PH-20 dans la fécondation vint de Gmachl et Kreil (1993) qui clonèrent et séquencèrent le gène codant pour l'enzyme

espèces	enzymes	(CAM) PH-20	Autres protéines et lectins
bélier			64 kD
cobaye	GalT	PH-20	
étalon	GalT		
homme	α mannosidase GalT	SPAM-1 #PH-20	SP 17 = FA 1 P34 H
lapin	GalT	PH-20	SP 17
babouin			SP 17
macaque		PH-20	
rat	α mannosidase GalT	2B1 #PH-20	<i>RTGr</i>
souris	GalT	PH-20	SP 56
taureau	GalT		
verrat	GalT		AWN-1 et -2

Tableau 1: Protéines participant à la reconnaissance de la zone pellucide, à la fixation du spermatozoïde et à la réaction acrosomique. (D'après Thibault C., 2001)

Figure 2 : Molécules servant à la fixation à la zone pellucide. Cette figure reprend les informations données dans le tableau 1 et permet de remarquer que : a) les deux systèmes principaux reconnaissance-fixation du spermatozoïde reconnus actuellement sont, pour la ZP3, la galactosyltransférase et pour la ZP2, la PH-20 ou ses analogues (SMAP-1 chez l'homme, 2B-1 chez le rat ; b) pour le spermatozoïde humain, 5 molécules ont été décrites comme intervenant dans la fécondation au niveau de la zone pellucide. (La recherche d'un vaccin contraceptif n'est pas étrangère à cette abondance de molécules). (D'après THIBAUT C. 2001)

hyaluronidase présente dans le venin de l'abeille, *Apis mellifera*. Ils montrèrent que, sur une longueur de plus de 290 acides aminés, au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine il y a plus de 36% d'homologie entre cette protéine et la PH-20 du cobaye. Cela soulève la question qui est de savoir si la PH-20 possède également une activité hyaluronidase. La

présence de cette activité chez la PH-20 fut confirmée chez des souris transgéniques (Lin et al., 1994). Les souris transgéniques pour cette protéine PH-20 possèdent une activité enzymatique d'environ 150 UI par μg de protéine qui leur permet d'induire la dispersion des couches de cellules cumulus des ovocytes de souris, un rôle qui historiquement était connu comme étant accompli par une activité hyaluronidase du sperme. Il est incertain que l'activité hyaluronidase constitue le rôle unique de la PH-20 dans la fécondation, il semble probable que d'autres rôles soient remplis par celle-ci. Cependant, puisque la présence de la molécule PH-20 a été démontrée chez l'homme, le singe *Cynomologus* (Lin et al., 1993), de même que chez le cobaye et la souris, il semble probable que quelques soient les rôles joués par la PH-20, cette molécule a été conservée dans un grand nombre d'espèces.

La PH-20 est présente chez le macaque, la souris et l'homme et comme le gène codant pour cette protéine ainsi que ses transcrits sont présents aussi chez le lapin et le hamster (Lathrop, 1990), on peut penser que la PH-20 est présente chez ces 5 espèces. De plus, la protéine 2B1 du rat peut être assimilée à la PH-20 avec laquelle elle possède une identité de séquences et présente, comme elle, une activité hyaluronidase (Hou et al., 1996).

D'autres molécules de la membrane du spermatozoïde peuvent participer à la reconnaissance et/ou la fixation. Ces protéines peuvent intervenir soit comme facteur principal de liaison, soit comme facteur complémentaire obligatoire. C'est le cas des protéines de 56 et 95 kD chez la souris (Myles et al., 1997).

5. La double fixation.

La fixation à la ZP3 est suivie, après la réaction acrosomique, d'une seconde fixation à la ZP2 qui conforte l'ancrage du spermatozoïde (Thibault C., 2001). Rappelons que la zone pellucide est constituée de trois glycoprotéines principales : la ZP3, la ZP2 et la ZP1 ; la ZP1 lie ZP2 et ZP3.

Schématiquement, les molécules du premier système de reconnaissance se fixent à la ZP3, tandis que les molécules de type CAM se fixent à la ZP2. C'est le cas de la PH-20 ; ce doit être aussi le cas des molécules qui ne sont « visibles » qu'après la réaction acrosomique, telle la SP17 chez le lapin ou peut-être l'acrosine chez la souris.

Les protéines actuellement identifiées sont indiquées sur le tableau 1 et la figure 2.

L'existence d'une double fixation sur la ZP3 et sur la ZP2 explique que chez le cobaye, l'homme, le hamster et le lapin, la fixation à la zone pellucide puisse se faire même si le spermatozoïde a déjà subi sa réaction acrosomique puisqu'il peut s'attacher à la ZP2.

6. La réaction acrosomique.

Ce n'est que chez la souris qu'ont été distingués les motifs peptidiques et glucidiques servant à la fixation à la ZP3 et ceux servant à l'induction de la réaction acrosomique. La ZP3 par un des motifs de sa chaîne peptidique, et non plus par ses chaînes oligosaccharidiques, se comporte comme un ligand vis-à-vis d'un récepteur spermatique autre que la GalTase (figure 1C). La stimulation de ce récepteur déclenche l'exocytose du produit de sécrétion qu'est le contenu de l'acrosome (Wassarman, 1990). C'est la réaction acrosomique (RA) préalable à la fécondation chez toutes les espèces animales dont les spermatozoïdes possèdent un acrosome.

Durant la RA, membrane plasmique et membrane acrosomique externe fusionnent ponctuellement et se détachent comme une collerette collante. Après la RA, il se produit une redistribution des protéines de la membrane périacrosomique qui migrent vers le segment équatorial.

Globalement, le mécanisme de la RA est celui utilisé par les hormones qui déclenchent l'exocytose des sécrétions de leurs cellules cibles en activant un récepteur membranaire.

Le récepteur spermatique, sur lequel on ne dispose d'informations que chez la souris, est de type glycine. Il s'agirait soit de la protéine sp56 située dans ou sur la membrane plasmique du spermatozoïde (la ZP3 a été et est encore qualifiée à tort de récepteur spermatique ; le récepteur est sur la membrane plasmique du spermatozoïde et la ZP3 est le signal activateur, le ligand (Wassarman, 1990)) soit plus probablement, de la protéine sp95 transmembranaire, car l'anticorps monoclonal divalent contre la sp95 entraîne la RA (Leyton et Saling, 1989). Or on sait que l'action d'une hormone protéique peut être mimée par un anticorps anti récepteur à condition qu'il soit divalent car sous cette forme, il provoque le regroupement de récepteurs comme le fait l'hormone et cela suffit à les activer et à déclencher l'exocytose.

L'activation du récepteur spermatique met en jeu une protéine G_i^2 (Florman et al., 1989) et une protéine tyrosine kinase. La tyrosine kinase contribuerait à l'augmentation du niveau de phosphorylation de la sp95, qui augmente en présence du ligand qu'est la ZP3 (Leyton et Saling, 1989).

Suite à la reconnaissance et à la fixation de ZP3 et de son récepteur, une cascade d'activation entraîne alors l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui est suivi de la réponse biologique, la RA, sous réserve que les spermatozoïdes aient été

capacités. La progestérone semble jouer un rôle physiologique en induisant la RA. L'acrosome déverse alors son contenu enzymatique au contact de la zone pellucide. Trois des enzymes acrosomiales sont assez bien connues : la hyaluronidase, la β -N-acétylglucosidase et l'acrosine.

La hyaluronidase est considérée comme une enzyme nécessaire pour le franchissement des cellules périovocytaires (la *corona radiata*) mais elle n'est libérée que par la réaction acrosomique, alors que le spermatozoïde fécondant a déjà traversé cette enveloppe cellulaire. L'activité hyaluronidase de la PH-20, protéine membranaire, repose la question de la présence d'une hyaluronidase soluble dans le contenu acrosomique. En effet, la PH-20 est une protéine liée à la membrane plasmique par un GPI et elle peut être libérée quand le GPI est modifié. L'identité structurale de la partie de la PH-20 qui possède une activité hyaluronidase et de la hyaluronidase « classique » conduit à penser que l'activité hyaluronidase observée après la réaction acrosomique peut provenir d'une libération de la PH-20 et peut-être aussi de son clivage par une protéase libérant le motif hyaluronidase (Hunnicut et al., 1996).

La hyaluronidase, acrosomique ou non, dissout l'acide hyaluronique qui occupe la surface et les espaces entre les mailles de la zone pellucide et c'est probablement son rôle principal puisque l'étude microcinématographique de la fécondation chez le lapin montre que le spermatozoïde fécondant provoque la rétraction des cellules du cumulus qu'il rencontre et non leur dispersion, ce qui l'entraîne au voisinage immédiat de la zone pellucide.

La β -N-acétylglucosaminidase libérée par la réaction acrosomique participe au passage de la zone pellucide. Elle interviendrait en coupant les liens établis par le spermatozoïde avec la ZP2 et la ZP3 (souris, Miller et al., 1993) lui permettant ainsi de franchir la zone pellucide.

L'acrosine ne détruit pas localement la zone pellucide pour ouvrir la voie au spermatozoïde comme le font les protéases acrosomiques chez les autres vertébrés et invertébrés pour la membrane vitelline. Mais elle rompt localement les pontages entre les glycoprotéines de la zone pellucide, permettant au spermatozoïde de s'infiltrer. En cas d'absence d'acrosine chez la souris, la fertilité n'est pas réduite mais la fécondation est retardée. L'acrosine joue donc un rôle facilitant mais non déterminant dans le passage de la zone pellucide.

D'autre part, les autres enzymes acrosomiques transforment les précurseurs des protéines qui vont assurer la fusion avec l'ovocyte en protéines fusogènes actives ; seuls les spermatozoïdes ayant subi leur RA peuvent fusionner avec l'ovocyte (Thibault, 2001).

7. Reconnaissance et fusion membranaires.

La reconnaissance des membranes plasmiques des deux gamètes et leur fusion relèvent de mécanismes moléculaires très généraux existant entre virus et cellules hôtes ou intervenant dans la fusion des cellules, myoblastes par exemple.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* montre très bien cette similitude. Un gène unique *ADM-1* code pour une protéine présente à la fois sur les spermatozoïdes mârs permettant la fusion avec l'ovocyte et dans les tissus syncytiaux qui sont chez cette espèce, outre les muscles, les tissus hypodermiques (la cavité buccale, le pharynx et l'anus). Cette protéine comprend deux domaines d'activité, un domaine servant à la fixation présentant un motif disintégrine et un domaine présentant une activité protéase (Thibault, 2001).

Toutes les protéines possédant ces deux activités appartiennent à une famille appelée ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease domain).

Chez le cobaye, une protéine de cette famille a été localisée dans la membrane plasmique de la région post acrosomique, là où débute la fusion avec l'ovocyte ; nommée fertiline (anciennement PH-30), elle assure la fixation du spermatozoïde à la membrane de l'ovocyte et leur fusion. Mais cette molécule n'est plus une seule protéine comme chez le nématode, mais un dimère formé de deux sous-unités α et β qui assurent indépendamment chacune des deux fonctions, fixation et fusion respectivement. Ces deux sous-unités proviennent de deux précurseurs déjà présents sur les spermatocytes et les spermatides. Ces deux molécules possèdent une grande similitude de structure : queue cytoplasmique, domaine intramembranaire, motif EGF répétitif, domaine disintégrine, domaine métalloprotéase (Thibault, 2001).

Cependant, dans le testicule ou dans la tête de l'épididyme, le précurseur α est clivé au niveau de la disintégrine tandis que, durant le transit épидидymaire, le précurseur β est clivé au niveau du domaine métalloprotéase, conservant intégralement son domaine disintégrine. Ce qui rattache la sous-unité β à la famille des disintégrines.

La sous-unité α contient un motif peptidique analogue au peptide de fusion présent dans une chaîne polypeptidique transmembranaire de virus enveloppés qui leur permet de

Figure 3 : Protéines identifiées sur la membrane du spermatozoïde ou de l'ovocyte et participant à la reconnaissance et à fusion des deux gamètes. Pour le spermatozoïde, la majorité des molécules ou de leurs précurseurs sont d'origine testiculaire ; la FBL-1 chez l'homme et la DE chez le rat sont d'origine épидидymaire. Pour l'ovocyte, sont identifiés des intégrines chez la souris et le cobaye et la protéine ligand de la DE du rat. (D'après THIBAUT C., 2001)

pénétrer dans les cellules par fusion et non par endocytose. Pour la fertiline, ce motif peptidique de fusion est semblable à celui du virus de la rubéole (Weskamp et Blobel, 1994).

C'est par un groupe d'acides aminés hydrophobes que le peptide de fusion de la protéine virale ou de la sous-unité α de la fertiline peut pénétrer la membrane plasmique de l'ovocyte et la déstabiliser.

Les deux sous-unités de la fertiline ont été identifiées chez le macaque, le lapin et le taureau. Chez la souris, c'est la cyritestine (CYRN), qui correspond au précurseur de la fertiline β et, comme elle, ne possède pas le motif de fusion. Elle est localisée dans la membrane acrosomique puis présente en surface après la RA. Elle est codée par un gène porté par le bras court du chromosome 8. Chez l'homme, existent deux gènes CYRN 1 et CYRN 2 ; ce deuxième gène est porté par le chromosome 16 (16q 12.1) (Koehler et al., 1997) ; la localisation du premier est sur le chromosome 8 (p11.2) (Vidaeus et al., 1997)

La fertiline présente sur la membrane plasmique du spermatozoïde vient chez plusieurs espèces (cobaye, souris et homme) reconnaître et se fixer à des molécules de la famille des intégrines présentes sur la membrane plasmique ovocytaire. Chez la souris, deux intégrines, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, sont présentes. Seuls les anticorps contre l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ empêchent la fixation du spermatozoïde (Almeida et al., 1965). Chez l'homme, sur l'ovocyte en métaphase II, la sous unité $\beta 1$ est distribuée en plaques ; ce sont les zones où se fixent les spermatozoïdes. Un anticorps contre la $\beta 1$ réduit de 50% le nombre de spermatozoïdes qui fusionnent avec des ovocytes humains sans zone pellucide (Ji et al., 1998).

L'identité de ce système moléculaire, à savoir la reconnaissance-fixation de la fertiline du mâle et des intégrines des femelles, chez six espèces (cobaye, lapin, taureau, souris, macaque, homme) laissent penser que ce mécanisme doit se retrouver de manière plus ou moins identique chez d'autres mammifères (figure 3).

Même si ce mécanisme apparemment ubiquitaire est impliqué dans la fixation/fusion chez les mammifères, il est probable que d'autres protéines y participent. C'est le cas de la 62 kD du verrat, de la protéine DE du rat et peut-être de la SP10 présente sur la membrane acrosomique de l'homme, du macaque, du babouin et du verrat puisqu'un anticorps monoclonal contre la SP10 humaine empêche la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte de hamster dépellucidé. Notons que l'ovocyte de hamster et à un degré moindre, l'ovocyte de souris se laissent féconder par un spermatozoïde d'une autre espèce pourvu que la zone pellucide soit enlevée (Thibault, 2001).

Mais rien n'indique que des domaines de ces molécules permettent de les rattacher à une famille de protéines impliquées dans des mécanismes de fixation et/ou de fusion membranaire. Le fil conducteur de beaucoup de ces travaux est la recherche d'un vaccin contraceptif et non la volonté de comprendre les mécanisme de la fécondation.

8. Activation du zygote.

La fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte entraîne l'activation du zygote, c'est-à-dire la remise en marche du cycle cellulaire de l'ovocyte en provoquant en particulier des oscillations du potentiel calcique dans le cytoplasme ovocytaire. L'embryon va subir de nombreuses divisions cellulaires, et le développement embryonnaire puis foetal va avoir lieu.

Il convient de bien différencier la contraception de la contragestion. La contraception, au sens strict, est la prévention de la fécondation, la contragestion est la méthode de contrôle de la fertilité empêchant l'implantation de l'œuf fécondé. C'est pourquoi nous ne développerons pas les évènements qui font suite à la fusion des gamètes.

Les facteurs de la reproduction qui doivent être pris en compte lorsque l'on choisit un site d'action pour la contraception sont : le caractère saisonnier de la reproduction, la taille des portées et le taux de naissance, les caractéristiques liées au transport et au stockage des spermatozoïdes et enfin la durée de la reproduction au cours de la vie. Toutes ces caractéristiques auront des répercussions sur la durée et l'efficacité d'action de la contraception. Au niveau cellulaire et moléculaire, la spécificité d'espèce au niveau du site d'action est également cruciale car elle détermine la spécificité de l'immunogène. Bien que la spécificité d'espèce exclusive est hautement désirable, la spécificité dépend aussi de la composition et de la manière dont l'antigène pourrait être modifié grâce aux techniques de la biologie moléculaire. De plus, l'étendue de nos connaissances sur les particularités de la reproduction de certaines espèces aura un effet sur le temps nécessaire pour développer une approche pratique.

II Différents antigènes candidats pour l'immunocontraception.

L'immunocontraception peut mettre en jeu des anticorps interférant à différents niveaux avec la fusion des gamètes ou même en amont de la production des gamètes. Mais,

comme nous l'avons précisé précédemment, ces anticorps doivent intervenir à des niveaux précédant la fusion des gamètes.

Ainsi les molécules intervenant de manière décisive au niveau ou en amont de la fusion des gamètes, présentées au cours de la première partie, constituent des candidats comme antigène pour l'immunocontraception.

A l'heure actuelle, trois familles d'antigènes ont été l'objet de recherche : la GnRH, les antigènes des spermatozoïdes et les antigènes de la zone pellucide de l'ovocyte.

A. Immunisation active anti-gonadolibérine.

Le choix de cet antigène découle logiquement de son rôle central dans la production des gamètes. La GnRH présente une structure qui a été très conservée au cours de l'évolution. Ainsi, elle est identique ou presque à toutes les espèces de mammifères. Si des anticorps peuvent se lier à la GnRH et, en modifiant ainsi sa structure, empêcher sa liaison aux récepteurs hypophysaires, la production de gamètes deviendrait impossible, aussi bien chez le mâle que chez la femelle.

Les premières expériences d'immunisation active ont été réalisées en vue d'obtenir un immunosérum pour la mise au point d'un dosage radio immunologique de cette hormone. Les différents auteurs se sont aperçus que les animaux producteurs d'un immunosérum à un titre élevé présentaient, du fait de la neutralisation de leur GnRH endogène une véritable castration immunologique (Chaffaux et al., 1987).

Les expériences actuelles sont menées pour comprendre et maîtriser ce nouveau type de castration. Elles ont été conduites chez des animaux prépubères ou adultes, mâles et femelles de diverses espèces dont nous verrons les résultats dans la cinquième partie.

B. Développement de vaccins immunocontraceptifs basés sur les spermatozoïdes.

1. Molécules de reconnaissance et de fixation.

Comme nous l'avons vu au cours de la première partie, le spermatozoïde possède un certain nombre de systèmes de reconnaissance et de fixation à l'ovocyte qui constituent autant de candidats à l'immunocontraception. En résumé, la reconnaissance implique une galactosyltransférase qui se fixe à une chaîne oligosaccharidique de la glycoprotéine ZP3. Par ailleurs la fixation met en jeu des molécules CAM dont fait partie la PH-20. Enfin d'autres molécules de la membrane du spermatozoïde peuvent participer à la reconnaissance et/ou la fixation à la ZP dont font partie les lectines, SP-17, RTGr, SP-56, SP-95, AWN-1 et -2.

A l'heure actuelle, très peu d'études ont été réalisées à partir d'antigènes de spermatozoïdes. Les études réalisées concernent les petits rongeurs, en raison des connaissances détaillées disponibles dans ces espèces (rat et souris de laboratoire) sur la physiologie de la reproduction et surtout quant aux protéines des gamètes.

Chez les rongeurs, l'immunocontraception utilisant des produits purifiés provenant des gamètes a été démontrée en utilisant l'antigène PH-20 des spermatozoïdes chez le cobaye (Primakoff et al., 1988). Cependant, la fécondation étant un processus hautement conservé au cours de l'évolution, il est probable que l'interaction spermatozoïde-ovocyte nécessite des déterminants antigéniques communs à beaucoup de mammifères, peptides et oligosaccharides, en plus de composants additionnels responsables de la spécificité d'espèce (Yanagimachi, 1994).

Par exemple, cela pourrait être sous la forme de protéines mosaïques (Doolittle, 1995) qui auraient à la fois des domaines spécifiques d'espèce, et des protéines communes associées à des cofacteurs spécifiques d'espèce.

Un grand nombre d'antigènes des spermatozoïdes pouvant intervenir dans la reconnaissance et la fixation à la zone pellucide ont été identifiés chez les rongeurs, parmi lesquels : la galactosyl transférase (Gong et al., 1995) ; la SP-56 (Cheng et al., 1994 ; Bookbinder et al, 1995) ; la SP-95 (Ellis et al. 1985 ; Leyton et Saling, 1989) ; et la PH-20 (Primakoff et al, 1988). Le rôle de ces molécules dans le processus de reproduction est pour le moment incertain.

La fusion spermatozoïde-ovocyte est également un site d'action potentiel pour l'immunocontraception et les protéines qui jouent un rôle dans cette fusion sont des antigènes candidats à l'immunocontraception, à titre d'exemple la PH-30 (Blobel et al., 1992).

Il est clair que plus un grand nombre d'antigènes des spermatozoïdes seront identifiés, clonés et séquencés chez les rongeurs de laboratoire, plus il sera possible d'identifier des cibles homologues dans d'autres espèces en vue de produire des vaccins contraceptifs.

2. Récepteurs spermatiques induisant la réaction acrosomique.

Chez l'écureuil gris, le spermatozoïde est caractérisé par un acrosome large et asymétrique. Cet acrosome large semble avoir un rôle, *in vitro* du moins, sur la progression de la réaction acrosomique. La vitesse moyenne de progression du spermatozoïde dépend de l'état de l'acrosome : elle est différente sous forme intacte et sous forme réactionnelle. Des analyses de l'image des mouvements de la queue du spermatozoïde indique que le flagelle possède une composante rotatoire qui entraîne en partie la progression de l'acrosome à la manière d'une hélice de bateau. Ceci est un fait intéressant car l'inhibition de la réaction acrosomique par des anticorps pourrait empêcher la progression des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femelle (Moore et al., 1997).

Comme nous l'avons vu ci-dessus, c'est la stimulation d'un récepteur spermatique (protéines sp 56 ou sp 95 chez la souris) qu

phosphoprotéine de 95 kDa sur la membrane plasmique antérieure de l'acrosome du spermatozoïde de hamster, de souris et de l'homme. Des essais de fécondation *in vitro* ont été employés pour identifier parmi ces anticorps ceux qui interfèrent spécifiquement avec le processus de reconnaissance des gamètes (Ellis et al. 1985 ; Moore, 1990) et donc potentiellement intéressants pour l'immunocontraception. La fécondation *in vivo* et *in vitro* (Ellis et al., 1985) peut être bloquée par Mab97.25 et l'interaction spermatozoïde-ovocyte est inhibée chez l'homme (Moore et al., 1987 ; Burks et al., 1995). Récemment, l'acide désoxiribo nucléique cellulaire (ADNc) codant pour le récepteur du spermatozoïde humain reconnu par Mab97.25 a été identifié comme un nouveau récepteur tyrosine-kinase spécifique des spermatozoïdes (Burks et al., 1995). La tyrosine kinase constitue un des systèmes d'activation du récepteur spermatique induisant la réaction acrosomique. Elle contribuerait à l'augmentation du niveau de phosphorylation de la SP-95, qui augmente en présence du ligand qu'est la ZP3 (Leyton et Saling, 1989). Des études sur des spermatozoïdes de souris et d'homme confortent l'hypothèse que ce récepteur est phosphorylé au contact du composant ZP3 de la zone pellucide puis une cascade de réactions avec des kinases induit la réaction acrosomique (Leyton et Saling, 1989 ; Moore, 1995 ; Saling et al., 1995). Une partie du domaine extracellulaire de la molécule est modifiée, établissant une hypothétique différence spécifique d'espèce qui pourrait être exploitée pour le développement de vaccins. Ainsi la tyrosine kinase pourrait constituer une cible à l'immunocontraception. Des études d'immunolocalisation indiquent qu'une molécule similaire est exprimée à la surface antérieure de l'acrosome du spermatozoïde de l'écureuil gris (Moore et al., 1997).

D'autres anticorps monoclonaux ont été générés chez le hamster de laboratoire comme Mab 18.6 (Moore et al., 1987). Cet anticorps reconnaît un antigène intracellulaire de l'acrosome chez tous les spermatozoïdes des Euthériens examinés et inhibe la liaison spermatozoïde-ovocyte chez l'écureuil.

Actuellement, une bibliothèque d'ADNc a été réalisée chez l'écureuil gris et est comparée avec des anticorps et des oligonucléotides pour trouver des gènes homologues à ceux de la souris et de l'homme chez l'écureuil.

Une fois divers antigènes des spermatozoïdes identifiés, une des étapes clefs est la sélection de celui contre lequel on va fabriquer le vaccin. La protéine cible doit posséder les propriétés suivantes :

- Elle doit jouer un rôle clef dans le processus de fécondation qui ne puisse être contourné.

- Elle doit être spécifique des spermatozoïdes et ne doit pas être exprimée au sein des tissus somatiques.
- L'antigène doit être un composant de la surface externe du gamète.
- La protéine doit être hautement immunogène ou pouvoir le devenir après manipulation.
- Le gène codant pour la protéine doit pouvoir supporter des manipulations moléculaires

Chez le lapin, de nombreuses protéines du spermatozoïde sont étudiées pour être utilisées comme antigène immunocontraceptif, comprenant l'isoenzyme C4 de la lactate deshydrogénase spécifique du sperme, l'acrosine (enzyme de l'acrosome) et les protéines spécifiques PH-20 et PH-30. Ces antigènes ont été choisis en se basant sur les connaissances actuelles de leurs rôles dans d'autres espèces et l'hypothèse que ce rôle sera également conservé chez les lapins.

L'isoenzyme C4 et l'acrosine sont des enzymes acrosomiques qui sont libérées au cours de la réaction acrosomique et ne constituent donc pas des antigènes de surface du spermatozoïde. La PH-30 intervient dans le processus de reconnaissance membranaire et de fusion après qu'ait eu lieu la réaction acrosomique.

La PH-20 fut initialement identifiée comme un composant spécifique de la tête du spermatozoïde de cobaye (Primakoff et Myles, 1983). Après induction de la réaction acrosomiale, elle migre de la tête à la membrane interne de l'acrosome. Cette protéine PH-20 remplit un rôle essentiel dans la liaison spermatozoïde-ovocyte et posséderait une activité de type hyaluronidase, impliquée dans la digestion de la ZP (Thibault, 2001).

C'est pourquoi, la protéine PH-20 a été sélectionnée à partir du sperme de cobaye et de lapin comme une cible antigénique primaire pour réaliser une vaccination immunocontraceptive. Il convient maintenant de confronter la PH-20 aux propriétés clés d'un antigène candidat, présentées au début de cette partie.

- *La protéine doit présenter une expression spécifique au niveau des tissus reproducteurs.*

En utilisant de l'ADNc de PH-20 issu de cobaye comme outil d'investigation, il a été possible de démontrer par Southern-blot de l'ADN génomique de lapin la présence d'un gène unique d'environ 3 kb de longueur (Holland et al., 1997). Cette longueur est similaire à celle

des gènes identifiés chez le cobaye, chez le rat, la souris, le hamster (Lathrop et al., 1990), chez l'homme et le singe (Lin et al., 1993). Des études en Northern-blot révèlent que le gène est uniquement exprimé dans les testicules, le transcrit du lapin ayant une longueur de 2,1 kb qui est similaire à celle du transcrit isolé chez le cobaye (2,2 kb) et à celui de l'homme (2,4 kb) (Andrews, 1994). Les analyses comparatives par Western-blot indiquent que la protéine est présente uniquement sur les spermatozoïdes et dans les voies spermatiques et ne peut pas être détectée au niveau du cerveau, du cœur, des muscles squelettiques, du foie ou des reins. Ainsi, la PH-20 présente une expression spécifique : uniquement au niveau des tissus reproducteurs et non au niveau des cellules somatiques.

En ce qui concerne la localisation de l'antigène au niveau du spermatozoïde, la protéine est identifiée au niveau de la partie antérieure de la tête des spermatozoïdes fixés. Même si la localisation sur des spermatozoïdes non fixés est nettement plus restreinte à un petit domaine sur la pointe antérieure du spermatozoïde, la répartition de la localisation intracellulaire de PH-20 reste cependant identique dans tous les cas. Au moins une proportion de protéines PH-20 se trouve donc à la surface des spermatozoïdes (Holland et al., 1997).

- *Le gène de la PH-20 doit pouvoir subir des manipulations moléculaires.*

La séquence de nucléotides du gène PH-20 de lapin est globalement identique à celle du gène du cobaye (74% d'homologie), de l'homme (75%), et du singe (74%). Cette homologie n'est plus présente au niveau de la terminaison 3' de la séquence. L'homologie génétique est reflétée par la similitude structurale de la protéine codée. De plus, les profils de migration hydrophiles, des protéines PH-20 dans différentes espèces montrent clairement que les domaines de surface, hydrophiles, des différentes molécules PH-20 sont localisés à des positions similaires et impliquent que la structure tri-dimensionnelle des molécules doit être très similaire. Holland et al. (1997) ont utilisé des analyses de séquence afin d'identifier trois peptides de la molécule susceptibles d'être présents en surface des cellules. De tels domaines sont facilement accessibles au système immunitaire et leur connaissance est importante pour définir le rôle biologique de la PH-20. Ces peptides sont testés à l'heure actuelle pour connaître leur capacité à affecter l'interaction spermatozoïde-ovocyte *in vitro* ainsi que pour leur capacité à induire une réponse immunitaire. L'analyse de séquence est un moyen de comprendre la structure protéique qui a ses limites et que Holland et al. tentent actuellement de compléter en cristallisant la PH-20 afin d'obtenir, en fin de compte, sa structure tri-

dimensionnelle complète. De telles informations sont capitales afin de cartographier les domaines fonctionnels de la molécule.

De plus, la PH-20 de lapin peut être exprimée dans de nombreux systèmes bactériens ce qui permet de fournir une grande quantité de protéines recombinantes qui peuvent être utilisées à grande échelle, en particulier pour des tests de fertilité. La PH-20 de lapin montre clairement un important degré de flexibilité moléculaire.

- *Rôle de la pH-20.*

Etant donnée l'extrême conservation génétique de la PH-20 et sa localisation au niveau du spermatozoïde dans de nombreuses espèces, il semble plausible que la PH-20 joue un rôle similaire, sinon identique, dans toutes ces espèces. En regard de cela, il a été confirmé que la PH-20 recombinante de lapin possède une activité hyaluronidase approximativement deux fois plus importante que la PH-20 de souris ou humaine par μg de protéine (Venable, 1995). De plus, il a été montré qu'une variété d'antiséras dirigés contre à la PH-20 recombinante de lapin empêche l'interaction spermatozoïde-ovocyte *in vitro*. Ainsi, il semble que la protéine de lapin possède la plupart des caractéristiques de la PH-20 des autres espèces.

Ont ainsi été identifiées les clefs du problème lié à la sélection d'antigènes à utiliser en vue de la conception de vaccins immunocontraceptifs. Bien qu'en de nombreux aspects, ces contraintes soient communes à celles de tout vaccin immunocontraceptif, beaucoup ne se présentent qu'à travers l'utilisation de système de libération à grande échelle (c'est-à-dire de virus infectieux). Les chercheurs travaillent actuellement avec un grand nombre d'antigènes, leurs homologues moléculaires ayant été étudiés dans d'autres espèces.

Le niveau de connaissances requis pour chaque antigène doit être immense afin d'augmenter leur efficacité immunocontraceptive. Cela est particulièrement vrai lorsque la manipulation moléculaire de l'antigène est requise pour optimiser l'efficacité contraceptive. Cela implique donc clairement qu'il est nécessaire de limiter le nombre d'antigènes à étudier en vue de l'immunocontraception. On pourrait ainsi soutenir que l'étape la plus cruciale dans le développement d'un vaccin immunocontraceptif est la sélection initiale d'un antigène (Holland et al., 1997).

On peut noter qu'à notre connaissance, aucune expérience à l'heure actuelle n'a été tentée avec la GalTase qui joue pourtant un rôle central dans la reconnaissance spermatozoïde-ovocyte. On peut s'interroger quant à la non exploitation de cette molécule.

C. Antigènes de la zone pellucide.

La démarche conduisant à l'exploitation d'antigènes de reconnaissance, fixation et fusion de la zone pellucide de l'ovocyte est identique à celle utilisée pour les antigènes de spermatozoïdes. L'une des étapes les plus cruciales de la fécondation est la reconnaissance de la zone pellucide (ZP) par le spermatozoïde, préalable à la fixation de celui-ci. Ceci nécessite donc l'ovulation d'un ovocyte présentant une zone pellucide mature et intacte. Les glycoprotéines de la zone pellucide sont hautement glycosylées et la partie glucidique est nécessaire au processus de fécondation. Le spermatozoïde doit pénétrer les cellules périovocytaires (cumulus oophorus) de l'ovocyte, reconnaître et se lier spécifiquement aux oligosaccharides de la zone pellucide pour enfin pénétrer cette zone pellucide. La zone pellucide joue donc un rôle pivot dans la fécondation en permettant la liaison du spermatozoïde, ce qui explique naturellement que les molécules de la zone pellucide impliquées dans la reconnaissance du spermatozoïde soient une cible intéressante pour l'immunocontraception.

1. Influence du degré de glycosylation, sulfonation et sialylation des oligosaccharides de la zone pellucide dans le choix de l'antigène candidat.

Bien qu'il ait été rapporté que les oligosaccharides O-liés sont impliqués dans la liaison spermatozoïde-ovocyte chez la souris, Liu et al. (1997) conduirent une expérience pour étudier l'influence du degré de glycosylation, de sulfonation et de sialylation des oligosaccharides N- et O-liés des ZP3 de la souris (mZP3) dans la liaison spermatozoïde-ovocyte. Des fragments de mZP3 N-liés présentant des degrés variables de glycosylation, des fragments de mZP3 traités par de la neuraminidase et des fragments de mZP3 sulfatés sécrétés par les cellules de carcinome embryonnaire ont été testés pour leur capacité à bloquer la liaison du spermatozoïde à la ZP et à induire la réaction acrosomique *in vitro*. Les résultats montrent que les trois types de fragments peuvent bloquer de manière indifférenciée la liaison du spermatozoïde et induire la réaction acrosomique, cela laisse suggérer que ni le sulfate ni l'acide sialique situés dans mZP3 ne sont directement impliqués dans la liaison

spermatozoïde-ovocyte puisque leur modification n'influe pas sur la liaison spermatozoïde-ovocyte qui a lieu dans tous les cas. Une étude supplémentaire de la fonction du groupement de glycosylation présent sur ZP3, à la fois N et O-lié, est nécessaire pour mieux comprendre l'interaction spermatozoïde-ovocyte. En fait, les diverses possibilités d'adhésion du spermatozoïde sont des mécanismes à sûreté intégrée pour permettre la survie des espèces, les différents degrés de glycosylation, sulfonylation et sialylation n'influent pas directement sur le processus de liaison. Ces modifications biochimiques pourraient en revanche jouer un rôle dans la spécificité d'espèce.

2. ZP3 α et β chez la truie.

La ZP3 porcine est constituée de glycoprotéines α et β qui correspondent respectivement aux ZP2 et ZP3 des autres espèces. Dans l'espèce porcine, on a émis l'hypothèse que, comme chez la souris, les pZP3 α et pZP3 β jouent un rôle dans la liaison du spermatozoïde. Ces sous unités ont été étudiées en réalisant des incubations de spermatozoïdes avec les différents fragments de ZP. On réalise ensuite des tests de liaison à la zone pellucide avec les spermatozoïdes pré-incubés. Une étude de Sacco et al. (1989) montre que la pré-incubation avec ZP3, inhibe la liaison spermatozoïde-ovocyte. Lorsqu'on fait agir une β -endogalactosidase, détruisant la sous unité β , la pré-incubation avec ZP3 α seule inhibe encore la liaison spermatozoïde-ovocyte. A l'inverse, la pré-incubation avec ZP3 β seule ne donne pas d'inhibition de la liaison. Berger et al. (1989) ont également montré que le composant 55 K solubilisé préincubé (comparable à pZP3 α) de la ZP porcine inhibe la liaison spermatozoïde-ovocyte. Ils ont également démontré qu'un anticorps monoclonal dirigé contre la totalité du composant 55 K glycosylé inhibe la liaison, alors que d'autres anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres portions de la ZP ne l'inhibent pas. Selon ces auteurs, un des supports du spermatozoïde de sanglier dans sa liaison à la ZP de la truie est une chaîne oligosaccharidique de la glycoprotéine pZP3 α . On peut déduire de ces données que la ZP3 α porcine peut être le récepteur primaire du spermatozoïde dans l'espèce porcine et constituerait par là même un candidat idéal à l'immunocontraception.

Des oligosaccharides isolés ont été utilisés pour prétraiter les spermatozoïdes de sanglier, la liaison de ces spermatozoïdes aux ovocytes est ensuite évaluée, comme on l'avait fait précédemment avec les sous unités α et β . Yonezawa et al. (1995) ont montré que si on préincube les spermatozoïdes avec ZP3 α privée de ses oligosaccharides N liées, la liaison de ces spermatozoïdes à l'ovocyte est moins inhibée et que les oligosaccharides O-liés de pZP3 α

ne réduisent pas l'effet inhibiteur. Cela suggère que les oligosaccharides N-liés de la sous unité ZP3 α , contrairement à ce que l'on observe chez la souris où c'est l'oligosaccharide O-lié qui intervient, sont impliqués dans la liaison spermatozoïde-ovocyte chez la truie. Les oligosaccharides O-liés ne semblent pas intervenir dans le processus de liaison dans cette espèce. Plus précisément, deux glucides N-liés intervenant dans la liaison spermatozoïde-ovocyte ont été localisés sur la fraction 137-247 de pZP3 α (Yonezawa et al., 1997). Ce résultat a été confirmé par Gupta et al. (1996) : des anticorps monoclonaux dirigés contre des résidus d'acides aminés 18-142 et 239-363 de ZP3 α inhibent la liaison spermatozoïde-ovocyte. Plus récemment, Kudo et al. (1998) ont montré que les chaînes oligosaccharidiques liées aux résidus d'asparagine 220 de pZP3 α sont impliquées de manière prédominante dans la liaison spermatozoïde-ovocyte chez la truie (Kudo et al., 1998). Cependant, le groupe de recherche de Nakano a montré que les chaînes N-liées des pZP3 α et β possèdent toutes deux une activité de liaison au spermatozoïde (Noguchi et al., 1982). De même, lorsque l'on retire une partie mineure de la pZP3 α par exclusion chromatographique, on observe une diminution de l'activité de liaison de la pZP3 α au spermatozoïde (Yurewicz et al., 1998). Cela laisse supposer que la pZP3 α et une partie de la β sont nécessaires à la liaison spermatozoïde-ovocyte.

Les deux épreuves compétitives *in vitro* de Yurewicz et al. (1991) et de Noguchi et al. (1992) utilisant pZP3 α + β et pZP3 α , suggèrent que un mélange de pZP3 α + β est nécessaire à une parfaite interaction entre les glucides et le spermatozoïde (Yonezawa et al., 1995).

C'est donc la chaîne oligosaccharidique N-liée de la sous unité pZP3 α qui constitue l'antigène le plus intéressant pour l'immunocontraception chez l'animal mais les dernières études montrent que les chaînes oligosaccharidiques N-liées de la sous unité pZP3 β pourraient également être impliquées dans le processus de liaison.

Ainsi, finalement, l'utilisation du vaccin avec toute la glycoprotéine pZP3 semble être le plus efficace des antigènes candidats (Fayrer-Hosken et al., 1999).

3. Rôle des D mannose et D fructose.

Le rôle des oligosaccharides dans la fécondation a également été étudié chez l'homme. En utilisant un test de pénétration de la zone pellucide humaine et une technique de triple marquage pour évaluer la réaction acrosomique, Mori et al. (1993) ont testé les effets bloquants de certains glucides. Les expériences montrèrent que le D-mannose et le D-fructose aux concentrations de 50 mM bloquent complètement la pénétration de la zone pellucide par le spermatozoïde. Cela laisse supposer que la cellule spermatique se lie au D-mannose de la zone pellucide humaine et que cette étape est essentielle à la fécondation. La technique de triple marquage montre que le D-fructose inhibe la réaction acrosomique. Le D-fructose pourrait donc être un facteur de stabilisation de l'acrosome dans le liquide séminal, ce qui signifie qu'il empêcherait une réaction acrosomique spontanée préalable à l'interaction avec l'ovocyte. Une étude de Mori et al. (1989) rapporte que le traitement d'ovocytes humains avec une lectine GlcNAc-spécifique bloque la liaison au spermatozoïde, mais une incubation préalable de spermatozoïdes non capotés avec GlcNAc ne bloque apparemment pas la liaison. La capacité de nombreux monosaccharides à inhiber la liaison spermatozoïde-ovocyte conforte l'hypothèse de complexes de récepteurs multivalents impliqués dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte. Les différents glucides pourraient faire partie d'une large structure de type oligosaccharidique qui reconnaît les récepteurs lectine-like du spermatozoïde (Thaller et Cardullo, 1996) ; ou bien, les cellules spermatiques pourraient posséder un récepteur multivalent ou plus, d'une paire de récepteurs qui agiraient de manière indépendante ou synergique dans le processus de liaison pour aboutir avec succès à la liaison spermatozoïde-ovocyte (Chapman et Barratt, 1996).

Tout ce que nous venons de présenter montre que les chaînes oligosaccharidiques jouent un rôle pivot dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte, et que la présence d'une protéine centrale est indispensable à l'induction de la réaction acrosomique. L'importance des chaînes glucidiques dans la fécondation est confirmée par le lien observé en fécondation *in vitro* humaine entre une anomalie des oligosaccharides de la ZP et des échecs de la fécondation. Talevi et al. (1997) ont utilisé un panel de lectines pour réaliser un screening d'ovocytes de femmes ayant des taux de fertilité élevés et d'ovocytes présentant des défauts de fécondation alors qu'ils étaient mis en présence de semences fertiles testées. Les ovocytes déficients étaient marqués avec *Maclura pomifera* (MPA), qui est spécifique de la terminaison Gal- β -1,3-GalNAc, et du résidu interne α -GalNAc. Les ovocytes de femmes présentant un haut niveau de fertilité ne marquent pas au MPA. Les ovocytes défectueux montrent trois zones de marquages différentes au MPA correspondant à trois zones possibles

défectueuses : une zone interne de liaison à la ZP, une zone de la périphérie de liaison à la ZP, enfin un marquage uniforme de la ZP. Ces données suggèrent que la présence de MPA liée à la ZP (présence de Gal- β -1,3-GalNac) pourrait être corrélée à une incapacité de la ZP à être liée puis pénétrée par le spermatozoïde. Une immunisation avec des antigènes de la zone pellucide mimant une zone pellucide défectueuse, rendrait l'ovule inapte à la fécondation.

D'autre part, des autoanticorps anti ZP furent supposés responsables de l'infertilité chez la femme (Shiver et Dunbar, 1977). Les glycoprotéines de la ZP sont donc également des antigènes candidats intéressant pour l'immunocontraception. L'antigène comprenant l'intégralité de la glycoprotéine ZP3 de la truie est le candidat le plus intéressant à l'immunocontraception comme nous l'avons vu précédemment (II. C. 2.) et ce pour un grand nombre d'espèces puisque la pZP3 présente des homologies significatives avec celles des autres espèces de mammifères (Dunbar et al., 1980).

De plus, des quantités significatives de pZP3 peuvent être obtenues facilement, facilitant les recherches et la production de grandes quantités de vaccin. C'est pourquoi de nombreuses études sur l'immunocontraception ont utilisé la pZP3 comme agent contraceptif.

D. Préparation de l'antigène pour éviter les effets secondaires.

1. Effets secondaires à court terme : la salpingite.

La réduction de fertilité suite à la vaccination anti pZP a été attribuée principalement à l'interférence des anticorps avec la liaison spermatozoïde-ovocyte, mais cette vaccination est également efficace via une action sur l'ovaire. Chez le lapin, une diminution du poids ovarien, du développement folliculaire, et une différenciation folliculaire anormale ont été observées (Wood et al., 1981). Des chiennes immunisées activement avec des pZP brutes (non purifiées) ont montré une cyclicité altérée et un dysfonctionnement ovarien, et un titre en anticorps élevé. A l'inverse, des chiennes immunisées avec des pZP purifiées montrent un titre modéré en anticorps. De plus, seule une chienne sur trois vaccinée avec des antigènes pZP purifiés montre des cycles anormaux, et après quatre injections, les trois chiennes montrent une réponse efficace à savoir l'absence de fécondation suite à la mise en présence des gamètes (Mahi-Brown et al., 1985). Des babouins vaccinés avec pZP montrèrent également des signes

de dysfonctionnement ovarien, qui inclut un niveau décroissant d'œstrogènes au cours du cycle menstruel et une absence d'ovulation. Le cycle ovarien était altéré significativement chez 60% des animaux après huit mois de traitement. L'histologie de tissus ovariens de babouins après une immunisation à long terme (plus de huit mois) révèle une réduction du nombre de follicules cavitaires (Dunbar et al., 1989). Les singes écureuils immunisés avec pZP montrèrent une diminution significative du nombre d'ovulations par rapport aux témoins (Sacco et al., 1983). Dans une étude plus tardive, Sacco et al. (1987) démontrèrent que bien que l'immunisation initiale de singe écureuil avec la pZP entraîne des dysfonctionnements de la fonction ovarienne, ces effets sont réversibles c'est-à-dire qu'ils disparaissent quand l'animal n'est plus immunisé.

L'atteinte ovarienne consécutive à l'immunisation anti pZP dépend de nombreux facteurs comme la pureté de l'antigène, la prédisposition de l'espèce animale considérée, l'adjuvant et la présence ou l'absence d'épitopes induisant une réponse des cellules T ou B à la surface de la ZP utilisée comme immunogène (Afzalpurkar et al., 1997). La présence d'épitopes T-cellulaires à la surface de la ZP utilisée comme immunogène conduit souvent à une inflammation de l'oviducte (salpingite), un effet non désiré pour un agent immunocontraceptif réversible car il risque de provoquer une obstruction tubaire et donc une stérilité définitive. Une étude montre que chez la souris, les affections ovariennes peuvent être transférées à des destinataires naïfs via les cellules CD4+T, mais pas par les anticorps (Lou et al., 1996). Tung et al. (1996) montrèrent également que les cellules CD4+T de souris reconnaissent les peptides mZP3 au niveau des cellules présentatrices d'antigènes de l'ovaire, initiant le recrutement des macrophages, la sécrétion de cytokines, et l'inflammation ovarienne. Quoiqu'il en soit, en altérant les épitopes T-cellulaires liés à la séquence ZP3, ils furent capables d'éliminer la salpingite tout en conservant la réponse en anticorps et l'effet immunocontraceptif. Ces résultats indiquent donc que les anticorps ne sont pas à l'origine de l'inflammation tubaire, mais suggèrent l'importance des cellules T dans la pathologie ovarienne.

Suite à ces découvertes, des études ont été effectuées pour caractériser l'épitope B-cellulaire de la ZP afin de réaliser un vaccin immunocontraceptif plus sécurisé. Les chercheurs conduirent une étude utilisant des anticorps monoclonaux générés contre la ZP3 β qui leur permit de cartographier les épitopes B-cellulaires (Afzalpurkar et Gupta, 1997). Cela aidera à développer un peptide synthétique présentant un minimum de motifs de liaison en vue de l'utiliser comme agent immunocontraceptif n'induisant pas la salpingite.

D'autre part, la pZP3 se montre efficace comme antigène pour induire l'immunocontraception dans plusieurs espèces. Ainsi, par exemple, la séquence d'acides aminés de pZP3 β montre plus de 60% d'homologie avec la ZP3 humaine (Henderson et al., 1987). Cela permet l'utilisation de pZP3 β comme cible pour l'immunocontraception chez l'homme : des anticorps polyclonaux dirigés contre pZP3 β inhibent, *in vitro*, la liaison spermatozoïde-ovocyte chez l'homme. Une protéine recombinante de lapin de 55kDa, qui est l'homologue du récepteur ZP3 α de spermatozoïdes chez la truie (Prasad et al., 1996), a été utilisée pour immuniser des singes *Cynomolgus*. La vaccination entraîna la production d'anticorps qui inhibent la liaison du spermatozoïde, sans altérer la fonction ovarienne (Vande Voort et al., 1995). Ces anticorps inhibèrent également la liaison de spermatozoïdes de lapin à des ovocytes de lapine *in vitro*. Ces découvertes encouragent les investigations en vue de produire un vaccin immunocontraceptif pZP dénué d'effets secondaires et ce dans plusieurs espèces animales.

2. Facteurs influants sur l'apparition des effets secondaires.

Trois facteurs peuvent jouer un rôle significatif dans les altérations de la fonction ovarienne. La durée de l'efficacité contraceptive est directement à mettre en relation avec la quantité d'antigènes pZP administrés (Henderson et al., 1988) et au titre en anticorps en résultant (Miller et al., 1992) ; le dysfonctionnement ovarien pourrait de même être en relation avec la dose de pZP. Dunbar et al. (1989) utilisèrent à la fois la ZP1 et la ZP3, qui comportent un épitope antigénique commun, mais de sérieux dysfonctionnements ovariens se rencontraient chez les babouins après 49 semaines et 9 cycles hormonaux.

La pureté de l'antigène pZP pourrait constituer un troisième facteur de l'altération de la fonction ovarienne. La plupart des études réalisées avec des lapins, des chiens et des primates démontrent que le dysfonctionnement ovarien est présent lors de l'utilisation de préparations brutes de pZP, qui contiennent la totalité des protéines de la ZP. Ces différentes préparations incluent également des associations de glucides dont on connaît l'importance en tant qu'antigènes (Paterson et Aitken, 1990). Que ce soit à court ou à long terme il semble que ce soit bien la pureté de l'antigène qui est incriminée dans l'apparition d'effets secondaires néfastes comme la salpingite, pouvant être à l'origine d'une stérilité définitive. Ainsi le mode

de préparation de l'antigène doit être exemplaire afin d'obtenir des antigènes purifiés. Des méthodes plus récentes d'obtention de protéines de ZP par génie génétique permettraient de réaliser des préparations présentant un haut degré de pureté.

3. Altérations ovariennes à long terme.

Une immunisation prolongée entraînant un maintien élevé du titre en anticorps anti-ZP a également causé des profils hormonaux anormaux et ainsi une altération du cycle œstral chez la lapine (Skinner et al., 1984), chez la chienne (Mahi-Brown et al., 1985), et altère les cycles menstruels chez les primates (Dunbar et al., 1989 ; Lou et al., 1996 ; Garza et al., 1998).

Ces conséquences hormonales entraînées par immunisation à long terme pourraient jouer un rôle dans le fonctionnement ovarien incorrect et conduire à l'effet d'infertilité des anticorps anti-ZP. Cela se produit en synergie avec l'inhibition de la liaison du spermatozoïde et/ou de la pénétration de la zone pellucide. D'autres données montrent l'érosion de la population folliculaire dans de nombreuses espèces (Sehgal et al., 1989 ; Upadhyay et al., 1989 ; Paterson et al., 1996) ayant été vaccinées pendant des périodes prolongées avec la pZP.

L'expérience réalisée par Kirkpatrick et al. en 1992 illustre bien les phénomènes d'altération à long terme. En dehors de cette étude sur les chevaux, il n'y a pas eu d'expérience similaire avec un traitement d'au moins trois ans sur d'autres espèces de mammifères. Ainsi nos connaissances des effets à long terme sont faibles. En se basant sur les travaux de Liu et al. (1989) sur des juments en captivité, et les premiers travaux sur des juments sauvages (Kirkpatrick et al., 1990a, 1991), qui utilisèrent le même antigène et les mêmes doses et démontrèrent un retour normal de la fertilité, les données de trois années consécutives de traitement suggèrent que la durée du traitement pourrait être le facteur prépondérant pour expliquer les dysfonctionnements ovariens observés chez les juments (Kirkpatrick et al., 1992).

La durée du traitement peut contribuer aux effets à long terme. De faibles doses de haute pureté peuvent produire des effets à long terme par un effet cumulatif sur la population folliculaire.

Notons que l'on parle, en ce qui concerne les expériences pré citées, d'immunisation prolongée, à savoir sur quelques mois, ce qui n'est en aucun cas comparable à l'expérience d'immunocontraception réalisée par Kirkpatrick et al. sur trois ans.

III Réponse immunitaire induite.

Bloquer l'interaction spermatozoïde-ovocyte par l'immunocontraception implique une immunité cellulaire et/ou humorale. Les nombreux isotypes d'immunoglobulines (Ig) présentent autant de diversités d'affinités que de différences de caractéristiques de liaison. Les IgA sont habituellement impliquées dans l'immunité locale, les IgE jouent un rôle dans l'hypersensibilité immédiate et dans l'immunité anti-parasitaire. Les IgM et IgG sont principalement dirigées contre les antigènes protéiques, mais ces antigènes peuvent également être des protéines glycosylées comme le sont les glycoprotéines de la ZP (Burton et Woof, 1992). L'IgG est l'immunoglobuline la plus versatile de la circulation systémique ; en cela, elle active le système du complément, améliore la phagocytose par l'opsonisation, et déclenche la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. Par la voie humorale, l'IgM est l'acteur de la réponse immédiate alors que l'IgG est l'acteur de la réponse à long terme. Ces différents types d'Ig peuvent être impliqués dans la réponse immunitaire induite par immunocontraception.

A. Rôle de l'immunisation dans le contrôle de la fécondité.

Le but d'un vaccin contrôlant la fécondité est, en grande partie, de générer une réponse immunitaire et de la maintenir efficace afin de perturber le mécanisme qui s'opère dans le tractus reproducteur. Dans certains cas, comme lors de l'immunisation contre les antigènes de la zone pellucide des ovocytes, un transsudat de sérum contenant des anticorps spécifiques et présents dans l'oviducte pourrait suffire à fournir un haut niveau d'immunocontraception. Cependant, la capacité à générer une réponse locale, au niveau de la muqueuse, à proximité du site de fécondation, seule ou en combinaison avec une réponse systémique, pourrait être essentielle pour aboutir à un contrôle vaccinal totalement efficace de la fécondation. Des éléments de l'immunité à la fois humorale et cellulaire sont présents dans les tractus reproducteurs du mâle et de la femelle, comme ils seront décrits ci-dessous, et procurent une protection sans compromettre la reproduction à long terme.

1. Organisation du système immunitaire local au niveau du tractus génital.

Les éléments responsables de la production d'anticorps sécrétoires sont présents sur la majeure partie du tractus reproducteur du mâle et de la femelle de nombreuses espèces, bien qu'il soit difficile de mettre en évidence la présence de tissus lymphoïdes organisés, si l'on excepte la présence de nodules au niveau du vagin chez la femelle (Quayle et Anderson, 1995).

Chez les femelles, le nombre de cellules T est faible dans le vagin et au niveau de l'orifice externe du col de l'utérus, mais les cellules T CD4+ et CD8+ sont très nombreuses dans l'endomètre et dans la zone de transformation du col de l'utérus (Edwards et Morris, 1985). Les cellules de Langerhans et d'autres cellules présentatrices d'antigènes sont également présentes dans la partie basse du tractus reproducteur, particulièrement au niveau du col de l'utérus et de la vulve. Des cellules issues du plasma, à action locale, sont retrouvées en grand nombre à proximité de l'épithélium vaginal, du col de l'utérus et de l'oviducte, mais sont rarement retrouvées au niveau des ovaires ou de l'endomètre. Elles secrètent majoritairement des anticorps de l'isotype A, bien que des cellules productrices d'IgG et d'IgM soient aussi présentes. Des composants sécrétoires sont également exprimés par les cellules épithéliales en différents sites du tractus. Les sécrétions cervicales contiennent de fortes concentrations en IgA sécrétoires (IgAs) et en IgG (provenant principalement du sérum) selon un ratio d'environ 1:2.

On connaît moins bien le système immunitaire du tractus génital mâle, bien que les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules B, les cellules T porteuses de l'intégron $\alpha E\beta 7$, qui se trouve exclusivement sur les lymphocytes à action locale, et les cellules épithéliales capables de synthétiser des composants sécrétoires soient tous présents (Miller et al., 1992). Le tractus mâle contient également des cellules plasmiques sécrétrices d'IgA ; des IgA, IgG et IgM ont été mises en évidence dans la première phase de l'éjaculat, alors que des IgA sécrétoires spécifiquement dirigées contre un certain nombre de pathogènes locaux ont été détectées dans le liquide séminal d'individus infectés (Quayle et Anderson, 1995).

2. Par quelle voie stimuler le système immunitaire local génital.

Plus d'informations sont maintenant disponibles en ce qui concerne la nature des réponses systémique et locale potentiellement importantes pour l'immunocontraception

générée après différents types d'immunisation (Quayle et Anderson, 1995). En général, il apparaît que la stimulation immunitaire du col de l'utérus ou du vagin peut mener à une production locale en IgA spécifiques, et à la présence d'IgG dans l'utérus provenant du sérum. Des anticorps peuvent également être retrouvés dans le tractus génital après une immunisation intrapéritonéale et cela est probablement dû à la présence d'antigènes au niveau des ganglions lymphatiques et/ou à la stimulation de populations cellulaires B1 péritonéales (Pecquet et al., 1992).

Une immunisation par voie rectale pourrait également mener à générer une réponse en IgA au niveau vaginal (Haneberg et al., 1995), probablement grâce aux ganglions lymphatiques drainant ces tissus (Quayle et Anderson, 1995).

La combinaison d'une primovaccination orale et d'un rappel par voie vaginale avec une sous unité vaccinale contre le virus de l'immunodéficience simienne induit une réponse en IgA locale et IgG, en IgA et IgG du sérum et en cellules T au niveau des ganglions lymphatiques drainant le tractus génital (Lehner et al., 1993). De tels protocoles doivent probablement leur efficacité à l'activation et à la migration de cellules lymphoïdes au niveau du tractus gastro-intestinal suite à l'immunisation par voie orale, et au rappel local fournissant une spécificité antigénique locale encore plus importante et/ou un signal prolifératif (Quayle et Anderson, 1995). La circulation d'immunocytes sensibilisés issus des tissus lymphoïdes GALT au niveau du tractus génital (Mestecky, 1987) pourrait être exploitée en vue d'optimiser la réponse locale, bien que plus d'informations soient nécessaires en ce qui concerne les restrictions possibles des migrations cellulaires des tissus GALT aux tissus reproducteurs à cause de la compartimentation de ce système (Czerkinsky et al., 1995).

Un rappel oral annuel constituerait une alternative attractive au rappel par voie génitale, aussi bien d'un point de vue financier que du point de vue de la facilité d'administration. Une immunisation orale réussie implique la persistance de l'antigène au niveau du tractus gastro-intestinal, une distribution efficace pour la présentation au GALT et le développement d'une réponse immunitaire appropriée. La majorité des recherches actuelles se dirige dans cette direction, en vue d'obtenir une réponse humorale au niveau du tractus reproducteur, particulièrement suite au rappel, d'une durée d'action appropriée pour une immunocontraception efficace.

Les microsphères biodégradables, les complexes stimulant l'immunité (ISCOMS), les liposomes et les vecteurs bactériens vivants ou viraux sont tous étudiés pour leur capacité à libérer une batterie d'antigènes afin de générer des réponses locales de longue durée, principalement via la voie orale. Certaines des caractéristiques de ces vecteurs sont

mentionnées dans le tableau 2. De plus, la toxine cholérique, les toxines diphtérique et tétanique, les cytokines, les hybrides de systèmes de libération et les adjuvants ont également été essayés pour améliorer le développement d'une immunité locale induite par la vaccination (Alistair et al., 1997).

Certaines de ces approches sont maintenant appliquées dans le cadre de l'immunocontraception et il convient d'étudier ces adjuvants qui permettraient d'optimiser la réponse immunitaire notamment au niveau local.

B. Amélioration de la réponse immunitaire par les cytokines dans le cas de l'immunocontraception.

La réponse cellulaire n'est pas à rechercher et l'objectif va être d'obtenir une réponse en anticorps maximale et ciblée vers les tissus reproducteurs.

Une immunocontraception efficace va probablement nécessiter le développement d'une réponse en anticorps à la fois forte et durable soit au niveau systémique, soit au niveau de la muqueuse génitale (action locale). Les anticorps circulants pourraient bloquer le fonctionnement des hormones ou prendre les gamètes comme cible, mais l'inhibition la plus efficace de la reproduction sera probablement acquise par la présence d'anticorps au niveau du tractus reproducteur. La vaccination entraînant une réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les antigènes de la reproduction apparaît comme moins importante et pourrait, en fait, conduire à des dégâts potentiels et non désirés par réaction auto-immune entraînant des destructions tissulaires.

Il apparaît que les antigènes nécessitent d'être administrés avec des adjuvants puissants afin d'arriver à un titre d'anticorps hautement spécifiques suffisant. L'obtention d'une réponse maximale en anticorps peut passer par l'induction de cytokines de type interleukines (IL) qui induisent préférentiellement une réponse humorale.

Les cytokines sont des molécules hormones-like produites par des cellules du système immunitaire, jouant un rôle crucial en déterminant à la fois le type et l'amplitude de la

<i>Microorganismes infectieux</i>	<i>Microsphères biodégradables</i>	<i>ISCOMS</i>	<i>Adjuvants possibles</i>
Comprend les vecteurs viraux et bactériens	Particules de 5-10µm de diamètre retenues au niveau des plaques de Peyer	Liposomes	Toxine cholérique
Colonisation et		Vaccins hybrides Plasmides ADN	Toxines tétanique et diphtérique

réplication	Transformation nécessaire par les organismes vivants		Cytokines
Provoque une stimulation antigénique	Réponse 500 fois plus élevée qu'avec des antigènes libres.		
Forte réponse systémique et locale	La voie locale donne une réponse à la fois systémique et locale		
Peut également coder pour des adjuvants (par exemples des cytokines)			
Nécessite une transmission spécifique à la cible			

ISCOMS : immune-stimulating complexes (complexes stimulant le système immunitaire).

Tableau 2 : Vecteurs et transporteurs pour l'immunisation par voie orale. (D'après Alistair et al., 1997)

réponse immunitaire. Les cellules T-helper de type 2 (Th2) secrètent les interleukines 4 (IL-4), IL-5, IL-6 et IL-10, qui stimulent la croissance et la différenciation des cellules B et induisent préférentiellement la réponse immunitaire humorale. Des approches moléculaires furent utilisées pour étudier le rôle de ces facteurs dans le développement de la réponse immunitaire *in vivo* et pour montrer qu'ils peuvent jouer un rôle important en tant qu'adjuvants naturels des cellules B, capables d'améliorer la réponse en anticorps spécifique de l'antigène, particulièrement au niveau de la muqueuse, lorsqu'ils sont libérés comme composants de différents systèmes d'action à distance. Cette partie décrit des découvertes

récentes concernant les cytokines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire (particulièrement au niveau de la muqueuse), en vue d'optimiser la réponse immunitaire prépondérante lors de l'immunocontraception et de trouver des systèmes vecteurs pour délivrer antigènes et cytokines afin d'obtenir une réponse immunitaire plus efficace.

1. Réponse au niveau local et/ou systémique.

Les réponses en anticorps sont caractérisées par la production d'immunoglobulines de différents isotypes, de nature et de site d'expression différents. Les réponses par voie systémique sont généralement médiées par des anticorps d'isotypes IgG qui sont les molécules effectrices principales, contrairement aux anticorps de la muqueuse qui sont principalement des isotypes IgA sécrétoires et qui représentent la défense initiale contre les pathogènes, étant donné que la majorité des antigènes rentrent en contact avec l'organisme en premier lieu à ce niveau. Les réponses en anticorps au niveau des muqueuses, incluant celles du tractus reproducteur, sont connues pour leur courte durée mais les détails concernant la présentation de l'antigène au niveau de la muqueuse, la migration de l'immunité cellulaire et les autres événements de régulation de l'immunité sont peu connus. Cependant, il y a plus d'intérêts à l'heure actuelle à réaliser des recherches pour une vaccination visant à obtenir une réponse immunitaire au niveau de la muqueuse, particulièrement au vu de leur importance dans le contrôle de la fécondation.

La plupart des cellules productrices d'IgA se situent dans les muqueuses associées à des tissus lymphoïdes (MALT) comme les plaques de Peyer au niveau de l'intestin ; ces MALT sont le lieu où se fait la première rencontre avec l'antigène puis la production d'IgA (Mestecky et McGhee 1987). Les cellules ThCD4⁺ du MALT jouent un rôle crucial dans l'induction de la réponse en IgA de la muqueuse (Kawanishi et al., 1983). Les cytokines

Cytokine	Effets sur la production et/ou sécrétion d'immunoglobuline
IL-2	Augmente la production générale en immunoglobuline

IL-4	Augmente IgG1 ^A , IgGE ^A , IgGA ^A Diminue IgG2a, IgG2b, IgG3
IL-5	Augmente IgM, IgG, IgA locaux
IL-6	Augmente IgAA locaux et/ou IgG, IgG systémiques
IL-10	Augmente IgM et IgG
IFN- γ	Augmente IgG2a ^A Diminue IgG1, IgG2b, IgG3, IgE

^A Les cytokines sont importantes voire indispensables à la production de ces isotypes.

IL : Interleukine

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

Tableau 3 : Cytokines influençant la production et/ou la sécrétion d'isotypes d'anticorps chez la souris.(D'après Alistair et al., 1997)

sécrétées par les cellules T et d'autres cellules du système immunitaire jouent un rôle majeur à différents niveaux des réponses par voie systémique et locale.

Les cytokines jouent un rôle crucial dans la communication entre les cellules du système immunitaire et dans la détermination du type et de l'amplitude de la réponse immunitaire. On distingue deux sous-groupes de cellules T helper selon les cytokines qu'elles synthétisent ; ces différents profils de synthèse pourraient expliquer le rôle important joué par ces facteurs dans la régulation de l'immunité (Mossman et Coffman, 1989). Un premier sous groupe de cellules, appelées Th1, secrètent l'IL-2, l'interféron- γ (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumoral α (TNF- α). En général, les fonctions assurées par les Th1 sont des activités

toxiques. Ainsi, une réponse immunitaire basée sur les Th1 sera plus appropriée pour une défense vis-à-vis de virus et d'autres pathogènes intracellulaires. En revanche, l'assistance des cellules B pour la production d'anticorps est assurée par les cellules de type Th2. Les interleukines IL-4, IL-5 et IL-6 sont sécrétées par les Th2. Ces interleukines semblent induire préférentiellement une réponse humorale avec des isotypes IgG1, IgE et IgA en fortes concentrations (Mosmann et al., 1991). Les cellules Th2 produisent également des facteurs qui inhibent la synthèse d'IFN- γ par les cellules Th1 alors que IFN- γ inhibe à la fois la prolifération et l'activité des cellules Th2.

Au cours du processus d'immunocontraception, il faut donc essayer de privilégier les réponses en Th2.

2. Rôle des cytokines de type 2.

Des données provenant d'études réalisées *in vitro* et *in vivo* dans un grand nombre d'espèces confortent l'idée d'un rôle majeur de certaines cytokines, particulièrement les facteurs de type Th-2, dans le développement de la réponse immunitaire. Leur influence sur la production de différents isotypes d'anticorps murins est résumée dans le tableau 3. Les facteurs de type 2, IL-4, IL-5 et IL-6 semblent être particulièrement importants dans la régulation de la réponse immunitaire au niveau des muqueuses (réponse locale). Les cellules Th2 sont nombreuses dans les muqueuses (Taguchi et al., 1990). Un messenger stimulant la production des IL-4 et IL-5 est détecté au niveau des plaques de Peyer et les trois facteurs (IL-4, IL-5 et IL-6) sont fortement exprimés au site de production des IgA de la lamina propria. On a montré que l'IL-4 est un facteur important d'orientation du type de synthèse d'Ig par les cellules B muqueuses. Plutôt que des IgM⁺ de surface, IL-4 favorise l'expression d'IgA de surface chez la souris (Ehrhardt et al., 1992) et chez l'homme (Islam et al., 1991). L'IL-4 est un facteur de transformation (switch factor). L'IL-5 murine ne possède apparemment aucune activité sur les cellules B muqueuses immatures mais peut jouer un rôle seule (Beagley et al., 1995), ou en synergie avec l'IL-4 (Murray et al., 1987) ou l'IL-6 (Kunimoto et al., 1989) pour promouvoir le développement d'IgA⁺ muqueux par les cellules B *in vitro*. Ainsi, l'IL-5 est plus considérée comme un facteur de différenciation terminal qu'un facteur de transformation pour la production d'IgA, bien qu'il n'y ait pas de preuve directe qu'il joue normalement un tel rôle *in vivo*. L'IL-6 améliore également la production d'IgA *in vitro* par les cellules B productrices d'IgA (Beagley et al., 1989) ; la présence en grand nombre de cellules contenant l'ARNm d'IL-6 au niveau de la muqueuse intestinale (Bao et al., 1993) suggère également

que l'IL-6 joue un rôle important dans la régulation de la réponse en IgA. Lorsqu'on injecte l'IL-5 et l'IL-6 dans des glandes lacrymales murines, on améliore les réponses locales en IgA (Pockley et Montgomery, 1991).

Les cytokines de type 2, particulièrement l'IL-5 et l'IL-6, jouent donc un rôle important dans l'activation antigénique des cellules B productrices d'IgA au niveau local (muqueuses).

En conséquence, ces facteurs sont des candidats qui valent la peine d'être testés comme adjuvants pour favoriser la réponse humorale au niveau systémique et local, notamment celle qui présente une importance pour une immunocontraception réussie.

C. Voie d'administration de l'antigène : libération par un vecteur des antigènes et cytokines jouant le rôle d'adjuvant.

La stimulation du système immunitaire locale est fondamentale mais la mise en place de rappel par voie locale est difficile à mettre en œuvre. Ainsi, le choix de la voie d'administration, notamment en ce qui concerne l'animal sauvage qui constitue une cible d'avenir pour l'immunocontraception, tient une place particulièrement importante dans la stimulation du système immunitaire.

L'amélioration de l'amplitude et de la durée de la réponse systémique spécifique en IgG et de la réponse locale spécifique en IgA présente des intérêts majeurs pour une vaccination immunocontraceptive. A cette fin, un modèle murin a été établi chez lequel il est possible de tester l'intérêt des cytokines de type 2 dans l'amélioration de la réponse immunitaire à un vaccin. Cela a impliqué la réalisation et le testage d'une batterie de vecteurs réplicatifs et non réplicatifs qui co-expriment les gènes de cytokines et le gène de l'hémagglutinine (HA) du virus influenza A/PR/8/34 (Ramshaw et al., 1992).

En effet, les tentatives de modification des réponses immunitaires par l'administration de cytokines recombinantes se heurtent à des difficultés concernant l'émission de ces facteurs au niveau des sites de réaction immunitaire et à leur courte demi-vie *in vivo*. Une solution

peut être de modifier des virus de façon à les rendre capables de produire ces cytokines qui seront sécrétées par les cellules infectées à forte concentration. Le virus de la vaccine et d'autres poxvirus vecteurs maintenant développés ont la capacité de transporter une quantité suffisante d'ADN hétérologue pour coder de nombreux gènes, et de permettre une transcription et une traduction fidèles de ces gènes insérés ainsi que des modifications et un transport post-traductionnel appropriés (Moxx et Flesner 1987). Ces virus modifiés peuvent donc permettre une production prolongée et à fortes concentrations des antigènes désirés dans les cellules hôtes.

Ainsi par exemple, le gène HA associé avec des gènes codant pour des cytokines de type 2 a été intégré dans un virus de la vaccine recombinant (rVV), dans un poxvirus de la dinde (FPV = fowl pox virus) et des vecteurs plasmidiques en vue d'améliorer la réponse humorale systémique et locale. Les cytokines de type 2 intégrées dans les vecteurs rVV augmentent 5 à 10 fois la réponse locale en IgA et la réponse en IgG contre HA. Des immunocytes pulmonaires sécrétant des anticorps spécifiques envers la glycoprotéine HA co-exprimée étaient d'efficacité significativement améliorée chez des souris à qui l'on avait injecté un virus de la vaccine modifié par intégration du gène de l'IL-5 en comparaison à celles ayant reçu le virus témoin (Ramsay et Kohonen-Corish, 1993). Le pic de réponse est obtenu le quatorzième jour après infection et présente des titres quatre fois plus élevés que la réponse observée chez les témoins ; de plus, la réponse ne commence à décliner que le 28^{ième} jour, c'est-à-dire plus tard que chez les témoins. Des titres quatre fois plus élevés en IgAs furent mis en évidence dans le liquide pulmonaire de souris surexprimant l'IL-5 ou l'IL-6 (Ramsay 1995). Ainsi, à la fois l'IL-5 et l'IL-6, lorsqu'elles sont exprimées dans des rVV répliquatifs, sont des stimulants efficaces de la réponse en IgA locale spécifique de l'antigène.

Immunisation intra-nasale (10 ⁷ unités formant plaques)	Production d' anti-corps anti lymphoïdes pulmonaires IgG	HA par 10 ⁶ cellules : IgA
Jour 14 :		
FPV-HA	5,5	3,0
FPV-HA-IL-2	5,0	3,2
FPV-HA-IL-6	38,9	30,6

Jour 28 :

FPV-HA	11,4	9,5
FPV-HA-IL-2	15,9	10,2
FPV-HA-IL-6	93,3	15,6

HA : Hémagglutinine

FPV : Fowl Pox Virus (Pox Virus de Dinde)

IL : Interleukine

Tableau 4 : Les réponses en anticorps spécifiques sont améliorées par l'interleukine-6 (IL-6) co-exprimée avec le dène HA dans un vecteur fowlpoxvirus (FPV). (D'après Alistair et al., 1997)

Cependant, l'IL-5 apportée de cette manière ne semble pas affecter les réponses locales en IgG ou la réactivité systémique

Le FPV est un autre poxvirus actuellement testé comme vecteur vaccinal présentant un nombre hautement réduit d'espèces hôtes. Cela lui confère l'avantage potentiel d'avoir une réplication bloquée dans les cellules de mammifères, bien que les gènes hétérologues intégrés dans ce vecteur sous le contrôle de promoteurs précoces soient exprimés, entraînant la présentation du gène vaccinal au système immunitaire (Somogyi et al., 1993). La capacité des rFPV à libérer l'IL-6 comme adjuvant des réponses systémique en IgG et locale en IgA fut étudiée et une augmentation marquée de ces réponses fut mise en évidence (Leong et al., 1994). Des réponses à la fois fortes et spécifiques en IgA et IgG furent mises en évidence sur des poumons de souris à qui l'on avait administré un inoculat intra nasal de FPV-HA-IL-6. Ces réponses étaient 10 fois plus élevées que celles détectées chez les souris témoins à qui l'on avait administré le FPV exprimant l'IL-2 (tableau 4). Les réponses, déjà importantes au 14^{ième} jour après l'immunisation, étaient toujours élevées au 28^{ième} jour chez les souris ayant

reçu FPV-HA-IL-6, particulièrement le nombre de cellules sécrétrices d'IgG spécifiques. La réactivité est encore plus importante lorsque les souris reçoivent un rappel de FPV-HA-IL-6, seul ou associé à une dose sub létale de virus influenza homologue de souche sauvage (Leong et al., 1994).

Les plasmides ADN (ADN nu ou vaccin acide nucléique) représentent de nouveaux vecteurs prometteurs en matière de vaccination. Les caractéristiques de ces vecteurs de synthèse dans le cadre de l'amélioration de la réponse vaccinale ont été décrits en détail (Fynan et al., 1993 ; Leong et al., 1995 ; Pardoll et Beckerleg, 1995). Les plasmides ADN sont non répliatifs, non infectieux, ne s'intègrent pas au génome et sont stables et faciles à préparer à coût réduit comparativement à d'autres vecteurs ou protéines immunogènes. De nombreux gènes peuvent être exprimés par le biais de ces vecteurs synthétiques et de nombreuses voies d'inoculation ont montré leur efficacité (comprenant une administration locale directe). Finalement, des réponses immunitaires systémiques de longue durée ont pu être générées dans de nombreuses espèces après une immunisation par l'ADN, avec un développement précoce d'une haute affinité des anticorps. La principale caractéristique du plasmide ADN est peut-être sa capacité à persister dans l'hôte avec une présentation prolongée des antigènes, permettant d'obtenir une réponse immunitaire de plus longue durée. Les vaccins ADN ont été plus souvent administrés par voie intra-musculaire ou intra-dermique (approche du « gène pistolet »), mais ont également conféré une protection chez les

ADN conjugué à :	Effets qui pourrait améliorer la production en anticorps spécifiques
Anticorps anti-MHC classe II	Liaison aux récepteurs des APC
Anticorps ciblant FR	Liaison aux récepteurs des APC
Fragment de complément C3d	Liaison aux récepteurs des APC
Liposomes	Recrutement et absorption par les macrophages

Toxine cholérique, pili	Absorption par les cellules immunitaires locales
Protéines complexes qui ressemblent aux virions (ISCOMS, transposons)	Ciblant les récepteurs multivalents sur APC (immunoglobulines)

MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité
FR : Fragment du récepteur sur l'immunoglobuline
ISCOMS : complexes stimulant le système immunitaire

Tableau 5 : Amélioration de l'immunogénicité par ciblage du vaccin ADN vers les cellules présentatrices d'antigènes (APC). (D'après Alistair et al. 1997)

souris lorsque ce vaccin est administré par voie intra nasale avant une épreuve pathogène au virus influenza (Fynan et al., 1993). Les HA codant au sein des ADN plasmiques conduisent à une réponse humorale maintenue après plusieurs mois chez la souris lorsque le vecteur est administré par la technique du « gène pistolet » ou par voie intra musculaire (Leong et al., 1995). Il a été également possible de placer des gènes codant pour les cytokines de type 2 au sein des plasmides ADN et d'observer une nette amélioration des réponses. De plus, des réponses à la fois plus fortes et plus durables sont obtenues lorsque l'on combine la vaccination ADN à un rappel avec un FVP codant pour le même antigène HA, probablement grâce à la persistance des deux vecteurs chez l'hôte (Leong et al., 1995). Un défi majeur est maintenant de tester les capacités du vaccin ADN, administré seul ou avec un vecteur FVP dans des programmes de vaccination consécutifs, pour stimuler la réponse locale après une libération systémique et/ou locale de l'antigène ; mais aussi de tester les capacités d'amélioration de ces réponses par les cytokines exprimées simultanément. L'optimisation de telles réponses peut aussi passer par le choix d'antigènes auxiliaires connus pour intervenir dans le fonctionnement des cellules présentatrices d'antigènes (tableau 5).

L'approche moléculaire présentée ci-dessus a permis d'étudier le rôle des cytokines dans le développement de la réponse immunitaire *in vivo* et de montrer qu'elles sont des adjuvants naturels des cellules B, capables d'améliorer la spécificité antigénique de la réponse humorale, particulièrement au niveau local ; ces adjuvants doivent être administrés via des vecteurs viraux ou plasmidiques. De telles réponses, au niveau local, sont difficiles à atteindre mais sont indispensables à une immunocontraception efficace. Ces études fournissent une base pour poursuivre les recherches sur la libération directe des antigènes et des adjuvants en vue d'une immunisation à la fois locale et systémique. Cette stratégie semble être appropriée non seulement pour l'immunoprophylaxie contre les maladies, mais aussi en vue de l'immunocontraception. Si la glycoprotéine HA employée par Leong et al. (1995) comme antigène vaccinal induit seule classiquement une réponse forte, un titre élevé en anticorps peut également être obtenu grâce à la coexpression de cytokines de type 2 contre des antigènes qui n'induisent que peu ou pas de réponse lorsqu'ils sont exprimés sans facteur adjuvant. Ceci est intéressant pour l'immunocontraception qui utilise des antigènes purifiés faiblement immunogènes. La prévention de réponses immunitaires potentiellement dommageables, comme les destructions ovariennes auto-immunes médiées par les cellules T, est un autre avantage possible offert par la co-expression de ces facteurs dans les vaccins contraceptifs :

Figure 4 : Evolution du taux sérique moyen des anticorps anti-GnRH selon le type d'antigène utilisé (D'après Chaffaux et al., 1985).

en effet, les cytokines surexprimées dévieraient l'activité du système immunitaire de T vers B. Ainsi l'IL-4 intégrée dans un vecteur diminue la réponse cellulaire *in vivo* (Sharma et al., 1996). Finalement, améliorer la réponse humorale du vaccin en lui conférant une spécificité d'espèce médiée par les cytokines chez l'hôte est également réalisable. La spécificité d'espèce des cytokines est variable. En ce qui concerne leur rôle dans le développement des cellules B et de la réponse humorale, l'IL-4 est hautement spécifique, alors que l'IL-5 murine,

contrairement à l'IL-5 humaine, est responsable de nombreuses réactions croisées dans différentes espèces. L'IL-6 humaine favorise également le développement de cellules B issues de singes, rats et souris, mais l'IL-6 murine est inactive sur les cellules B humaines (Alistair et al., 1997).

D. Résultats immunologiques actuels de l'immunocontraception.

1. Résultat immunologiques de la stimulation du système immunitaire obtenus avec la GnRH.

Du fait de son faible poids moléculaire (1182,32 D), la gonadolibérine est peu immunogène. Or Chaffaux et al. (1985) ont constaté que, dans toutes ces expérimentations, un taux élevé d'anticorps anti-GnRH était indispensable à l'apparition des effets biologiques et zootechniques.

La figure 4 indique l'évolution du taux d'anticorps anti GnRH pour les trois lots d'agneaux dans l'expérience de Chaffaux et al. (1985). Ce taux est exprimé en pourcentage de liaison. Pour les agneaux du lot 2, immunisés avec de la gonadolibérine couplée à la thyroglobuline en émulsion dans de l'adjuvant de Freund, le taux sérique moyen des anticorps atteint 74% après la 3^{ème} immunisation et 88% après la 4^{ème} immunisation. Il reste élevé jusqu'à la 38^{ème} semaine.

Le pourcentage de liaison obtenu dans le lot immunisé avec la GnRH seule ne diffère pas significativement de celui du lot témoin. Pour ces deux lots, le pourcentage de liaison oscille entre 6 et 17%. Ce qui souligne l'importance du mode de préparation de la GnRH compte tenu de son faible pouvoir immunogène.

L'immunisation active des agneaux mâles à l'aide de la gonadolibérine couplée à la thyroglobuline en émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund a donc fait apparaître dès la 3^{ème} immunisation un taux important d'anticorps spécifiques chez tous les animaux. Ceci correspond aux résultats obtenus par Jeffcoate et al. (1992).

Seuls le délai d'apparition et la durée de maintien de la concentration élevée d'anticorps varient individuellement, ce qui explique les variations globales observées pour les mensurations testiculaires et les taux hormonaux périphériques.

Dans tous les cas, un taux détectable d'anticorps dans le sérum périphérique n'apparaît qu'après deux immunisations successives. Pour maintenir ce taux pendant plus de 3 à 4 semaines, il est toujours nécessaire d'administrer des injections de rappel, sinon il diminue assez rapidement (2 à 3 semaines). Cependant après plusieurs rappels un taux constant se maintient pendant 2 à 5 mois.

La gonadolibérine administrée seule, ainsi que le porteur émulsifié dans l'adjuvant et administré sans GnRH, n'ont jamais pu faire apparaître d'anticorps anti-GnRH circulants. Ceci prouve, d'une part, l'absence d'immunogénicité de la gonadolibérine et donc la nécessité d'un porteur et (ou) d'un adjuvant, et d'autre part, la spécificité des anticorps anti-GnRH quand ils sont obtenus après couplage.

La gonadolibérine est un haptène dont les déterminants antigéniques sont indispensables à l'induction de l'apparition d'anticorps anti-GnRH mais qui doit être couplé à un porteur pour acquérir un caractère immunogène. Le porteur est donc indispensable et l'adjuvant ne fait qu'augmenter la réponse immunitaire.

La spécificité des anticorps est par ailleurs prouvée par la technique de dosage radio immunologique à l'aide de la gonadolibérine marquée à l'iode ¹²⁵ (Carelli et al., 1982). Le transfert des anticorps anti-gonadolibérine à des animaux non immunisés a fait apparaître une réaction biologique spécifique. Des anticorps anti-gonadolibérine obtenus chez des rattes, injectés à des hamster femelles en pro œstrus, inhibent l'apparition de l'œstrus. Cette inhibition est levée par l'administration de gonadolibérine (Takahashi et Yoshinaga, 1974). En effet, cette hormone sature les sites anticorps transmis passivement et son excès est responsable de l'apparition de l'œstrus.

Par ailleurs, à cause des variations individuelles constatées dans le délai d'apparition et la durée de maintien trop faible d'un fort taux d'anticorps anti-gonadolibérine, la mise en application pratique de cette castration immunologique paraît actuellement difficile.

Il convient donc de tester d'autres adjuvants et d'autres protéines porteuses ainsi que d'autres protocoles d'immunisation afin d'obtenir des résultats homogènes, plus facilement programmables et compatibles avec les impératifs zootechniques et sanitaires de l'élevage. C'est dans cette optique que Carelli et al. (1982), ont essayé, chez la souris, un vaccin entièrement synthétique (GnRH couplé à la MDP lysine) et que Robertson et al. (1987) ont utilisé comme adjuvant une émulsion d'huile minérale chez le veau. Dans cette dernière expérience, Robertson et al. ont utilisé de la GnRH (2 mg) conjuguée à la toxine tétanique (4

ml) pour les deux premières immunisations puis de la GnRH couplée à de la thyroglobuline (3 mg) pour les 3^{ième} et 4^{ième} immunisations. Le tout étant, à chaque fois, émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund, qui constitue l'adjuvant de la préparation. Ce protocole fut testé sur deux taurillons (no. 1 et no. 2, figure 5). La réponse en anticorps apparaît à compter de la troisième immunisation. L'augmentation du niveau de testostérone apparaît à compter du 6^{ième}-7^{ième} mois qui correspond à la puberté. Le niveau de testostérone chute après la 3^{ième} immunisation et correspond à l'augmentation du titre en anticorps. La réponse est plus importante chez le taurillon No.1. Chez le second taurillon, l'immunisation est efficace pour une période d'environ 15 mois, ce qui est tout à fait satisfaisant. Ainsi, ce mode de préparation de la GnRH, couplée à l'adjuvant de Freund permet l'obtention d'une réponse en anticorps exploitable pour l'immunocontraception (Robertson et al., 1987).

Des essais dans ce sens se poursuivent en médecine vétérinaire.

2. Résultat immunologiques de la stimulation du système immunitaire obtenus avec la PH-20.

Pour étudier l'immunogénicité de la protéine, la PH-20 recombinante de lapin produite par le système FLAG a été utilisée afin d'immuniser des lapins femelles et mâles ainsi que des souris femelles (Holland et al., 1997).

Dans tous les cas, l'injection de PH-20 provoque une réponse immunitaire dans le sérum qui est principalement une réponse en immunoglobulines G (IgG). En réalisant des rappels sous-cutanés répétés, des titres sériques de 10^5 - 10^6 peuvent être atteints. Cet antisérum réagit autant par immunofluorescence sur des spermatozoïdes fixés que par Western blot sur des extraits de spermatozoïdes de lapin. La protéine recombinante est, à l'évidence, immunogène pour les deux sexes chez le lapin et chez les femelles souris, c'est-à-dire à l'origine d'une réponse immunitaire vaccino-induite.

Des essais limités ont été conduits en utilisant la protéine immunocontraceptive chez des lapines. La protéine recombinante était produite en utilisant le système FLAG

Figure 5 : Effets de l'immunisation (flèches) contre la GnRH sur le niveau sérique de testostérone (courbe -●-) et le volume testiculaire (courbe -○-) de deux taurillons. La courbe supplémentaire indique le titre en anticorps (d'après Robertson et al., 1987).

purifiée par la technique de chromatographie par immunoaffinité. Dix femelles furent immunisées par voie sous-cutanée avec 400 µg de protéine recombinante purifiée dans de l'adjuvant complet de Freund et trois injections de rappel de 200 µg de protéine avec adjuvant de Freund, furent réalisées. Un groupe témoin traité avec de l'adjuvant seul fut élevé en parallèle. Les titres sériques furent mesurés et montrèrent une réponse claire à l'immunisation

par rapport aux témoins. L'antisérum, ou anticorps sérique, issu des femelles immunisées contre la PH-20 obtenu une semaine avant l'accouplement, est titré par des épreuves en phase solide utilisant des extraits de cellules spermatiques, précédemment utilisées comme antigène. Le titre sérique en anticorps initial est similaire quelque soit la quantité de PH-20 injectée. L'antisérum issu des femelles infertiles montre un haut degré de liaison qui commence à décroître de manière significative à partir de la dilution 10^{-4} et reste mesurable jusqu'à la dilution 10^{-8} (tableau 6).

Cette étude montre le caractère à la fois réversible et dénué d'effets secondaires de l'immunisation anti-PH-20 chez la femelle lorsque l'antigène est convenablement purifié (Holland et al., 1997).

3. Résultat immunologiques de la stimulation du système immunitaire obtenus avec la pZP3.

Une réponse par IgG peut être induite par une administration systémique en antigène pZP3 et un adjuvant. Le niveau d'IgG anti-pZP3 du sérum augmente avec des administrations multiples du vaccin. La croissance et la baisse du niveau d'IgG du sérum peuvent être utilisées exclusivement comme indicateurs du succès du vaccin, ou également comme indicateur au niveau de la fertilité. En effet, le niveau d'IgG est corrélé avec l'infertilité (Saco et al., 1987 ; Liu et al., 1989 ; Kirkpatrick, 1995). Lorsque le niveau d'IgG tombe à un niveau nul, il n'y a plus de liaison à la ZP et la fécondation est restaurée (Kirkpatrick et Turner, 1991). Pendant la phase effective de la contraception, les animaux vaccinés présentent des cycles ovariens normaux, avec œstrus et ovulation.

Epreuve de liaison par radio immunologie à l' ^{125}I en microtitre (c.p.m.x 10^{-2})
Dilution de l'antisérum

Antisérum issu d'animaux immunisés avec PH-20 (μg)	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
0 (témoin)	27	5	2	1	1	1	1
5	156	152	120	44	14	5	2

10	150	149	130	66	21	8	4	
20	150	147	128	66	24	10	5	
30	155	148	113	43	13	4	2	
50	142	140	130	64	18	6	2	
Pourcentage d'inhibition de la liaison spermatozoïde-zone pellucide								
Dilution de l'antisérum								
Antisérum issu d'animaux immunisés avec PH-20 (µg)	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵				
0 (témoin)	0	0						
5	92	94	84	58				
10	94	91	63	48				
20	94	94	67	26				
30	92	92	57	50				
50	92	90	72	37				
Liaison de l'antisérum avant le premier accouplement comparée au second accouplement à l'¹²⁵I en microtitre (c.p.m.x10⁻²)								
Dilution de l'antisérum								
Antisérum issu d'animaux immunisés avec PH-20 (µg)	Accouplement	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
0 (témoin)	1 ^{er}	26	6	2	1	1	1	1
	2 nd	25	5	2	1	1	1	1
10	1 ^{er} infertile	144	145	110	40	9	5	3
	2 nd fertile	139	128	59	13	4	4	2
20	1 ^{er} infertile	142	139	105	33	10	6	3
	2 nd fertile	144	129	59	16	6	4	3
30	1 ^{er} infertile	155	144	109	42	14	6	3
	2 nd infertile	152	132	60	14	5	4	2
50	1 ^{er} infertile	142	144	125	59	18	8	3
	2 nd infertile	145	139	104	37	12	8	3

Tableau 6 : Titre en anticorps du sérum issu des femelles cobayes après immunisation anti-PH-20. (Primakoff et al., 1988)

La liaison de l'antisérum, obtenue une semaine avant le premier accouplement et diluée comme indiqué, était mesurée par des épreuves dans une phase solide radioactive (plaque microtitrée) utilisant des extraits OG de spermatozoïdes vivants comme antigène et de protéine A marquée à l'¹²⁵I comme révélateur. Les liaisons non spécifiques étaient évitées avec 3% de lait en poudre écrémé dans du PBS. Les valeurs présentées furent déterminées en dupliquant dans une expérience et étaient issues d'une femelle immunisée (50 µg et 30µg) ou la moyenne de quatre femelles (0 µg), deux femelles (5µg), une femelle du groupe 1 et deux femelles du groupes 2 (10µg) et une femelle du groupe 1 et trois femelles du groupe 2 (20µg). Les femelles du groupe 2 immunisées avec 10 ou 20 µg, présentaient des concentration quelques peu plus élevée que les femelles du groupe 1 immunisées avec 10 ou 20 µg. La capacité des anticorps sériques, dilués comme indiqué, à inhiber la liaison spermatozoïde-zone pellucide des ovocytes de cobaye était mesurée comme décrit précédemment pour les anticorps anti-PH-20mAbs. Les spermatozoïdes, capités pour la réaction acrosomique, étaient pré-incubés avec les anticorps sériques pendant 15-20 minutes et ensuite mis en présence des ovocytes toujours en présence des anticorps sériques dilués. Après 30 minutes, les ovocytes avec les spermatozoïdes liés étaient rincés dans un liquide sans spermatozoïdes, fixés, et le nombre de spermatozoïdes liés à la zone pellucide étaient compté dans un plan convergeant. Le nombre moyen de spermatozoïde par ovocyte était de 16.4+-3.3 en absence d'antisérum dans les 13 expériences du tableau. Le pourcentage d'inhibition est : (le nombre de spermatozoïde liés en présence d'antisérum/ le nombre de spermatozoïde liés en absence d'antisérum)x100. L'antisérum issu des femelles immunisées avec chaque quantité de PH-20 était testé une fois à chaque dilution pour déterminer le pourcentage d'inhibition. L'antisérum issu des femelles témoins était testé à deux reprises à la dilution 10⁻². La liaison de l'antisérum obtenue une semaine avant le premier accouplement ou une semaine avant le second accouplement, dilué comme indiqué, était mesurée comme précédemment. Les valeurs indiquées sont des moyennes déterminées dans deux expériences. La liaison spécifique de c.p.m. à la dilution 10⁻³ est la liaison maximale. Le titre en antisérum est défini comme la dilution à laquelle la liaison c.p.m. est ¼ du maximum.

IV Mécanismes possibles de l'immunocontraception.

A. Mécanisme de l'immunocontraception anti-GnRH.

Le mécanisme exact de l'immunisation anti-GnRH n'est pas élucidé à l'heure actuelle. Il faut noter que très peu d'études sont disponibles à ce jour, en ce qui concerne

l'immunocontraception anti-GnRH. On peut néanmoins supposer que les anticorps anti-GnRH se lient directement à la GnRH et modifient ainsi la conformation de la molécule qui devient incapable de stimuler ses récepteurs au niveau de l'hypophyse.

L'expérience d'immunocontraception anti-GnRH de Chaffaux et al. (1985) démontre l'efficacité de la vaccination anti-GnRH et les auteurs proposent, quant au mécanisme, que l'immunisation fait apparaître des anticorps qui neutralisent la gonadolibérine endogène ainsi que la gonadolibérine exogène et qui agissent aussi bien sur la sécrétion que sur l'excrétion des hormones gonadotropes, LH et FSH.

B. Mécanisme de l'immunocontraception anti-PH-20.

Aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne le mécanisme de l'immunocontraception anti-PH-20. On peut cependant supposer sans prendre trop de risque que les anticorps se lient directement avec les antigènes empêchant leur fonction, bien que l'hypothèse d'un encombrement stérique suite à une liaison à proximité du site de liaison ne puisse être écartée.

Les anticorps polyclonaux anti-PH-20 issues des femelles infertiles bloquent la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide de l'ovocyte *in vitro* (Primakoff et al., 1988). Dans les essais de liaison *in vitro* de Jago et al. (1999) l'inhibition décroît à partir de la dilution 10^{-4} mais reste cependant à un niveau tout à fait significatif à la dilution 10^{-5} (tableau 6).

L'antisérum issu des femelles infertiles immunisées contre la PH-20 reconnaît de manière spécifique la protéine PH-20. Les motifs de marquages obtenus par immunofluorescence avec les sérums à la dilution 10^{-3} obtenus chez les femelles immunisées avec 5 à 50 μg de PH-20 étaient identiques à ceux obtenus avec les anticorps de souris anti-PH-20 : la surface de marquage était limitée à la région de la tête postérieure sur la membrane plasmique de spermatozoïdes après réaction acrosomique. Le sérum des animaux témoins ne présente aucune zone de fluorescence au contact des spermatozoïdes. De plus, l'antisérum

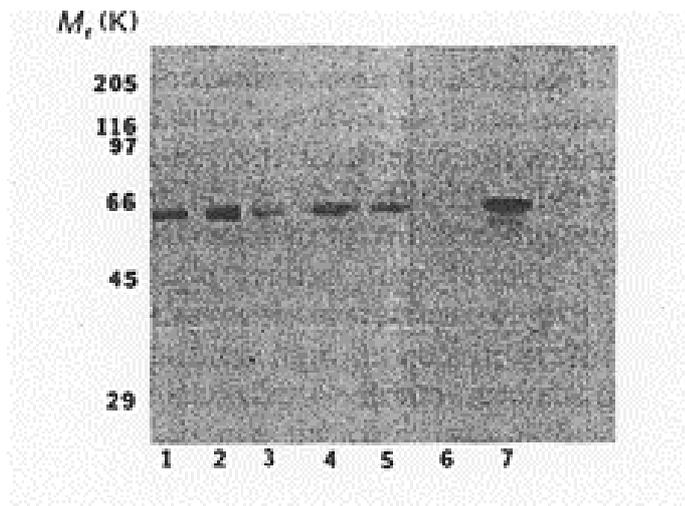


Figure 6 : Marquage par immunoblot d'extrait-SDS de toute la queue de l'épididyme de spermatozoïde et de protéine PH-20 purifiée couplée à l'antisérum issu de femelles immunisées. L'antisérum était issu de femelles immunisées avec les quantités suivantes de PH-20 : ligne 1, 5 μg ; ligne 2, 10 μg ; ligne 3, 20 μg ; ligne 4, 30 μg ; ligne 5, 50 μg ; ligne 6, 0 μg (animal témoin) ; ligne 7, 50 μg . Les échantillons des lignes 1 à 6 étaient des extraits spermatiques entier ; l'échantillons de la ligne 7 était de la PH-20 purifiée. La masse moléculaire relative (K) des protéines de marquage est notée sur la gauche. (D'après Primakoff et al., 1988)

issu des femelles infertiles reconnaît une bande unique en marquage immunoblot d'extraits de spermatozoïdes entiers (Fig.6, ligne 1-5). Cette bande réalise une migration identique à la PH-20 purifiée, d'une masse moléculaire relative de 64 kD lorsque l'on utilise l'antisérum des femelles immunisées à 50 μg (Fig.6, ligne 7). Ce qui permet donc de supposer sans risques

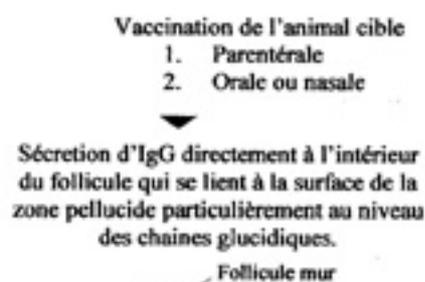
excessifs une identité entre ces molécules. La production d'un haut niveau d'anticorps anti-PH-20 par les femelles immunisées indique que la PH-20 pourrait être reconnue comme un antigène du non soi chez les femelles. Afin de déterminer si la PH-20 est présente sur d'autres tissus que les cellules spermatiques, un grand nombre de différents types de tissus de cobayes femelles ont été testés avec les anticorps anti PH-20 issus des femelles immunisées à 50 µg pour faire des test de liaisons. Aucune liaison ne fut détectable sur les extraits tissulaires. Il a également été démontré par immunoblot que l'antisérum issu des femelles immunisées à 50 µg montre une bande PH-20 lors d'association à des extraits testiculaires ou spermatiques mais aucune bande lors de mise en présence avec les autres tissus (ou des bandes qui étaient également présentes chez les témoins). Ainsi, la PH-20 pourrait posséder un des avantages théoriques de protéine immunogène contraceptive issue de spermatozoïde : elle ne devrait pas être à l'origine de problèmes auto-immuns chez les femelles.

Notons qu'il est remarquable d'observer que ce mode d'immunocontraception fonctionne également chez les femelles. Dans ce cas les anticorps peuvent intervenir à différents niveaux car la PH-20 joue des rôles clefs à différents points du processus de fécondation (cf. I) mais l'émission d'une hypothèse est à laisser aux chercheurs.

C. Mécanisme de l'immunocontraception anti-pZP3.

Le blocage ou l'encombrement stérique des chaînes oligosaccharidiques et/ou de récepteurs protéiques ou la modification chimique de la zone pellucide provoquerait la contraception. De manière spécifique, la production d'anticorps anti-ZP et leur liaison à la zone pellucide aboutirait à l'immunocontraception.

L'antisérum développé contre les protéines pZP empêche l'attachement du spermatozoïde à l'ovocyte de hamster (Gwatkin et al., 1977), de souris et de rat (Tsunoda et Tchang, 1976).



59

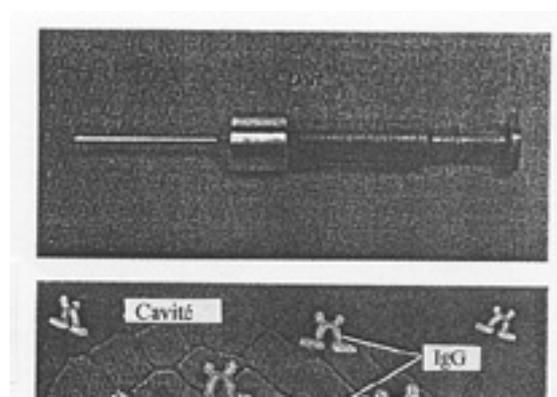


Figure 7 : Schéma de la séquence hypothétique de déviation systématique des molécules IgG au niveau de la surface de la zone pellucide. Les molécules IgG se lient de manière préférentielle aux glucides de surface, et bloquent la reconnaissance et la liaison initiale. De plus, une IgG se lie à la protéine centrale des glycoprotéines de la zone pellucide qui entre en jeu dans l'effet d'infertilité en inhibant la réaction acrosomique. (D'après Barber et al., 2000)

1. Induction d'une réponse par IgG.

La théorie proposée par Barber et al. (2000) est que les anticorps IgG anti-pZP chez l'animal vacciné (Fig. 7) commencent à se lier à la famille des glycoprotéines ZP3 (récepteur

des spermatozoïdes) de la zone pellucide à l'intérieur du follicule pré-ovulatoire. La cible primaire des anticorps est la surface des chaînes oligosaccharidiques. Si l'ovulation a lieu, l'attachement initial des IgG peut être augmenté par addition d'autres anticorps au cours du passage dans l'oviducte. En effet, les IgG sont détectables dans les sécrétions de l'oviducte chez la jument (Widders et al., 1984) et chez le singe rhésus (Yang et al., 1983). Après liaison à la zone pellucide, les anticorps bloquent directement et indirectement (encombrement stérique) la fécondation. Des études préliminaires, basées sur l'utilisation du Western blot, ont montré que les pZP non glycosilés présentent une affinité diminuée d'environ 63% envers les anticorps anti-pZP d'un lapin.

2. Site d'action des anticorps IgG.

L'immunocontraception peut résulter de différents mécanismes. Tout d'abord, les anticorps anti-pZP polyclonaux peuvent agir soit en occupant le récepteur des spermatozoïdes par interaction directe avec les épitopes, soit par interaction avec un site à proximité du récepteur spermatique empêchant toute liaison par encombrement stérique (Henderson et al., 1988 ; Patterson, 1990). Ces hypothèses ont été formulées dès les années 70 (Shiver et al., 1972). Les anticorps, principalement les IgG, ont été mis en évidence sur des follicules ovariens de jument (Gentry et al., 1990) et au niveau de la ZP de lapin souffrant de maladie systémique induite (Albini et al., 1979). Cela démontre que les immunoglobulines de la circulation systémique peuvent pénétrer le follicule ovarien. Cette hypothèse fut confortée par une étude histo-pathologique menée chez des chiennes immunisées par pZP (Mahi-Brown et al., 1988). Une série d'ovaires de chiennes congelés marqués par immunocytochimie, révèle que les IgG se lient aux stades folliculaires terminaux et non aux follicules primordiaux. Un traitement préalable de zone pellucide de truie avec des anticorps anti-pZP3 α (récepteur spermatique primaire chez la truie) inhibe la liaison du spermatozoïde du verrat à la zone pellucide ; contrairement à un traitement préalable à l'aide d'anticorps anti-pZP3 β qui n'inhibe pas la liaison du spermatozoïde (Sacco et al., 1989). Sacco et al. (1981) démontrèrent que l'exposition d'ovocytes de truies, singes et hommes à un antisérum (sérum chargé en anti-ZP) de singe écureuil empêche la liaison homologue du spermatozoïde. D'autres études d'exploration de l'effet immunocontraceptif de pZP menées sur des singes montrèrent que des anticorps issus de singes immunisés avec pZP empêche la liaison du spermatozoïde à la ZP de truie, alors que l'utilisation du sérum de singe avant immunisation (témoin) n'empêche pas la liaison (Suman et al., 1986).

L'utilisation d'anticorps anti-pZP peut, de manière différente, empêcher la pénétration de la ZP par le spermatozoïde sans présenter d'effets sur la liaison à la ZP (c'est-à-dire que la liaison spermatozoïde-ovocyte a lieu normalement), c'est le cas des anticorps monoclonaux anti-ZP2 de la souris (récepteur spermatiques secondaires), et anti-ZP3 (récepteurs primaires) chez la souris (East et al., 1985). Rappelons que les motifs peptidiques et glucidiques servant à la fixation à la ZP3 et ceux servant à l'induction de la réaction acrosomique sont distincts, et qu'ils n'ont été identifiés que chez la souris (cf. I). Mahi-Brown et al. (1985) démontrèrent que le sérum de chiennes immunisées avec pZP inhibe la pénétration de la ZP d'une chienne par un spermatozoïde in vitro. De même des anticorps monoclonaux dirigés contre pZP inhibent la pénétration de la ZP canine par un spermatozoïde canin au cours d'une expérience in vitro (Bamezai et al., 1988). Les anticorps anti-pZP peuvent de manière plausible empêcher la pénétration du spermatozoïde en inhibant le déclenchement de la réaction acrosomiale alors que la liaison spermatozoïde-ovocyte a eu lieu. Si tous les sites d'induction de la réaction acrosomique sont occupés par des IgG spécifiques ou par encombrement stérique, la réaction acrosomique ne pourra pas être induite. La suppression de cette étape cruciale de la fécondation empêche la pénétration du spermatozoïde car aucune enzyme de pénétration de la ZP n'est relarguée. Dans d'autres espèces, les anticorps anti-pZP peuvent également présenter un effet immun contraceptif par un mécanisme identique.

Les Ac anti-ZP induisent donc une contraception soit en bloquant directement les récepteurs spermatiques présents sur la ZP qui permettent la liaison du spermatozoïde, soit en empêchant cette liaison par encombrement stérique, soit en inhibant la réaction acrosomique et donc la pénétration du spermatozoïde. Ces différents mécanismes ne sont pas exclusifs les uns des autres.

3. Modification de la surface de l'épitope suite à la liaison antigène/anticorps.

La liaison des anticorps anti-pZP à la ZP entraîne potentiellement un changement de conformation, donc une altération de la surface de l'épitope. Ceci serait un phénomène analogue à l'altération de la ZP consécutive à la fécondation (Zpf) et bloquant la pénétration de la zone pellucide par d'autres spermatozoïdes. Une autre manifestation de ce phénomène pourrait être l'induction prématurée de la réaction corticale de l'ovocyte, entraînant un durcissement de la ZP. Si les anticorps anti-pZP activent l'ovocyte de manière prématurée, entraînant le relargage du contenu des granules corticaux, la ZP devient résistante à toute pénétration de spermatozoïde. L'exocytose prématurée des granules corticaux peut s'avérer

être un problème dans le succès de la reproduction assistée, mais cela peut également constituer un mécanisme d'immunocontraception.

4. Absence de spécificité d'espèce de l'immunisation anti-ZP.

De nombreuses données suggèrent que la liaison spermatozoïde-ovocyte initiale, chez les mammifères, implique la reconnaissance de protéines hautement glycosylées de la zone pellucide par des récepteurs situés sur le spermatozoïde. Les données actuelles montrent que les protéines de la zone pellucide ont été fortement conservées au cours de l'évolution (Benoff, 1997). Si c'est le cas, il est possible que la spécificité d'espèce au cours de la reproduction soit contrôlée par les différences structurales des oligosaccharides en surface de la zone pellucide. Quoi qu'il en soit, les expériences actuelles démontrent que la vaccination avec les trois glycoprotéines porcines de la zone pellucide induisent l'immunocontraception dans de nombreuses espèces de mammifères.

Pour expliquer la spécificité d'espèce liée aux oligosaccharides et l'effet non spécifique de la vaccination anti pZP, les hypothèses suivantes peuvent être avancées (Mahi-Brown et al., 1985 ; East et al., 1985 ; Henderson et al., 1987):

- la liaison des IgG anti-pZP à la surface des épitopes des chaînes oligosaccharidiques pour 63% de ces anticorps empêche probablement la liaison au spermatozoïde dans de nombreuses espèces,
- les autres anticorps polyclonaux IgG reconnaissent la matrice protéique mise à nue,
- la liaison de la matrice protéique à ces IgG bloque probablement complètement la capacité d'induction de la réaction acrosomique des protéines de la ZP,
- les IgGs polyclonaux bloquent donc la fécondation par une gêne partielle des sites de liaison (encombrement stérique) et complètent le blocage de l'induction de la réaction acrosomique.

L'absence de spécificité d'espèce de la vaccination par des protéines ZP porcines est dans un certain sens un avantage puisqu'il est ainsi possible avec un même antigène d'obtenir l'immunocontraception dans de nombreuses espèces.

Cependant, s'il s'agit de limiter la reproduction d'une espèce sauvage donnée en dispersant des appâts vaccinaux dans la nature, il est alors indispensable que la vaccination soit spécifique de l'espèce de destination afin de ne pas perturber la reproduction d'autres espèces sauvages susceptible de consommer également l'appât. L'avenir de l'immunocontraception réside dans la caractérisation du mécanisme de reconnaissance de la ZP spécifique d'espèce et de la liaison au spermatozoïde. Avec ces recherches, on pourrait développer une courte chaîne polypeptidique glycosylée synthétique qui pourrait être utilisée par voie orale, tout en restant spécifique d'espèce, avec des durées d'efficacité variables (Matthew et al., 1999).

V Résultats actuels de l'immunocontraception.

Les objectifs primordiaux lors de la conception d'un vaccin sont d'une part la sécurité, à savoir de connaître et de maîtriser les effets primaires (activité du principe), secondaires liés à l'utilisation de tout principe actif ; d'autre part la réversibilité, c'est-à-dire que l'animal retrouve toutes ses fonctions de reproduction à l'issue de la période vaccinale.

A. Protocoles d'immunocontraception.

1. Immunocontraception anti-gonadolibérine chez le bélier prépubère.

Très peu d'études ont été réalisées à l'heure actuelle en ce qui concerne l'immunisation anti-GnRH et nous ne disposons donc que de peu de données. Les études ont été systématiquement réalisées sur des mâles et nous ne disposons pas d'informations sur des femelles.

Chaffaux et al. (1985) ont tenté de définir un protocole et une technique d'immunisation anti-GnRH adaptés et aussi d'étudier les effets de cette immunisation sur l'apparition de la puberté et le gain de poids.

L'expérience a duré 38 semaines et a porté sur 16 agneaux mâles de races variées, âgés de 3 mois au début de l'expérimentation.

Les agneaux ont été immunisés en quatre fois, à la 1^{ère} (T1), la 5^{ème} (T5), la 9^{ème} (T9) et la 14^{ème} (T14) semaine par injection d'une préparation à base de GnRH. Le produit est administré par voie sous cutanée et la dose totale de 0,8 ml est distribuée en 4 à 5 points le long de l'épine dorsale.

Les agneaux ont été répartis en 3 lots homogènes en poids au début de l'expérimentation.

- Dans le premier lot, 5 agneaux ne reçoivent que GnRH, l'antigène seul. La dose de GnRH à chaque injection est de 200 microgrammes par agneau.

- Dans le deuxième lot, 5 agneaux reçoivent la GnRH couplée à de la thyroglobuline en émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund. La dose injectée (0,8 ml) contient 192 microgrammes de conjugué (GnRH-thyroglobuline), 0,3 ml de tampon PBS et 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund.

- Le troisième lot est un lot témoin, dans lequel 6 agneaux témoins qui reçoivent du soluté physiologique dans les mêmes conditions.

Jago et al.(1999), dans une autre étude, ont tenté de déterminer les effets de l'immunisation contre la GnRH, 7 semaines avant l'abattage, sur le comportement sexuel, les qualités bouchères et de croissance de taureaux de 18 à 20 mois. L'utilisation de l'immunocontraception en fin d'engraissement pour améliorer la rentabilité de la carcasse constituant un des débouchés de l'immunocontraception.

Afin de diminuer toute source d'interaction, les groupes de traitement des taureaux étaient gardés séparément. Les taureaux étaient soit vaccinés contre la GnRH (3 mg de GnRH conjuguée) à J0 avec un rappel à J14 (30 animaux, groupe I : immunocastrés) ou conservés intacts (30 témoins, groupe B). Un troisième groupe fut constitué de bœufs (20 animaux, groupe S : steers =bœufs) qui furent castrés à un âge prépubère. Huit groupes de 10 animaux furent ainsi constitués (3 groupes B, 3 groupes I, et 2 groupes S).

2. Immunocontraception anti-PH-20.

Les premiers essais d'immunocontraception anti-PH-20 ont été menés par Primakoff et al., en 1988 sur des cobayes mâles et femelles. Des tentatives préalables avaient montré que des extraits de cellules spermatiques entières entraînent l'infertilité. De plus les hommes et

femmes qui produisent de manière spontanée des anticorps anti-spermatozoïde sont infertiles mais en bonne santé.

La PH-20 de cobaye présente une masse moléculaire moyenne de 64 kD et est localisée à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane acrosomiale interne du spermatozoïde. Afin de déterminer si l'immunisation avec des protéines purifiées PH-20 pourrait affecter la fertilité, quatre femelles cobayes furent immunisées avec quatre doses différentes de PH-20 (10, 20, 30 et 50 µg) qui étaient injectées à deux reprises à un mois d'intervalle. Des animaux témoins recevant une injection sans PH-20 furent utilisées en parallèle.

Un second groupe de 21 femelles fut immunisé avec la PH-20 (5, 10 et 20 µg) en utilisant le même protocole que précédemment.

Bien que l'immunisation de mâles avec des protéines de spermatozoïdes entraîne la possibilité de déclencher des dysfonctionnements auto-immuns de la fonction testiculaire, les hommes qui possèdent des auto anticorps anti spermatozoïdes d'existence naturelle ou suite à une vasectomie ne présentent pas de réaction auto immune au sein des testicules. Dans une expérience initiale visant à évaluer l'efficacité contraceptive de l'immunisation anti-PH-20 chez les mâles, six mâles cobayes furent immunisés avec 2,5 à 50 µg de PH-20 ; sept témoins reçurent des injections sans PH-20. Environ deux mois après l'injection initiale, chaque mâle était mis en présence de deux femelles en vue d'accouplement (Primakoff et al., 1988).

Des essais limités d'immunisation active anti-PH-20 ont été conduits en utilisant la protéine immunocontraceptive chez des lapines. La protéine recombinante était produite en utilisant le système FLAG et purifiée par la technique de chromatographie par immunoaffinité. Dix femelles furent immunisées par voie sous-cutanée avec 400 µg de protéine recombinante purifiée dans de l'adjuvant complet de Freund et trois injections de rappel de 200 µg de protéine avec adjuvant de Freund furent réalisées. Un groupe témoin traité avec de l'adjuvant seul fut élevé en parallèle. Les titres sériques furent mesurés et montrèrent une réponse claire à l'immunisation par rapport aux témoins, comme nous l'avons vu dans le chapitre III (Holland et al., 1997).

Les femelles furent accouplées 112 jours après l'immunisation et une autopsie fut pratiquée quelques jours avant la date de la mise bas prévue.

3. Immunocontraception anti-pZP.

L'immunisation active anti-pZP connaît à l'heure actuelle une avancée très importante. De nombreuses publications sont disponibles sur les rongeurs mais aussi chez les carnivores domestiques. L'efficacité de ce mode d'immunocontraception, qui constitue la voie d'avenir la plus prometteuse, n'est plus à démontrer.

L'administration de pZP3 empêche la fécondation chez les rongeurs (Hasegawa et al., 1992), les chevaux (Liu et al., 1989), les lapins (Wood et al., 1981), les chiens (Mahi-Brown et al., 1985), les primates (Sacco et al., 1983 ; Dunbar et al., 1989 ; Bagavent et al., 1994 ; Aitken et al., 1996), et les éléphants (Fayrer-Hosken et al., 1999). Il existe approximativement 45 espèces différentes chez lesquelles l'utilisation de la pZP3 est une immunocontraception efficace.

Ce qui nous intéresse ici est de savoir si l'immunocontraception est viable sur le long terme. Ces expériences nécessitant un investissement en temps particulièrement important, seule l'expérience de Kirkpatrick et al., débutée en 1988, semble particulièrement intéressante à exploiter car elle s'est déroulée sur de nombreux mois ; en revanche, elle ne concerne qu'un faible nombre d'individus. Dix juments en liberté ont été vaccinées par la protéine ZP porcine avant la période de reproduction pendant trois années consécutives (1988-1990). La fonction ovarienne fut suivie durant 51 jours pendant le pic de la saison de reproduction après la troisième inoculation annuelle de pZP, chez sept de ces juments et chez quatre juments témoins non traitées, par dosage des œstrogènes conjugués urinaires et des métabolites de progestérone non spécifiques.

B. Résultats.

1. Résultats de l'immunocontraception anti-gonadolibérine.

-Dosages hormonaux et réponse immunitaire : (figures 8 et 9)

Dans l'expérience de Chaffaux et al. (1985), en ce qui concerne la LH plasmatique, dès la 2^{ème} immunisation, les concentrations du lot 3 (témoin) sont toujours supérieures à

Figure 8 : Dosage de la LH plasmatique périphérique après immunisation anti-GnRH. Concentration moyenne (ng/ml) chez les agneaux des différents lots.(D'après Chaffaux et al., 1985)

Figure 9 : Dosage de la testostérone plasmatique périphérique après immunisation anti-GnRH. Concentration moyenne (ng/ml) chez les agneaux des différents lots.(D'après Chaffaux et al., 1985)

celle du lot 2 (lot GnRH-thyroglobuline) alors que celle du lot 1 (GnRH) restent toujours inférieures.

En ce qui concerne la testostérone, les taux sanguins sont moins élevés chez les animaux du 2^{ième} lot (GnRH-Thyroglobuline-Freund) que chez les autres animaux.

Dans l'expérience de Jago et al. (1999), tous les taureaux immunisés développèrent un taux d' anticorps anti-GnRH significatif à partir de 28 jours après la seconde immunisation.

Suite à l'immunisation, le niveau de testostérone diminua à moins de 1,0 µg/l pour 26 des 29 animaux immunocastrés à partir du 28^{ième} jour, et cette concentration persista jusqu'au 44^{ième} jour. L'absence de diminution du niveau plasmatique de testostérone, qui se stabilise à 6 µg/l au lieu de passer sous les 2 µg/l chez trois des taureaux immunocastrés, se produit en dépit d'un niveau élevé en anticorps anti-GnRH.

-Poids des animaux :

Même si les agneaux du lot GnRH-thyroglobuline sont toujours plus légers que les autres, aucune différence significative n'a cependant pu, à aucun moment, être mise en évidence entre les lots. (Chaffaux et al., 1985 ; figure 10)

Le poids de carcasse des animaux immunocastrés se situe entre celui des animaux B et S. La différence entre les animaux des groupes B et I est significative ($p < 0,1$).

-Circonférence scrotale et volume testiculaire :

Pour les trois lots d'agneaux, la circonférence scrotale montre les mêmes variations que le volume testiculaire. Après la deuxième immunisation (T5), on observe, aussi bien à l'aide de la circonférence scrotale que du volume testiculaire, une stimulation de la croissance gonadique du lot 1 (GnRH) par rapport au lot témoin 3.

A l'inverse, dans le lot 2 (GnRH couplé), on constate dès la 3^{ième} immunisation une régression testiculaire. Cette régression se prolonge jusqu'à la 27^{ième} semaine puis la croissance est de nouveau normale et le volume testiculaire moyen est identique à celui du lot témoin à la 38^{ième} semaine (figures 11 et 12).

Les trois taureaux immunocastrés de l'expérience de Jago et al. (1999) qui montraient un défaut de réduction du niveau plasmatique de testostérone présentaient des vésicules séminales et un poids testiculaire similaires à la moyenne des animaux témoins. Les animaux immunocastrés avec une testostéronémie faible avaient des vésicules séminales et un poids

Figure 10 : Moyenne des poids des agneaux après immunisation.(D'après Chaffaux et al., 1985)

Figure 11 : Circonférence moyenne des testicules (cm) des agneaux après immunocontraception anti-GnRH et régression linéaire entre T1 et T20.(D'après Chaffaux et al., 1985)

Figure 12 : Moyenne des volumes testiculaires (cm^3) des agneaux après immunocontraception anti-GnRH et régression linéaire entre T1 et T22.(D'après Chaffaux et al., 1985)

testiculaire inférieurs au groupe témoin. Les bœufs présentaient les vésicules séminales et les poids testiculaires les plus faibles.

-Croissance :

Bien que les animaux immunocastrés présentaient le GMQ (gain moyen quotidien) le plus faible, il n'y avait pas de différence significative entre les trois traitements. La plus importante réduction du taux de croissance fut observée du 28^{ième} au 44^{ième} jour lorsque le GMQ du groupe I était inférieur à celui des groupes B et S. Les trois groupes immunocastrés perdirent du poids pendant cette période. Les bœufs présentent une épaisseur de gras sous cutané supérieure à celle mesurée chez les animaux des groupes I et B, qui ne diffèrent pas entre eux.

-Qualité de la viande : (Jago et al., 1999)

Aucune différence ne fut mise en évidence entre les trois groupes en ce qui concerne le pH ou la couleur. En ce qui concerne la saveur, la flaveur et la tendreté, les différences sont nettement significatives. La plus grande partie des participants (goûteurs), hommes et femmes, avaient entre 30 et 40 ans. Ainsi, la viande issue des bœufs présentait une meilleure saveur, flaveur et tendreté que celle issue des animaux des groupes I et B. Les animaux immunocastrés présentaient une viande de qualité supérieure à celles des bovins non traités (B) mais inférieure à celles des bœufs (S) pour la tendreté, la saveur et la palatabilité générale.

-Comportement sexuel :

Concernant le comportement sexuel avant immunisation, il n'y avait pas de différence de fréquence des comportements sexuels entre les animaux des groupes B et I. Avant immunisation, les deux groupes I et B présentaient une plus grande fréquence de comportements sexuels que les animaux du groupe S. Au 34^{ième} jour après immunisation les groupes I et S montrèrent une diminution des comportements sexuels par rapport au groupe au groupe B. La fréquence des comportements sexuels du groupe I était inférieure au groupe B, mais cette différence n'était pas significative. En revanche, la diminution des comportements agonistes, à savoir d'agressivité entre mâles, sont significatives. Le groupe I est intermédiaire entre les deux autres groupes.

2. Résultats de l'immunocontraception anti-PH-20.

-Résultats du groupe I (Primakoff et al., 1988) :

Deux mois après la première injection, les quatre femelles traitées et les témoins furent mises en contact de mâles de la même espèce. Aucune des quatre femelles immunisées contre la PH-20 ne devint gestante, alors que 12 des 13 femelles témoins (92%) furent contrôlées gestantes avec une prolificité moyenne de 3,5 (tableau 7, groupe 1).

-Résultats du groupe 2 :

Aucun de ces animaux ne fut gestante alors que 22 des 23 témoins (96%) furent gestantes (tableau 6). Au total, 34 des 36 (94%) animaux témoins furent gestants avec un taux moyen de 3,3 naissances. Sur la base de cette moyenne, les 25 femelles immunisées anti-PH-20 auraient dû, si elles étaient fertiles, donner naissance à 82 petits (tableau 7).

Afin de tester la réversibilité de l'effet contraceptif, les femelles cobayes immunisées contre la PH-20 furent accouplées à intervalles réguliers. Les animaux immunisés retrouvent progressivement leur fertilité : après environ six mois après la première injection (2nd accouplement), 4 des 23 animaux testés (17%) étaient fertiles, après 11 mois 46% avaient retrouvé leur capacité de reproduction ; et après 15 mois, toutes les femelles du premier groupe (4 femelles) de la plus longue étude avaient mis bas. Une décroissance moyenne par un facteur quatre (par rapport au titre en anticorps initial) a été observée au bout de six mois pour les titres en anticorps des femelles immunisées avec 10, 20 ou 30 µg de PH-20. Le titre initial en anticorps une semaine avant le premier accouplement est identique, quelque soit la quantité de PH-20 injectée au départ. Les femelles immunisées par 10 et 20 µg étaient fertiles à 6 mois, alors que les femelles immunisées par 30 µg, présentant un titre identique au départ, restaient infertiles (tableau 7). Cela suggère que lorsque les titres sériques sont en moyenne divisés par quatre, 6 mois après immunisation.

- Résultats de l'immunocontraception anti-PH-20 chez le groupe de mâles cobayes (Primakoff et al., 1988) :

Aucune des 12 femelles mises en présence des mâles ne fut gestante, alors que 14 des 14 femelles mises en présence des témoins furent gestantes (groupe 3, tableau 6). Quatre des six mâles immunisés retrouvèrent leurs fonctions de reproduction 7 mois après la première injection et il n'y eut pas de stérilité irréversible comme c'est le cas lors d'orchite auto-immune.

	Quantité de PH-20 injectée (µg)	Nombre d'animaux	Nombre avec portée (% avec portée)	Nombre de naissances	Taux de naissances
Femelles groupe 1	50	1	0	0	
	30	1	0	0	
	20	1	0	0	
	10	1	0	0	
	0 (témoin)	13	12 (92%)	46	3,5
Femelles groupe 2	20	14	0	0	
	10	4	0	0	
	5	3	0	0	
	0 (témoin)	23	22 (96%)	74	3,2
Total des femelles immunisées PH-20		25	0 (0%)	0	
Total des femelles contrôlées		36	34 (94%)	120	3,3
			Femelles gestantes/femelles accouplées		
Males groupe 3	50	1	0/2	0	
	30	1	0/2	0	
	20	1	0/2	0	
	10	1	0/2	0	
	5	1	0/2	0	
	2.5	1	0/2	0	
	0 (témoin)	7	14/14	62	4,4
Total des mâles immunisés PH-20		6	0/12 (0%)		
Total des mâles contrôlés		7	14/14 (100%)		

Tableau 7 : Effet contraceptif de l'immunisation anti-PH-20 (Primakoff et al., 1988).

Les femelles ou mâles Cobaye (300g environ lors de la première injection) reçoivent deux injections de quantité identique de PH-20. La PH-20 purifiée séparée du sperme par chromatographie d'affinité, ne présente pas de contaminants détectables. La pureté de chaque préparation de PH-20 utilisée pour l'immunisation des mâles ou femelles était vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS et marquage argentique. La PH-20 purifiée, dans 0.375 ml de solution tampon phosphaté (PBS) contenant 3 mM d'octylglucoside (OG), était émulsifiée avec 0.375 d'émulsifiant complet de Freund (CFA). Chaque animal recevait 0.5 ml de l'émulsion par voie sous-cutanée et 0.25 par voie intramusculaire dans la patte arrière. Environ un mois plus tard la même quantité de PH-20 dans PBS et 3 mM OG, émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (IFA), était injecté aux mêmes sites chez l'animal. (Une seule exception concerne le mâle qui reçut 30 µg de PH-20 et qui ne reçut que la première injection). Les témoins reçurent le même mélange sans PH-20. Pour permettre les accouplements, les femelles étaient mises en présence des mâles 2 mois après l'injection initiale pendant 3 semaines. Chaque cage contenait un mâle, deux ou trois femelles immunisées anti PH-20 et deux à quatre témoins. Après trois semaines les femelles étaient séparées des mâles, les femelles gestantes mirent bas. Les animaux témoins qui ne furent pas gestantes étaient en cage avec d'autres femelles qui furent gestantes ce qui indique que les mâles étaient fertiles. Pour permettre aux mâles immunisés de se reproduire, environ deux mois après l'injection initiale, chaque mâle était mis en présence de deux femelles pour trois semaines. Les mâles et femelles étaient séparés et cinq semaines plus tard une autopsie des femelles était réalisée pour compter les fœtus.

- Résultats de l'immunocontraception anti-PH-20 chez le lapin (Holland et al., 1997) :

Suite à l'autopsie, aucune anomalie concernant les femelles immunisées ou les fœtus ne fut mise en évidence.

Les taux de gestation étaient similaires chez les femelles immunisées par la PH-20 et chez les témoins. Aucune anomalie fœtale ou maternelle n'a été observée et aucun effet de l'immunisation ne fut remarqué sur la taille des petits. Ainsi, la PH-20 obtenue chez le lapin recombinante n'induit pas d'infertilité dans cette espèce, au contraire de la PH-20 originale administrée au cobayes. Les chercheurs tentent actuellement de savoir si cette différence est due à une différence de réponse immunitaire au sein du tractus reproducteur : les lapins ont des ovulations induites alors que les cobayes ont un cycle œstral avec ovulation spontanée. Or, dans de nombreuses espèces, il existe une interaction entre la réponse immunitaire et le statut hormonal (Wira et Stern, 1992).

3. Résultats de l'immunocontraception anti-pZP.

Ce qui nous intéresse dans l'expérience de Kirkpatrick et al. ce sont les conséquences de trois années d'immunocontraception consécutives en ce qui concerne à la fois l'efficacité de la contraception la troisième années mais aussi les dommages possibles sur les cycles sexuels, ces derniers ne devant, en théorie, ne pas être altérés.

Aucune des dix juments traitées ne devint gestante en 1990, en comparaison des 55% de gestation chez les juments non traitées, comprenant deux des quatre juments témoins contrôlées pour la fonction ovarienne. Trois des juments non traitées présentèrent une activité ovarienne normale, caractérisée par un pic préovulatoire d'œstrogènes, concomitante d'un faible taux de progestérone à l'ovulation, et une augmentation de la progestérone en phase lutéale après l'ovulation. Deux des sept juments contrôlées, vaccinées par la pZP présentèrent des cycles ovulatoires qui n'aboutirent pas à une fécondation. L'une des sept juments fut gestante en 1989 et présenta un profil endocrinien normal. Les quatre juments restantes traitées par la pZP ne présentèrent pas d'ovulation, et les concentrations urinaires en œstrogènes furent significativement diminuées au cours des trois années de traitement.

Ces expériences démontrèrent que trois administrations consécutives annuelles de pZP sont efficaces à plus de 90% pour prévenir la gestation chez des juments et que trois années consécutives de traitement de pZP peuvent interférer avec un fonctionnement ovarien normal traduit par une baisse marquée de la sécrétion d'œstrogènes.

Ces conclusions correspondent cependant à une expérience menée sur dix juments et il est impossible, à partir d'un nombre aussi restreint de cas, d'extrapoler à toute une espèce et encore moins à un ensemble d'espèces.

C. Discussion.

1. Immunocontraception anti-gonadolibérine.

La diminution du taux moyen de LH plasmatique périphérique dépend du taux d'anticorps. Cette diminution est nette quand le taux d'anticorps anti-GnRH atteint une concentration élevée. Dès que le taux d'anticorps diminue, on observe une réapparition de la LH circulante.

D'autres hormones hypophysaires ont été dosées (prolactine et TSH), leur concentrations n'ont pas été modifiées par les immunisations.

Les auteurs (Chaffaux et al., 1985 ; Cook et al., 2000 ; Robertson et al., 1979 ; Jago et al., 1997) ont décrit une diminution du taux de testostérone chez des animaux présentant un taux d'anticorps élevé. Cette régression est synchrone de la régression testiculaire. La concentration périphérique de testostérone chez les animaux immunisés varie selon les auteurs. Elle se situe entre un taux non détectable et un taux égal à la moitié de celui des témoins.

Les animaux immunisés présentant un taux important d'anticorps anti-GnRH ont une véritable régression testiculaire. La majorité des auteurs observe une simultanéité entre l'augmentation du taux d'anticorps spécifiques et la régression testiculaire. Certains cependant (Robertson et al., 1979) notent un décalage dans le temps entre ces deux phénomènes, la régression testiculaire apparaissant un mois après la montée des anticorps. Dès que le taux des anticorps diminue, il y a reprise de la croissance testiculaire. On constate de même une régression du poids des glandes annexes, prostate et vésicules séminales, associée à la régression du poids des gonades.

L'atrophie testiculaire semble réversible, comme le prouve la reprise de la croissance gonadique vers la 27^{ème} semaine chez les agneaux immunisés (Chaffaux et al., 1985).

L'augmentation significative du taux d'anticorps anti-GnRH suite au rappel d'immunisation à J14 et la baisse conséquente du taux de testostérone plasmatique observés par Jago et al. (1999), sont cohérents avec les résultats d'études préliminaires ayant impliquées l'immunisation de taureaux post pubères contre la GnRH réalisées par Jago et al., (1996, 1997) et avec les résultats de Chaffaux et al. (1985). La baisse du taux de testostérone plasmatique met plus de temps à se mettre en place après la vague d'anticorps anti-GnRH que dans les rapports d'immunocastration précédents de Jago et al. (1996) et D'Occhio et al. (1993). Bien que tous les taureaux immunisés présentent une augmentation significative du taux d'anticorps anti-GnRH, la concentration plasmatique de testostérone ne chute pas chez trois animaux. Le poids testiculaire de ces trois animaux était similaire à ceux des taureaux non castrés, tout comme le poids des vésicules séminales. Cela signifie que malgré le fait que les anticorps anti-GnRH aient été produits, ils étaient incapables d'empêcher la liaison de la GnRH aux récepteurs de la glande pituitaire, la stimulation du relargage de LH et par conséquent la production de testostérone par les testicules. Aucune explication n'est proposée à cela. Cependant la grande variabilité des réponses biologiques des individus à l'immunisation contre la GnRH n'est pas inconnue chez les animaux de rente (Lobley et al., 1992).

Toujours dans l'étude de Jago et al. (1999), la fréquence des comportements agonistes et sexuels était réduite après immunocastration. Cependant à cause de la grande variabilité des comportements sexuels, particulièrement en ce qui concerne les bœufs, la diminution n'est pas significative. Cette différence est observée à partir du 34^{ième} jour. La monte mâle-mâle est bien plus fréquente entre taureaux que bœufs (Hinch et al., 1982) : 2,2% des bœufs du Kansas en lot sont appelés « taureaux de monte » ou animaux régulièrement montés (Brower et Kiracofe, 1978). La tendance à la baisse des comportements sexuels et agonistes suite à l'immunocastration est en accord avec les résultats de Baker et Gonyou (1986) qui rapportèrent la réduction des comportements sexuels et agonistes suite à la castration de taureaux de 12 mois. Ces observations sont compatibles avec la baisse du comportement hétérosexuel faisant suite à la castration chirurgicale post pubère (Blockey et Galloway, 1978). Cependant les différences ne sont pas aussi significatives lorsque les taureaux sont immunisés avant la puberté (Jago et al., 1997), ce qui indique que la mesure des niveaux d'androgènes est importante pour déterminer les effets de la castration sur le comportement des taureaux.

Le faible niveau de comportement sexuel présenté par les taureaux intacts au cours des observations est la cause probable de la consistance inhabituelle et du faible pH enregistré sur la viande des taureaux et du manque de différence de couleur entre les viandes de taureaux et de bœufs. Mohan Raj (1988) rapporte que des animaux qui montent plus de 16 fois, à raison de 5 montes par 15 minutes, dans la période précédant l'abattage présentent une viande foncée à la coupe. Le taux de monte de l'étude qui nous intéresse (1,1 monte par heure) était bien inférieur à ce qui avait été décrit par Mohan Raj (1988) ou par Jago et al. (1997) : 3,3 montes par heure. La faible activité sexuelle observée au cours de cette étude ne présente pas de raison apparente. Les taureaux étaient manipulés régulièrement, mais il ne semble pas que cela ait pu être à l'origine de la réduction du comportement sexuel car les animaux étaient manipulés plus régulièrement et plus longtemps dans les études préliminaires de Jago et al. (1997) où le comportement sexuel des taureaux s'exprimait de manière plus importante. Un effet de saison ne semble pas être responsable des variations de comportements, bien que ce facteur soit difficile à objectiver.

La vitesse de croissance, comme on le retrouve dans les études de Enright et al. (1994) et Jago et al. (1996), tend à diminuer après immunocastration de taureaux post pubères. La baisse enregistrée dans cette étude, bien que peu significative, était bien plus importante que celle rapportée dans les études précédentes. De plus, le taux de croissance des animaux immunocastrés était inférieur à celui des bœufs, ce qui indique que la réduction du taux de testostérone faisant suite à l'immunocastration est seulement en partie responsable de cette chute du taux de croissance. Il est difficile d'expliquer pourquoi un effet aussi marqué se produit sur la croissance. Bien que les animaux pâturaient dans des groupes de traitements séparés, beaucoup d'attention était accordée à la rotation des lots afin que la pâture et les compléments soient disponibles *ad libitum* et que les différences observées ne puissent être dues à des différences d'alimentation. La chute de croissance du 28^{ième} au 44^{ième} jour après immunisation s'est produite dans chacun des trois groupes de taureaux immunocastrés, mais était plus importante dans un des groupes. Ce groupe présentait également une réponse locale à l'immunogène plus importante au niveau du site d'injection. Il est probable que cette réponse inflammatoire plus importante contribue à l'importante perte de poids. Adams et Adams (1992) rapportent que des taureaux traités avec des protéines de transport associées à un adjuvant mais sans antigène GnRH présentent des taux de croissance inférieurs de 10% aux taureaux non traités, ce qui indique que l'adjuvant et la protéine seule peuvent avoir un effet négatif sur la croissance.

Le pH et la couleur de la viande ne diffèrent pas entre les taureaux, les immunocastrés et les bœufs mais les qualités gustatives sont affectées par le traitement. La palatabilité générale des viandes issues de bœufs et immunocastrés fut plus appréciée que celle issue de taureaux par 83% des goûteurs. Dans cette étude, les taux de tendreté, saveur et palatabilité générale des viandes issues de bœufs sont supérieurs à ceux des viandes issues de taureaux et les immunocastrés présentent des taux intermédiaires en ce qui concerne ces caractéristiques. La viande issue de taureaux possède une saveur moins acceptable (Jeremiah et al., 1988) et une plus faible tendreté que la viande de bœuf (Jacobs et al., 1977). Cependant, Arthaud et al. (1977) rapportent peu de différences de qualités bouchères entre la viande de bœuf et de taureau, et Field (1971) rapporte, dans une revue sur l'effet de la castration sur les qualités bouchères, des effets faibles voire inexistantes sur la saveur et la tendreté. Lorsque des différences de qualités bouchères ont été mises en évidence, elles ont été attribuées au plus faible pourcentage de gras (Riley et al., 1983) et à la plus grande proportion de collagène insoluble dans la viande de taureau (Gerrard et al., 1987). L'amélioration des qualités bouchères de la viande suite à l'immunocastration dans l'étude présente confirme les découvertes de Teague et al. (1992), qui rapporta que l'immunocastration améliore la saveur et la palatabilité générale et tend à améliorer la tendreté par rapport à la viande de taureau. Il est intéressant de noter que l'effet de l'immunocastration sur les qualités bouchères qui était détecté 20 semaines après l'immunocastration (Teague et al., 1992) était observé seulement 5 semaines après immunisation dans cette étude. Étant donné qu'il n'y avait pas de différences significatives de pH entre les traitements, la raison expliquant l'amélioration des qualités bouchères n'est pas claire. La tendance à la baisse des comportements sexuels et d'agressivité suite à l'immunocastration semble avoir contribué à cette amélioration (Mohan Raj., 1988), bien que le niveau d'activité générale, y compris pour les taureaux intacts, était faible. Il semble qu'une réduction de la testostérone circulante a contribué à améliorer les qualités bouchères, bien qu'il soit difficile de spéculer sur le mécanisme qui a produit cette amélioration. La grande quantité de dépôt de gras sous cutané pourrait être une des raisons de la meilleure qualité bouchère de la viande des immunocastrés par rapport à celle des taureaux. Une augmentation de la proportion de gras dans la carcasse a été observée suite à l'immunocastration (Jago et al., 1996) mais dans cette étude il n'y avait pas de différence dans le dépôt de gras profond (persillé de la viande) entre taureaux et immunocastrés, ce qui rend le dépôt de gras probablement non responsable de l'amélioration des qualités bouchères.

En conclusion, l'immunocastration de taureaux postpubères 7 semaines avant l'abattage réduit les comportements agonistes et sexuels, et de manière opposée affecte le taux de croissance et le poids de carcasse, mais améliore les qualités bouchères de la viande de taureau, sans atteindre le niveau de qualité de la viande de bœuf. Ainsi l'immunocastration présente un potentiel d'utilisation en vue d'améliorer les qualités bouchères de la viande de taureaux, mais il semble que cela se fasse au détriment de la vitesse de croissance. Reste à savoir si cette amélioration de la qualité bouchère de la viande issue de taureaux immunocastrés est suffisante pour permettre un débouché sur le marché en viande brute, la viande de taureau étant peu valorisée et souvent utilisée en produit transformé car de qualité trop médiocre.

On peut regretter qu'aucune étude ne soit disponible en ce qui concerne l'effet immunocontraceptif de la GnRH chez la femelle. Peut-être parce qu'à l'heure actuelle, les recherches sur la contraception réversible chez la femelle porte sur le développement d'implants d'analogues de la GnRH.

2. Immunocontraception anti-PH-20.

Les protéines purifiées issues de spermatozoïdes initialement testées comme immunogènes contraceptifs comprennent l'enzyme spermatique hyaluronidase, l'acrosine et la lactate deshydrogénase C-4. L'immunisation de femelles avec ces enzymes n'avait soit aucun effet sur la fertilité, soit un effet partiel qui n'était pas suffisant pour faire de ces protéines des agents contraceptifs (Primakoff, 1994). La haute efficacité contraceptive de la PH-20 semble reposer sur de nombreuses propriétés spécifiques, comprenant sa présence sur la surface du spermatozoïde, son importante immunogénicité, et son rôle essentiel dans la fécondation. D'autres spermatozoïdes de mammifères sont semblables à ceux du cobaye en cela qu'il se lie à la zone pellucide avant ou après la réaction acrosomique.

Alors que la PH-20 est immunogène chez le cobaye, il est clair que de plus amples informations concernant le type de réponse immunitaire à générer avec la PH-20 sont nécessaires si l'on veut aboutir à l'infertilité dans d'autres espèces, comme chez le lapin.

Un intérêt particulier de la PH-20 est que ce type d'immunocontraception est utilisable à la fois chez les mâles et les femelles, au vue des résultats de Primakoff et al., (1988).

3. Immunocontraception anti-pZP.

Un problème important concernant l'utilisation des glycoprotéines de la ZP comme immunocontraceptif est par dessus tout la sécurité du vaccin. Un élément rassurant quant à la toxicité de la vaccination anti-pZP est la spécificité d'organe des anticorps. Des anticorps anti-pZP hautement spécifiques prélevés chez un lapin ne présentent aucune réaction croisée avec 14 tissus différents (cerveau, cœur, poumon, rein, foie, vessie, estomac, intestin grêle, gros intestin, muscle, peau, rate, pancréas, ou ganglion lymphatique) chez le cheval et le chien (Barber et Fayer-Hosken, 2000). En effet, des données humaines suggèrent une convergence entre les procédés de reconnaissance immunitaire et ceux mis en jeu lors de la fécondation (Dell et al., 1995). On pourrait donc supposer que la vaccination anti-ZP pourrait perturber l'immunité des animaux vaccinés.

L'étude précédemment présentée menée par Kirkpatrick et al. (1995), consistant à vacciner annuellement 10 juments avec la pZP, nous fournit des informations concernant la sécurité du vaccin. Ces juments ont été contrôlées chaque jour pour leur état général, et aucun problème n'a été détecté. De plus, la population de chevaux sauvages de l'île d'Assateague (USA) est maîtrisée par la vaccination anti-pZP depuis de nombreuses années (10 ans), et il a été rapporté que la santé générale des juments vaccinées s'est améliorée sensiblement probablement du fait de la diminution du stress métabolique lié à la gestation et à la lactation (Kirkpatrick et al., 1995). Ces données suggèrent fortement que l'immunisation par la pZP est, dans l'ensemble, sans danger pour l'animal. D'autres études concernant la présentation immunologique des glycoprotéines pZP et les effets de toxicité chroniques du vaccin sont aujourd'hui nécessaires.

Alors que la pZP3 est un excellent antigène qui entraîne une forte réponse immunitaire, d'autres études ont montré que l'immunisation active et passive de femelles avec d'autres antigènes de la ZP entraîne une infertilité temporaire (Oikawa et Yanagimachi, 1975 ; Gwatkin et al., 1977 ; Tsunoda et Tchang, 1978), ce qui laisse espérer le développement de nouvelles voies de recherche.

Après une approche théorique, l'immunocontraception a démontré sa faisabilité et son efficacité avec les différents antigènes utilisés, GnRH, PH-20, mais surtout la ZP3 pour laquelle les expériences ont été nombreuses et concluantes. Reste à savoir dans quels domaines cette nouvelle méthode pourrait être amenée à se développer.

VI Intérêts et perspectives de l'immunocontraception.

Le contrôle des populations à la fois domestiques et sauvages, mais aussi des animaux errants est un problème majeur dans le monde. La surpopulation canine et féline conduit à des millions d'euthanasies d'animaux de compagnie non désirés chaque année, et la surpopulation d'espèces sauvages entraîne des destructions d'habitat et des déséquilibres de l'écosystème.

Trouver un moyen acceptable, autant efficace que sécurisé, de contrôler l'excès de population animale est extrêmement difficile. L'utilisation d'un vaccin immunocontraceptif réversible présente de nombreux avantages : (1) s'il possède un haut degré d'efficacité, (2) s'il n'a pas d'effets nuisibles, (3) s'il peut être distribué à distance, (4) s'il requière un faible nombre d'administrations, (5) s'il présente une activité immunocontraceptive d'environ un an et (6) s'il est enfin économiquement utilisable. A l'heure actuelle, l'utilisation de protéines de la zone pellucide de porc (pZP) comme immunocontraceptif se présente comme un agent potentiel de contrôle de la population rassemblant tous les critères précédemment cités.

L'immunocontraception devrait pouvoir dans un futur proche être appliquée à de nombreuses espèces animales. L'objectif de cette dernière partie n'est pas de réaliser une liste exhaustive de toutes les espèces et applications de l'immunocontraception mais plutôt de présenter des domaines d'utilisation dans lesquels il n'existe à l'heure actuelle aucune véritable alternative. Ainsi l'utilisation de l'immunocontraception chez les animaux de compagnie, bien que très intéressante compte tenu de sa réversibilité et de ses faibles effets secondaires, sera présentée sans être développée, au profit de l'étude de l'intérêt de l'immunocontraception en fin d'engraissement sur les animaux de rente et à ses perspectives d'utilisation chez les animaux sauvages.

A. Intérêt de l'immunocontraception chez les animaux de compagnie.

A l'heure actuelle, seule la vaccination anti-pZP a été testée sur les animaux de compagnie, à savoir l'expérience de Mircu et al. (2000). Ils ont étudié l'effet de l'administration de ZP porcine seule (pZP), ou couplée avec des ovocytes de truie (OV+pZP), sur la fonction de reproduction de la chienne. Les deux méthodes étaient efficaces à 100%.

On peut s'interroger sur l'intérêt des méthodes immunocontraceptives anti pZP chez la chienne dans leur état actuel car bien que la fécondation soit empêchée par une immunisation anti pZP (Mircu et al., 2000), le cycle sexuel n'est pas altéré, et la chienne présente donc toujours des chaleurs. Or, le motif de consultation des propriétaires est très fréquemment la

demande de suppression des chaleurs compte tenu des désagréments liés à cette période chez la chienne (pertes de sang, attirance des mâles). C'est pourquoi ce type de méthode ne possède que peu d'avenir en médecine des animaux de compagnie contrairement à l'immunocontraception anti-gonadolibérine qui supprime le cycle sexuel.

Les premiers résultats d'immunocontraception anti-GnRH obtenus sur des rongeurs sont encourageants. L'abolissement du comportement sexuel et la possibilité d'obtenir une stérilisation réversible par immunisation anti-gonadolibérine peut séduire de nombreux propriétaires d'animaux de compagnie. Associé à un rappel annuel de vaccination, l'immunisation anti-GnRH peut permettre une maîtrise acceptable de la reproduction et des périodes de chaleurs des chats et des chiens. La particularité de l'immunisation anti-GnRH est que cette méthode pourrait être applicable à la fois aux mâles et aux femelles. Aucune étude n'est à l'heure actuelle disponible en ce qui concerne les animaux de compagnie ; la recherche se porte plutôt sur la libération prolongée d'analogues de la GnRH par des implants sous-cutanés.

B. Intérêts de l'immunocontraception chez les animaux de rente.

Pour les animaux de rente, l'immunocontraception supprime le stress, les aléas et les inconvénients occasionnés par les procédés chirurgicaux de castration.

Chez le mâle, dans l'espèce porcine, la réduction du taux des stéroïdes sexuels circulants entraînée par la castration immunologique peut avoir comme application la disparition de l'odeur *sui generis* des carcasses de verrats. Cette castration immunologique inhibe également le comportement sexuel, la fécondation et l'agressivité pendant un temps déterminé, ce qui peut permettre entre autres un élevage par lots mélangeant mâles et femelles.

Dans l'espèce bovine, on distingue classiquement les taureaux conservés en tant que reproducteurs - soit en monte naturelle (en élevage allaitant principalement) soit pour les prélèvements de paillettes en vue de l'insémination (en élevage laitier notamment) - et les taurillons de moindre valeur génétique que l'on castré en bœuf pour améliorer le rendement en viande jusqu'à l'abattage à partir de 30 mois. La castration présente également l'intérêt de réduire l'agressivité des animaux.

La castration des taurillons est classiquement chirurgicale. Cette opération réalisée la plupart du temps dans des conditions d'anesthésie minimales est dangereuse pour le

vétérinaire et surtout occasionne pour l'animal un retard de croissance dans les semaines suivantes à cause du stress provoqué par l'opération. Comparativement à la castration chirurgicale, l'immunocastration de taurillons n'est pas invasive, c'est une procédure moins stressante (Fisher et al., 1996), présentant peu d'effets délétères sur la croissance dans les jours suivants immédiatement l'injection (Finnerty et al., 1996). Ainsi la possibilité de réaliser une castration immunologique, dans le respect du bien-être animal (par rapport à la castration chirurgicale) et du consommateur (par rapport à l'apport de stéroïdes sexuels anabolisants, interdite en France mais autorisée dans d'autres pays), pourrait constituer une alternative intéressante aux méthodes traditionnelles de castration de taureaux (Robertson et al., 1979). Reste à évaluer la rentabilité économique de la castration immunologique par rapport à la castration chirurgicale.

D'autre part, l'immunocastration pré-pubère réduit comme chez les porcins les problèmes de comportement, comme les excès de monte et les agressions, ce qui laisse les taureaux « intacts » pour la production de viande (Cook et al., 2000).

Pour les bovins, un des intérêts de l'immunocastration, aussi bien chez les mâles que chez les femelles, est l'inhibition de la fonction de reproduction, qui permet d'élever en élevage extensif simultanément mâles et femelles ; en particulier il est alors intéressant d'immunocaster les génisses n'ayant pas atteint l'âge minimal pour être mises à la reproduction. Il faut alors une inhibition réversible mais longue (de l'âge de 5-6 mois à au minimum 15 mois, souvent 24 mois en allaitant).

Cependant l'intérêt le plus évident de l'immunocastration réside dans son utilisation sur des taureaux en fin de carrière ou peu fertiles ou encore sur les vaches de réforme afin d'améliorer leurs qualités bouchères pendant quelques semaines avant l'abattage et ainsi de valoriser le prix de la carcasse. Il n'y a dans ce domaine, en effet, aucune alternative à l'heure actuelle car la castration chirurgicale est inapplicable chez les animaux adultes pour des raisons de faisabilité et de coût, bien qu'il existe quelques vétérinaires qui réalisent des ovariectomies sur des vaches de réforme, mais cela reste anecdotique.

Afin d'optimiser la croissance des taureaux intacts et de minimiser les comportements d'agressivité, il a été suggéré que la castration pouvait être reculée à l'âge de 12 mois (Gregory et Ford., 1983). Jago et al. (1996) ont comparé la castration chirurgicale et chimique de taureaux post pubères à la castration chirurgicale de jeunes taurillons. Ils concluent que la castration chirurgicale à partir de 17 mois n'offre pas d'avantage par rapport à la castration chirurgicale à 10 mois, en terme de croissance, comportement et qualités

bouchères. Alors que l'immunocastration pré-pubère présentait des effets délétères sur le taux de croissance, l'immunocastration post pubère était plus bénéfique que la castration chirurgicale pré et post pubère. De plus, les qualités bouchères étaient améliorées après l'immunocastration.

La réduction de la vitesse de croissance qui fait suite à l'immunocastration post pubère ne se produit pas juste après l'immunisation (Enright et al., 1994 ; Jago et al., 1996). Ainsi si les animaux sont abattus après deux ou trois mois d'immunisation, les effets négatifs sur le taux de croissance et le poids de carcasse sont récupérés et au delà de cette durée la croissance des immunocastrés est supérieure à celle des témoins.

C. Perspectives de l'immunocontraception comme outil de gestion de la faune sauvage.

Les conflits entre les êtres humains et les animaux sauvages ne sont pas un phénomène nouveau ni inhabituel. La production agricole peut être limitée à cause de dégâts sur les récoltes réalisés par les rongeurs, les oiseaux, ou les éléphants ; les espèces exotiques peuvent détruire les espèces sauvages endémiques ; des maladies peuvent être transmises aux animaux domestiques ou aux hommes par des vecteurs sauvages. Une liste exhaustive ne peut être réalisée avec ces exemples.

A l'heure actuelle, la plus grande partie des études de gestion de la faune sauvage par immunocontraception ont été réalisées sur le territoire australien ; il s'agit en effet du continent qui doit le plus prendre en compte l'équilibre entre faune sauvage et élevage et qui possède les moyens financiers adéquats pour étudier les possibilités de gestion de la faune sauvage. L'un des exemples les plus caractéristique est celui du lapin d'Europe sauvage (*Oryctolagus cuniculus*) qui avait été importé sur le continent et dont la reproduction non contrôlée a conduit à d'importantes inquiétudes écologiques pour les espèces endémiques ainsi que pour les productions agricoles locales. Il est devenu l'un des animaux les plus nuisibles en Australie. Les méthodes actuelles pour contrôler les populations sauvages sont du point de vue de l'efficacité, de l'applicabilité, de la spécificité, du coût et du respect animal de plus en plus remises en question. De nouvelles méthodes sont nécessaires.

Trouver une solution à de tels conflits est un des défis les plus importants de la gestion de la faune sauvage. L'un des nouveaux concepts à appliquer à ce défi est l'immunocontraception.

1. Une perspective historique.

Après 4 décennies de recherche, les programmes contraceptifs pour un contrôle efficace des détériorations effectuées par la faune sauvage n'ont pu être développés ni appliqués. La contraception chimique par l'utilisation des stéroïdes synthétiques, œstrogènes et progestagènes, a été investiguée dans les années 60 et 70 chez les coyotes (*Canis latrans* ; Balser, 1964 ; Brusman et al., 1968), les pigeons (*Columba livia* ; Woulfe 1970, Sturtevant, 1971), certains oiseaux (*Agealius phoeniceus* ; Guarino et Shafer, 1974), les rats (*Rattus norvegicus* ; Garrison et Johns, 1975), la caille coturnix (*Coturnix coturnix* ; Shafer et al., 1977), et le cerf à queue blanche (*Odocoileus virginianus* ; Matschke 1976, 1977, 1980).

Cependant, aucun de ces efforts n'a conduit à développer un outil pratique de gestion de la faune sauvage pour différentes raisons, comprenant la nécessité d'administration répétées, qui rendent les stérilisants chimiques inutilisables dans la plupart des situations. Les stéroïdes semblent également persister dans les tissus, ce qui soulève des inquiétudes écologiques. Cependant, les avancées actuelles en matière de physiologie de la reproduction, immunologie, et biologie moléculaire ont fourni de nouvelles méthodes de contraception. Ainsi, les difficultés qui rendent la stérilisation chimique inapplicable comme outil de gestion de la faune sauvage pourraient être surpassées avec l'immunocontraception. La plupart des découvertes concernant l'immunocontraception ont été appliquées au cerf à queue blanche (Garrot, 1995) ; cependant, cette technologie est également applicable à d'autres espèces sauvages comme les rongeurs, les oiseaux et les coyotes.

2. Technologie de l'immunocontraception appliquée au contrôle de la faune sauvage.

L'intérêt de l'immunocontraception pour la faune sauvage est que l'inhibition de la reproduction peut être efficace pour une durée de 1 à 3 ans après un traitement initial sans que l'utilisation de traitements répétitifs ou constants ne soient à effectuer (Turner et Kirkpatrick 1991).

La reproduction par immunocontraception peut être bloquée à différents niveaux du processus de la reproduction (Griffin, 1992 ; Jones, 1983). Les vaccins immunocontraceptifs contrôlent la reproduction en stimulant la production d'anticorps contre les protéines des gamètes, les hormones de la reproduction, et d'autres protéines essentielles à la reproduction. Dans le cas de la faune sauvage, il est intéressant de choisir un antigène efficace dans les deux sexes. Par exemple, un vaccin immunocontraceptif anti-GnRH peut bloquer l'activité

reproductrice des deux sexes en empêchant le relargage des hormones gonadotropes essentielles à la reproduction. De même l'immunocontraception anti-PH-20 a montré son efficacité à la fois chez les mâles et chez les femelles (Primakoff et al., 1988). Ainsi l'immunocontraception anti-GnRH ou anti-PH-20 pourraient constituer les choix les plus intéressants en ce qui concerne le contrôle de la faune sauvage.

3. Potentiel de l'immunocontraception dans la gestion de la faune sauvage et choix de la voie d'administration.

La technologie de l'immunocontraception est disponible aujourd'hui, mais seulement dans des laboratoires, des bureaux d'étude, et des situations de terrain limitées à un faible nombre d'animaux. Les animaux auxquels on injecte ces vaccins deviennent infertiles pour une durée de 1 à 3 ans (Turner et Kirkpatrick, 1991).

3.1 Utilisation de la voie injectable.

Le véritable problème de l'immunocontraception à grande échelle sur une population sauvage est le choix de la voie d'administration. La voie injectable par l'utilisation de pistolets à fléchettes comme ceux employés sur les chevaux de l'île d'Assateague (Maryland, USA, Kirkpatrick et al., 1992) est seulement possible sur des animaux de grande dimension, facilement accessibles et lorsque la population cible est de petite taille. Il a donc été nécessaire de mettre au point d'autres stratégies d'administration pour les vaccins immunocontraceptifs.

3.2 Utilisation de microorganismes infectieux recombinants.

Une des approches envisageables pour administrer un vaccin à un grand nombre d'individus est l'utilisation de microorganismes infectieux recombinants (Tyndale-Biscoe, 1994b) ou l'utilisation de microorganismes recombinants distribués dans des appâts (Boyle, 1994). La réussite du contrôle des populations sauvages de lapin par la distribution d'appâts contenant le virus de la vaccine a montré que cette approche est réalisable (Brochier et al., 1990).

Dans cette approche, l'immunocontraception par vecteur viral pourrait être appliquée chez le lapin d'Europe sauvage en Australie en utilisant le virus de la myxomatose, spécifique

des lagomorphes. Ce dernier serait modifié génétiquement pour inclure un gène de gamète. Le virus infecterait les lapins, en tuerait certains, mais laisseraient ceux qui survivent avec une réponse immunitaire dirigée non seulement contre le virus, mais aussi contre la protéine du gène introduit. Cette réponse immunitaire ciblerait les protéines du spermatozoïde ou de l'ovocyte, rendant le lapin infertile. On peut supposer, qu'associée à la prédation et à la mortalité naturelle, cette méthode réduira de façon importante la population de lagomorphes. C'est dans cette optique que des expériences ont été menées avec l'antigène PH-20 (cf. V). Les résultats furent peu concluants puisque l'immunocontraception anti-PH-20 n'induit pas d'infertilité chez le lapin (Holland et al., 1997).

Bien que l'utilisation de microorganismes infectieux pour distribuer un antigène immunocontraceptif à des espèces nuisibles ait de l'avenir, cette technique ne peut qu'alerter l'opinion publique en ce qui concerne les espèces indigènes, comme les kangourous en Australie et les biches en Amérique du Nord. Il y a des différences importantes et évidentes entre un vaccin visant à empêcher la propagation de maladies contagieuses et qui menacent la vie, et un vaccin visant à retarder ou même à arrêter la croissance démographique d'une espèce et les risques à prendre ne sont pas les mêmes. Bien que la propagation ou la persistance non contrôlée d'espèces endémiques ne constitue pas un véritable problème, on ne peut pas dire la même chose d'espèces nouvellement introduites dans une région. La récente perte de contrôle du calicivirus chez les lapins en Australie a fortement choqué l'opinion publique, et rendra encore plus difficile l'utilisation de microorganismes recombinants dans le futur (Rudzki, 1995).

Un autre problème, souvent occulté, de l'utilisation de microorganismes infectieux libérant un vaccin immunocontraceptif est l'existence d'une immunité naturelle pré existante ou d'une immunité acquise envers le microorganisme utilisé pour transporter l'antigène. En effet, il paraît peu probable d'obtenir une immunisation permanente après une administration unique. Si l'on accepte que plusieurs rappels sont nécessaires en vue de générer une réponse immunitaire d'amplitude suffisante pour bloquer la fécondation, il paraît difficile d'imaginer comment un microorganisme infectieux présentera une réplication suffisante chez l'animal pour fournir de tels rappels et encore moins pour réaliser des rappels quelques années plus tard.

3.3 Utilisation de vaccins immunocontraceptifs par voie orale.

Ainsi, pour obtenir un contrôle efficace des populations sauvages, il semble que la voie orale soit la plus adaptée et la moins risquée des voies d'administration de l'antigène.

Actuellement, nous n'avons aucune information concernant la réponse immunitaire suite à une immunisation orale chez l'écureuil gris ou d'autres rongeurs (Moore et al., 1997) qui sont pourtant des modèles d'études communément employés en laboratoire. La technologie pour développer des vaccins par voie orale en est à ses premiers balbutiements, mais de rapides progrès sont très probables car il existe une importante demande à l'échelle internationale pour la conception de vaccins par voie orale contre des maladies humaines comme le choléra (Holmgren et al., 1993).

Le concept de plantes constituant des systèmes de production de vaccin oral a été d'abord défendu en tant que méthode économique par le biais de laquelle les pays en voie de développement pourraient produire des grandes quantités de vaccins pour leur population humaine (Moffat, 1995).

Le développement de système de distribution de vaccins basé sur les plantes est abordé de deux manières différentes :

- La première implique le développement de plantes qui possèderaient le gène vaccinal (transgène) de manière stable au sein de leur génome (plantes transgéniques).
-

L'approche connaissant le plus de succès en ce qui concerne l'utilisation des virus végétaux comme système d'expression vaccinal transitoire est le couplage de petits peptides immunogéniques, de 20 à 30 acides aminés de longueur, à la protéine de surface du virus. Le virus de la mosaïque du tabac (TMV) et le virus de la mosaïque de la dolique (CPMV) ont été évalués dans ce sens. Un système recombinant TMV a été développé, qui utilise les plants de tabac pour produire un immunogène à partir de la partie C-terminale du gène codant pour la protéine de la capsid virale, couplé à des gènes d'épitopes de sporozoïtes de paludisme (Turpen et al., 1995). Des études plus récentes ont également utilisé des protéines de la capsid du virus CPMV fusionnées soit avec des épitopes de rhinovirus humain de type 4, soit avec des épitopes du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (Usha et al., 1993 ; Porta et al., 1994 ; McLain, 1995). Dans les deux cas, les protéines obtenues sont capables de déclencher une réponse immunitaire humorale chez les animaux immunisés. Une approche similaire a permis d'obtenir une protéine de la capsid TMV fusionnée à un peptide de 13 acides aminés de la protéine ZP3 de souris (Fitchen et al., 1995). Cette protéine hybride est capable de déclencher une réponse en anticorps chez les souris immunisées. Bien que les anticorps produits ne se révélèrent pas capables de bloquer la fécondation, ils se liaient à la protéine ZP3 et étaient associés à des affections ovariennes. En ce qui concerne les gènes de la fonction reproductrice couramment impliqués dans l'immunocontraception, il y a un haut degré d'homologie entre les espèces. Par conséquent, le système de libération d'antigène vaccinal, le plus efficace et le moins coûteux pourrait bien être les virus de plantes.

Le TMV est le système d'expression des virus de plantes le plus caractéristique et il a été utilisé par de nombreux groupes de recherche en tant que « système modèle ». Cette approche est plus rapide et moins coûteuse en terme de ressources humaine et financière que la mise en place de plantes transgéniques. Bien que les deux systèmes de virus végétaux TMV et CPMV semblent bien adaptés à l'expression de peptides antigéniques, ils conviennent moins bien à l'expression de protéines entières. Les génomes des TMV et CPMV sont en effet relativement petits et ne peuvent donc pas facilement intégrer des gènes étrangers de grande dimension. Cela exclut ainsi l'expression d'importants complexes antigéniques ou la co-expression d'immunomodulateurs ou d'adjuvants oraux, comme la toxine cholérique ou les sous unités de toxines thermo-labiles d'*E.coli* (Mason et Arntzen, 1995). De plus, à cause du taux élevé de mutation caractérisant les virus à ARN, les gènes étrangers insérés risqueraient d'être instables et d'être rapidement inactivés avant même qu'un niveau suffisant d'antigène vaccinal n'ait été produit. Bien que ce fort taux de mutation soit considéré par certains comme un inconvénient, les défenseurs de ce protocole montrent que l'impact sur l'environnement de

ces virus végétaux recombinants sera minimal à partir du moment où le gène vaccinal, ayant « évolué vers la neutralité », sera rapidement perdu ou inactivé. Reste qu'avec cette méthode, le contrôle de l'antigène vaccinal est impossible ce qui n'est pas pour rassurer l'opinion publique.

3.3.2. Plantes transgéniques.

L'utilisation de plantes transgéniques en vue d'administrer un vaccin a été entreprise pour la première fois par le Boyce Thompson Institute for Plant Research (Itaqua, New York) qui concentre ses efforts à transformer la banane en un vaccin naturel, prêt à l'emploi (Mason et Arntzen, 1995). La banane est un candidat intéressant car elle présente une croissance prolifique dans la plupart des pays en voie de développement du monde, elle est consommée par une population de tout âge et elle est mangée crue, ce qui évite une dénaturation potentielle par la chaleur de l'antigène vaccinal lors de sa cuisson.

Sous la direction de Charles Arntzen, le groupe a démontré la capacité de plants de tabac transgéniques à exprimer l'antigène de surface de l'hépatite B (Thanavala et al., 1995) et la capacité de tubercules de pommes de terre à exprimer la sous-unité thermo-labile de l'entérotoxine B d'*Escherichia coli* entérotoxino-gène (Haq et al., 1995). La réponse immunitaire générée par ces produits dérivés de plantes fut comparée de manière favorable avec celle obtenue suite à l'immunisation avec les antigènes produits classiquement par des levures. De manière plus significative, des études ultérieures démontrèrent la présence à la fois d'anticorps IgG circulants et d'IgA sécrétoires suite à l'ingestion de pommes de terres transgéniques par des souris (Mason et al., 1996). Bien que la réponse immunitaire obtenue par les antigènes dérivés des plantes soit sub-optimale, les deux études ont montré le potentiel énorme de cette approche pour la vaccination orale.

Dans les études suivantes, ce même groupe de recherche a réussi à exprimer la protéine de la capsid du virus Norwalk à la fois dans des chutes de tabac et dans des tubercules de pomme de terre (Mason et al., 1996). La protéine de la capsid était capable de s'auto assembler pour former des particules semblables au virus et une réponse immunitaire systémique et locale a été obtenue chez la souris suite à la vaccination par voie orale. La protéine de la capsid du virus Norwalk était exprimée dans des tubercules de pomme de terre à un niveau de 0,37% des protéines solubles totales, ce qui constitue un niveau relativement important.

Bien que la réalisation de plantes transgéniques devient un acte classique pour de nombreuses espèces, il reste un certain nombre de problèmes ; le procédé nécessite du temps et l'investissement de grandes quantités de travail. De plus, le niveau d'expression des transgènes est variable, imprévisible et souvent instable (Finnegan et McElroy, 1994 ; Ingelbrecht et al., 1994 ; Smith et al., 1994). Il est actuellement en particulier impossible de prévoir si le transgène sera stable en se propageant au fil des générations dans les conditions du terrain. Un certain nombre de mécanismes déclencheurs a été identifié comme étant capables d'augmenter la probabilité de rendre le gène silencieux. L'inclusion de séquences répétées, de copies multiples du transgène, ou encore l'utilisation de promoteurs entraînant un haut niveau de transcription, conduit fréquemment au phénomène de gène silencieux (Finnegan et McElroy, 1994). Ceci est particulièrement problématique car la clef de la réussite d'un vaccin basé sur les plantes repose principalement sur le niveau d'expression maximal du gène vaccinal (Thanavala et al., 1995).

Les vaccins issus de plantes transgéniques sont particulièrement adaptés au contrôle par immunocontraception de la faune sauvage. Des essais de terrain ont été menés en Australie. Les plantes transgéniques peuvent être utilisées comme système de libération vaccinal pour les herbivores sauvages de deux manières différentes : soit la plante pourrait être semée sur la zone cible et devenir un vaccin qui se propage seul, soit les pépins, fruits et restes pourraient être récoltés et utilisés comme appâts oraux qui pourraient être ensuite distribués dans des lieux spécifiques.

La première approche présente les mêmes avantages et inconvénients que l'utilisation de système de libération vaccinal basé sur l'utilisation de vecteurs viraux ou bactériens. Compte tenu des succès d'implantation d'espèces de prairie en Australie, on peut penser qu'une telle approche est applicable. Plus de 70 espèces de prairie exotiques et de légumes ont été introduits en Australie afin d'améliorer la productivité des prairies cultivées, et on estime que ces espèces de pâture exotiques occupent aujourd'hui approximativement 20% des prairies australiennes. Bien que cette approche soit la moins coûteuse à produire et à administrer, c'est aussi la plus difficile à contrôler : l'incapacité à contrôler soit la distribution géographique finale de la plante, soit l'éventail des espèces d'herbivores susceptibles de la consommer, rend cette approche inappropriée à la vaccination immunocontraceptive.

L'approche actuellement développée pour la libération de vaccins immunocontraceptifs à grande échelle contre des espèces nuisibles est l'utilisation de plants

de carottes ou de maïs transgéniques exprimant un antigène immunocontraceptif approprié associé à un adjuvant au sein de leurs grains ou tubercules. Ces plantes pourraient pousser et leurs grains et tubercules être récoltés de manière classique. Ces derniers pourraient être ensuite distribués comme appâts deux à trois fois par an à des points d'eau clôturés et équipés avec des points de passage sélectifs permettant la libre circulation des kangourous et wallabies et empêchant l'entrée des moutons domestiqués et autre bétail. Il convient en effet de vacciner les espèces sauvages, mais en aucun cas le bétail d'élevage circulant librement sur le territoire australien. Le contrôle des points d'eau dans les prairies australiennes utilisant des clôtures et des portes de passage pour le bétail est adopté par un nombre de ranchs de plus en plus importants dans ces zones. En incorporant des portes de passage, ces points d'eau contrôlés deviennent des enclos de rassemblement qui permettent aux éleveurs de rassembler pratiquement l'ensemble du bétail sur leur propriété en un ou deux jours. En équipant ces enclos déjà existants de points de passage sélectifs, la prise de vaccins par des espèces non visées devrait être minimisée. Des essais préliminaires utilisant des enclos à points de passage sélectifs conduits dans le sud-ouest de la province du Queensland indique que cette approche devrait limiter l'accès aux appâts aux espèces cibles (Smith et al., 1997).

Le maïs semble particulièrement adapté à cette application car ses exigences de culture importantes devraient réduire le risque de voir cette plante se propager seule à partir des grains. De plus, l'utilisation de maïs hybride devrait réduire le risque de propagation autonome car les générations suivantes de tels hybrides sont moins vigoureuses et prolifiques que la génération F1 initiale. Un autre avantage du maïs est qu'il ne possède pas d'espèces apparentées en Australie, rendant le risque d'hybridation et de transfert de gène à des espèces endémiques ou introduites extrêmement peu probable.

3.4 Amélioration de la réponse immunitaire de vaccins basés sur les plantes.

La réponse immunitaire au niveau du tractus gastro intestinal est généralement peu importante à cause de la dégradation enzymatique et de la dénaturation des protéines induite par les différents pH des différents compartiments du tube digestif (Shalaby, 1995). De plus, l'ingestion régulière de petites doses d'antigènes peut induire une tolérance immunitaire spécifique (Mowat, 1987). Ces problèmes s'appliquent aux vaccins basés sur les plantes à des degrés variables. De nombreuses méthodes ont été utilisées pour contourner ces problèmes et pour améliorer la réponse immunitaire locale aux vaccins par voie orale. Cela peut de manière grossière être réparti en méthodes qui : (1) protègent l'antigène contre la dégradation ; (2)

augmentent l'absorption d'antigènes par les microvillosités, ou par les cellules M dans le tractus gastro-intestinal ; et (3) fournissent un stimulus au système immunitaire (Walker, 1994). Deux des immunogènes oraux les plus puissants identifiés, la toxine cholérique et la toxine thermolabile d'*E.coli*, exercent leurs effets par tous les phénomènes cités précédemment. Ces toxines sont résistantes à la dégradation enzymatique et à l'acidité, se lient aux récepteurs de surface des cellules M, et possèdent des domaines enzymatiques qui fournissent des effets immunogènes puissants. L'absorption simultanée par voie orale d'antigènes et de toxines entraîne une stimulation forte de la réponse immunitaire aux deux composants. Cependant, la co-expression d'une toxine complète comme adjuvant associée à un antigène immunocontraceptif au sein de plantes transgéniques ne sera probablement pas réalisable à cause de sa toxicité. De plus, la présence de toxines ou même de n'importe quel adjuvant oral, pourrait également stimuler fortement la réponse immunitaire contre les protéines de plantes et conduire au développement d'allergies alimentaires (Spangler, 1992).

La plus grande attention est portée sur les sous-unités β des toxines comme moyen d'amélioration spécifique, non toxiques dans les conditions d'utilisation en adjuvant. En général, la réponse immunitaire locale suivant l'ingestion par voie orale sera seulement générée contre un antigène ou un peptide lié à la sous-unité β (Holmgren et al., 1993). En conséquence, les sous-unités β des toxines bactériennes pourraient constituer la base de futurs vaccins basés sur les plantes ; sous réserve que l'utilisation de tels adjuvants n'entraîne pas le développement simultané d'allergies alimentaires. Des souris nourries avec des tubercules de pomme de terre issus de plants exprimant la sous-unité β thermo-labile d'*E.coli* développent à la fois une réponse générale en IgG et une réponse au niveau gastro-intestinal en IgA contre la sous-unité β (Haq et al., 1995). Le futur développement des vaccins basés sur les plantes va probablement consister à améliorer génétiquement la fusion des antigènes candidats aux

systèmes sont assez importants pour justifier l'importance de moyens nécessaires mis en œuvre par les groupes de recherche du monde.

Selon Warren (1995), le développement et la mise en application de l'immunocontraception pour la gestion de la faune sauvage nécessitera une approche multidisciplinaire impliquant les laboratoires scientifiques (c'est à dire des immunologistes, des biologistes moléculaires, et des physiologistes de la reproduction) qui développent les vaccins contraceptifs et les technologies associées, mais aussi des biologistes de la faune sauvage qui doivent subtilement adapter le développement d'un système de libération et réaliser des mesures de terrain pour évaluer l'efficacité et la sécurité de l'immunocontraception. Cette dernière est une technologie pleine d'avenir qui est amenée à intégrer les méthodes traditionnelles de gestion de la faune sauvage. La recherche en continu est la clef pour développer tout le potentiel de cette technologie.

CONCLUSION

Les molécules mises en jeu dans le processus de reconnaissance spermatozoïde-ovocyte ont été, en partie, identifiées et il semble que la ZP3 de l'ovocyte et la PH-20 du spermatozoïde constituent les voies de recherches les plus intéressantes pour l'immunocontraception. L'antigène GnRH, possède un rôle clef dans l'élaboration des gamètes et se trouve être une cible privilégiée, mais à l'heure actuelle les chercheurs orientent principalement leurs travaux vers le développement d'implants analogues de la GnRH.

Les antigènes purifiés sont faiblement immunogènes et il sera probablement nécessaire d'utiliser des adjuvants renforçant la réponse immunitaire générale mais surtout locale. Cependant, les résultats actuels déjà obtenus sont particulièrement encourageants et l'on peut penser que l'immunocontraception est une méthode alternative à la contraception chimique ou chirurgicale intéressante.

En ce qui concerne les inquiétudes du public au sujet de l'administration de vaccins contraceptifs par voie orale, on peut signaler que les chercheurs sont en relation permanente avec des instances de contrôle tels que la « Food and Drug Administration (FDA) » aux Etats-Unis. L'immunocontraception pourrait apporter une plus grande sécurité pour la consommation d'animaux sauvages par les humains ou par d'autres animaux par rapport à la contraception chimique ou à l'utilisation de produits mortels pour limiter les populations sauvages. D'autre part, la consommation des anticorps des animaux placés sous immunocontraception ne devraient pas présenter de danger particulier lors de leur consommation. Ces anticorps s'additionnent aux millions d'autres anticorps, qui sont tous, comme tout aliment protéique, un ensemble d'acides aminés ; ces derniers étant sans danger pour l'organisme qui les digère.

L'immunocontraception se présente, à l'évidence, comme une méthode d'avenir dans le contrôle de la reproduction animale et ce pour les animaux de rente, de compagnie ou encore la faune sauvage.

On peut penser, compte tenu de l'avancée actuelle des recherches et ce notamment en biologie de la reproduction humaine, que l'immunocontraception sera applicable dans les prochaines années.

BIBLIOGRAPHIE :

- Adams, T.E., Adams, B.M., 1992. Feedlot performance of steers and bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 70, 1691-1698.
- Afzalpurkar, A., Gupta, S.K., 1997. Identification of epitopes of monoclonal antibodies to porcine zona pellucida 3 β glycoprotein, a homologue of the mouse/human sperm receptor. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38, 26-32.
- Afzalpurkar, A., Shibahara, H., Hasegawa, A., Koyama, K., Gupta, 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., Paterson, M., van Duin, M., 1996. The potential of the zona pellucida as a target for immunocontraception. *Am. Reprod. Immunol.* 35, 175-180.
- Albini, B., Ossi, E., Neuland, C., Noble, B., Andres, G., 1979. Deposition of immune complexes in the ovarian follicle of rabbits with experimental chronic serum sickness. I. Immunopathology. *Lab. Invest.* 41, 446-454.
- Alistair, J., Ramsay, Ramshaw, A., 1997. Cytokine enhancement of immune response important for immunocontraception. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 91-97.
- Andrews, J. 1994. Identification of rabbit genes homologous to the guinea pig sperm surface proteins PH-20 and PH-30: molecular cloning of rabbit PH-20 cDNA. B.Sc. Thesis. Australian National University, Canberra.
- Arthaud, V.H., Mandigo, R.W., Koch, R.M., Kotula, A.W., 1977. Carcass composition, quality and palatability attributes of bulls and steers fed different energy levels and killed at four ages. *J. Anim. Sci.* 44, 53-64.
- Aviles, M., Martinez Menarguez, J.A., Castells, M.T., Madrid, J.F., Ballesta, J., 1994. Cytochemical characterization of oligosaccharide side chains of the glycoproteins of rat zona pellucida: an ultrastructural study. *Anat. Rec.* 239, 137-149.
- Baca, M., Zamboni, L., 1967. The fine structure of human follicular oocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 3, 354-381.
- Bagavant, H., Thillai Koothan, P., Sharma, M.G., Talwar, G.P., Gupta, S.K., 1994. Antifertility effects of porcine zona pellucida-3 immunization using permissible adjuvants in female bonnet monkeys (*Macaca radiata*): reversibility, effect on follicular development and hormonal profiles. *J. Reprod. Fertil.* 102, 17-25.
- Baker, A.M., Gonyou, H.W., 1986. Effects of zeronal implantation and late castration on sexual, agonistic and handling behaviour in male feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 62, 1224-1232.

- Balser, D.S. 1964. Atifertility agents in vertebrate pest control. *Proceeding of the vertebrate pest conference*. 2, 133-137.
- Bamezai, A.K., Mahi-Brown, C.A., Talwar, G.P., 1988. Inhibition of penetration of canine zonae pellucida by homologous spermatozoa in vitro using monoclonal antibodies raised against porcine zonae. *J. Reprod. Immunol.* 13, 85-95.
- Bao, S., Goldstone, S., Husband, A.J., 1993. Localization of IFN- γ and IL-6 in murine intestine by in situ hybridization. *Immunology*. 80, 666-670.
- Barber, M.R., Fayrer-Hosken, R.A., 2000. Evaluation of somatic and reproductive immunotoxic effects of the porcine zona pellucida vaccination. *J. Exp. Zool.*(Presse)
- Barber, M.R., Merckle, R.K., Fayrer-Hosken, R.A., 1999. Evaluation of carbohydrates of the dog, cat and elephant zona pellucida using lectins. *Theriogenology*. 51, 278.
- Bar-Shira Maymon, B., Maymon, R., Ben-yun, I., Ghetler, Y., Y., Shalgi, R., Skutelsky, E., 1994. Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 102, 81-86.
- Beagley, K.W., Bao, S., Ramsay, A.J., Eldridge, J.H., Husband, A.J., 1995. IgA production by peritoneal cavity B cells is IL-6-independent: implications for intestinal IgA responses. *Eur. J. Immunol.* 25, 2123-2126.
- Benoff, S., 1997. Carbohydrates and fertilisation: an overview. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 599-637.
- Berger, T., Davis, A., Wardrip, N.J., Hedrick, J.L., 1989. Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 86, 559-565.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M., 1988. Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6778-6782.
- Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., and White, J.M., 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*. Lond. 356, 248-252.
- Blockey, M.A., Galloway, D.B., 1978. Hormonal control of serving capacity in bulls. *Theriogenology*. 9, 143-151.
- Bookbinder, L.H., Cheng, A., Bleil, J.D., 1995. Tissue and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science*. 269, 86-89.
- Browner, G.R., Kiracofe, G.H., 1978. Factors associated with the buller steer syndrome. *J. Anim. Sci.* 46, 26-31.

- Boyle, D.B., 1994. Disease and infertility control in wildlife and feral animal population: options for vaccine delivery using vectors. Immunological control of fertility: from gametes to gonads. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 393-400.
- Brochier, B., Thomas, I., Bauduin, B., Leveau, T., Pastoret, P.-P., Languet, B., Chappuis, G., Desmettre, P., Blancou, J., Artois, M., 1990. Use of a vaccinia rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. *Vaccine.* 8, 101-104.
- Brugère, H. Cours de physiologie, ENVA, 2000.
- Brusman, H.H., Linhart, D.S., Balser, D., Sparks, L.H., 1968. A technique for producing antifertility tallow baits for predatory mammals. *Journal of wildlife management.* 32, 183-184.
- Burks, D.J., Carballada, R., Moore, H.D.M., Sailing, P.M., 1995. A tyrosine kinase from human sperm interacts with the zona pellucida at fertilization. *Science.* 269, 83-86.
- Burton, D.R., Woof, J.M., 1992. Human antibody effector fonction. *Adv. Immunol.* 51, 1-84.
- Carreli, C., Audibert, F., Gaillard J., Chedid, L., 1982. Immunological castration of male mice by a totally synthetic vaccine administrated in saline. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 5392-5395.
- Chaffaux, S., Grochat, C., Carreli, C., Deletang, F., 1985. Imisation active anti-gonadolibérine chez le bélier pré-pubère. *Receuil de Médecine Vétérinaire.* 161(4), 335-341.
- Chapmann, N.R., Barratt, C.L.R., 1996. The role of carbohydrate in sperm ZP3-adhesion. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 767-774.
- Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L.H., Wassarman, P.M., Suzuki, F., Bleil, J.D., 1994. Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J. Cell. Biol.* 125, 867-878.
- Czerkinsky, C., Holmgren, J., 1995. The mucosal immune system and prospects for anti-infectious and anti-inflammatory vaccines. *Immunologist.* 3, 97-103.
- D'Occhio, M.J. 1993. Immunological suppression of reproductive functions in male and female mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 345-372.
- Doolittle, R.F., 1995. The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 287-314.
- Ducibella, T., 1996. The cortical reaction and developpement of activation competence in mammalian ovocytes. *Hum. Reprod.* 2, 29-42.
- Dunbar, B.S., Bundman, D.S., 1987. Evidence for a role of the major glycoprotein in the structural maintenance of the pig zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 81, 363-376.

- Dunbar, B.S., Wardrip, N.J., Hedrick, J.L., 1980. Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry*. 19, 356-365.
- Dunbar, B.S., Lo, C., Powell, J., Stevens, V., 1989. Use of a synthetic peptide adjuvant for the immunization of baboons with denatured and deglycosylated pig zona pellucida glycoproteins. *Fertil. Steril.* 52, 311-318.
- Dunbar, B. S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schawhm, D., Schwoebel, E., Skinner, S., and Wilkins, B., 1994. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. In 'Immunological control of fertility: from gametes to gonads. *Reprod.Fertil.Dev.* 6, 331-347.
- East, I.J., Gulyas, B.J., Dean, J., 1985. Monoclonal antibodies to the murine zona pellucida protein with sperm receptor activity: effects on fertilization and early development. *Dev. Biol.* 109, 268-273.
- Edwards, J.N.T., Morris, H.B., 1985. Langerhans cells and lymphoid subset in the female genital tract. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 92, 947-982.
- Ehrhardt, R.O., Stroeber, W., Harriman, G.R., 1992. Effects of transforming growth factor (TGF)- β 1 induces a small increase in sIgA+ cells regardless of the method of B cell activation. *J. Immunol.* 148, 3830-3836.
- Ellis, D.H., Hartmann, T.D., Moore, H.D.M., 1985. Maturation and function of the hamster spermatozoon probed with monoclonal antibodies. *J. Reprod. Immunol.* 7, 299-314.
- Enright, W.J., Prendiville, D.J., Finnerty, M., Spicer, L.J., Crowe, M.A., Roche, J.F. 1994. Comparison of GnRH-immunized post-pubertal bulls with contemporary steers and intact bulls: plasma testosterone and insulin-like growth factor-I (IGF-1), and performance. *J. Anim. Sci.* 72, 325.
- Fayrer-Hosken, R.A., Caudle, A.B., Shur, B.D., 1991. Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 28, 74-78.
- Fayrer-Hosken, R.A., Bertschinger, H.J., Kirkpatrick, J.R., 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.
- Field, R.A., 1971. Effects of castration on meat quality and quantity. *J. Anim. Sci.* 32, 849-858.
- Finnegan, J., McElroy, D., 1994. Transgene inactivation: plants fight back. *Bio/technol.* 12, 883-886.

- Finnerty, M., Enright, W.J., Prendiville, D.J., Spicer, L.J., Roche, J.F., 1996. The effect of different levels of gonadotrophin-releasing hormone antibody titres on plasma hormone concentrations, sexual and aggressive behaviour, testis size and performance of bulls. *J. Anim. Sci.* 63, 51-63.
- Fisher, A.D., Crowe, M.A., Alonso de la varga, M.E., Enright, W.J., 1996. Effect of castration method and the provision of local anesthesia on plasma cortisol, scrotal circumference, growth, and feed intake of bull calves. *J. Anim. Sci.* 74, 2336-2343.
- Fitchen, J., Beachy, R.N., Hein, M.B., 1995. Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine.* 13, 1051-1057.
- Florman, H.M., Wassarman, P.M., 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 accounts for its sperm receptor activity. *Cell.* 41, 313-324.
- Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L., 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal and gene-gun inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11478-11482.
- Garrison, M.V., Johns, B.E., 1975. Antifertility effects of SC-20775 in Norway and Polynesian rats. *Journal of wildlife management.* 39, 26-29.
- Garrot, R.A., 1995. Effective management of free ranging ungulate populations using contraception. *Wildlife Society Bulletin.* 23, 445-452.
- Garza, K.M., Lou, Y.H., Tung, K.S., 1998. Mechanism of ovarian autoimmunity: induction of T cell and antibody responses by T cell epitope mimicry and epitope spreading. *J. Reprod. Immunol.* 2, 87—101.
- Gentry, P.A., Zareie, M., Liptrap, R.M., 1996. Fibronectin concentrations correlate with ovarian follicular size and estradiol values in equine follicular fluid. *Anim. Reprod. Sci.* 45, 91-102.
- Gerrard, D.E., Jones, S.J., Aberle, E.D., Lemenager, R.P., Dieckman, M.A., Judge, M.D., 1987. Collagen stability, testosterone secretion and meat tenderness in growing bulls and steers. *J. Anim. Sci.* 65, 1236-1242.
- Gmachl, M., and Kreil, G., 1993. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc.Natl.Acad.USA.* 90, 3569-3573.
- Goldberg, E. 1990. Lactate dehydrogenase C4 as an immunocontraceptive model. In 'Gamete interaction: prospects for immunocontraception. P63-73.
- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Mousigny, M., Osawa, T., Sharon, N., 1980. What should be called a lectin? *Nature.* 66, 286.

- Gong, X., 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.
- Gregory, K.E., Ford, J.J., 1983. Effects of late castration, zeranol and breed group on growth, feed efficiency and carcass characteristic of late maturing bovine males. *J. Anim. Sci.* 56, 771-780.
- Griffin, P.D., 1992. Options for immunocontraception and issues to be adressed in the developpement of birth control vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology*. 36, 111-117.
- Grill, L.K., 1993. Tobacco mosaic virus as a gene expression vector. *Agro-Food. Ind. Hi-Tech*. 20-23.
- Guarino, J.L., Schaffer, E.W., 1974. A program for developping male chemosterilisants for red-winged blackbirds. *Proceedings of the Bird Control Seminar*. 6, 201-205.
- Gupta, S.K., Bagavant, H., Chadha, K., Gupta, M., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., 1993. Mapping of immunogenic domains on porcine zona pellucida 3 alpha and beta glycoproteins by murine monoclonal antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 30, 95-100.
- Gupta, S.K., Yurewicz, E.C., Afzalpurkar, A., Rao, K.V., Gage, D.A., Wu, H., Sacco, A.G., 1995. Localization of epitopes for monoclonal antibodies at the N-terminus of the porcine zona pellucida glycoproteinp ZPC. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 220-225.
- Gupta, S.K., Chadha, K., Harris, J.D., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., Kolluri, S.K., Afzalpurkar, A., 1996. Mapping of epitopes on porcine zona pellucida-3 α by monoclonal antibodies inhibiting oocyte-sperm interaction. *Biol. Reprod.* 55, 410-415.
- Guraya, S.S., 1974. Morphology, histochemistry, and biochemistry, of human oogenesis and ovulation. *Int. Rev. Cytol.* 37, 121-151.
- Gwatkin, R.B., Williams, D.T., Carlo, D.J., 1977. Immunzation of mice with heat-solubilized hamster zonae: production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Fertil. Steril.* 28, 871-877.
- Haq, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D., Arntzen, C.J., 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*. 268, 714-715.
- Heberg, B., Kendall, D., Amerongen, H.M., Apter, F.M., Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R., 1995. Induction of specific IgA in small intestine, colon-rectum, and vagina measured with a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.* 75, 145-156.

- Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K.T., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB, and ZPC gene families. *DNA seq.* 4, 361-393.
- Hasegawa, A., Koyama, K., Inoue, M., Takemura, T., Isojima, S., 1992. Antifertility effect of active immunization with ZP4 glycoprotein family of porcine zona pellucida in hamsters. *J. Reprod. Immunol.* 22, 197-210.
- Hasegawa, A., Koyama, K., Okazaki, Y., Suimoto, M., Isojima, S., 1994. Amino acid sequence of porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 determined by peptide mapping and cDNA cloning. *J. Reprod. Fertil.* 100, 245-255.
- Henderson, C.J., Hulme, M.J., Aitken, R.J., 1987a. Analysis of the biological properties of antibodies raised against intact and deglycosylated porcine zona pellucidae. *Gamete Res.* 16, 323-341.
- Henderson, C.J., Braude, P., Aitken, R.J., 1987b. Polyclonal antibodies to a 32-kDa deglycosylated polypeptide from porcine zona pellucidae will prevent human gamete interaction in vitro. *Gamete Res.* 18, 251-265.
- Henderson, C.J., Hulme, M.J., Aitken, R.J., 1988. Contraceptive potential of antibodies to the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 83, 325-344.
- Hinch, G.N., Lynch, J.J., Thwaites, C.J., 1982/83. Patterns and frequency of social interactions in young grazing bulls and steers. *Applied Animal Ethology.* 9, 15-30.
- Holland, M., K., Jackson, R. J., 1994. Virus vectored immunocontraception for control of wild rabbits: identification of target antigens and construction of recombinant viruses. In 'Embryonic stem cells and transgenic livestock'. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 631-642.
- Holland, M.K., Andrews, J., Clarke, H., Walton, C., Hinds, L.A., 1997. Selection of antigen for use in a virus vectored immunocontraceptive vaccine: PH-20 as a case study. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 117-124.
- Holmgren, J., Lycke, N., Czerninski, C., 1993. Cholera toxin and cholera b subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine.* 11, 1179-1184.
- Hou, S-T., 1996. Molecular cloning and characterization of rat sperm surface antigen 2B1, a glycoprotein implicated in sperm zona binding. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 193-203.
- Huang, T.T., Flemming, A.D., Yanagimachi, R., 1981. Only acrosome reacted spermatozoa can bind and penetrate into zona pellucida: a study using guinea-pig. *J. Exp. Zool.* 217, 286-290.
- Hunnicut G.R., 1996. Structural relationship of sperm soluble hyaluronidase to the sperm membrane protein PH-20. *Biol. Reprod.* 54, 1343-1349.

Hunnicut, G.R., 1996. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol. Reprod.* 55, 80-86.

Ingelbrecht, I., Vandhouth, H., Vanmontagu, M., Depicker, A. 1994. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 105002-105006.

Jago, J.G., 1997. The effects of active immunization against GnRH on behaviour, reproductive physiology, growth and meat quality in male cattle. Ph. D. *Thesis*. University of Waikato.

Jeffcoate, I.A., Lucast, J.M.S., Crighton, D.B., 1982. Effects of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Theriogenology.* 18, 65-77.

Rapport-Gratuit.Com

Kudo, K., Yonezawa, N., Katsumata, T., Aoki, H., Nakano, M., 1998. Localisation of carbohydrates chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 252, 492-499.

Kunimoto, D.Y., Nordan, R.P., Stroeber, W., 1989. IL-6 is a potent cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. *J. Immunol.* 143, 2230-2235.

Larson, J.L., Miller, D.J., 1997. Sperm from a variety of mammalian species express β 1,4-galactosyltransferase on their surface. *Biol. Reprod.* 57, 442-453.

Lathrop, W.F., Carmichael, E. P., Myles, D.G., Primakoff, P., 1990. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J. Cell. Biol.* 111, 2939-2949.

Lehner, T., Bergmeier, L.A., Panagiotidi, C., Tao, L., Brookes, R., Klavinskis, L. S., Walker, P., Ward, R.G., Hussain, L., Gearing, A.J.H., Adams, S.E., 1992. Induction of mucosal and systemic immunity to a recombinant simian immunodeficiency viral protein. *Science.* 258, 1365-1369.

Leong, K.H., Ramsay, A.J., Boyle, D.B., Ramshaw, I.A., 1994. Selective induction of immune responses by cytokines co-expressed in recombinant fowlpox virus. *J. Virol.* 68, 8125-8130.

Leong, K.H., Ramsay, A.J., Morin, M.J., Robinson, H.L., Boyle, D.B., Ramshaw, I.A., 1995. Generation of enhanced immune responses by consecutive immunization with DNA and recombinant fowlpox virus. In 'Vaccines 95' (Eds F. Brown, R. Chanock, H. Ginsberg, E. Norrby). 327-331.

Leyton L., Saling P., 1989. 95kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell.* 57, 1123-1130.

Lin, Y., Kimmel L.H., Myles, D.G., Primakoff, P., 1993. Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10071-10075.

Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.,G., and Primakoff, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus layer surrounding the eggs. *J. Cell. Biol.* 125, 1157-1163.

Liu, I.K.M., Bernoco, M., Feldman, M., 1989. Contraception in mares heteroimmunized with pig zonae pellucidae. *J. Reprod. Fertil.* 85, 19-29.

Liu, C., Litsher, E.S., Wassarman, P.M., 1997. Zonae pellucidae glycoprotein mZP3 bioactivity is not dependant on the extent of glycosylation of its polypeptide or on sulfation and sialylation of its oligosaccharides. *J. Cell. Sci.* 110, 745-752.

Lobley, G.E., Connel, A., Morris, B., Anderson, R., Clayton, J., Williams, P.E.V., Nevinson, I.M., 1992. The effect of active immunization against GnRH on growth performance and sample joint composition of bulls. *Animal Production*. 55, 193-202.

Loeser, C.R., Tulsiani, D.R., 1999. The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 60, 94-101.

Lou, Y.H., Bagavant, H., Ang, J., McElveen, M.F., Thai, H., Tung, K.S., 1996. Influence of autoimmune ovarian disease pathogenesis on ZP3 contraceptive vaccine design. *J. Reprod. Fertil Suppl.* 50, 159-163.

Lu, Q., Shur, B.D., 1997. Sperm from β 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Developement.* 124, 4121-4131.

Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R., Hoffman, J.C., Hug, T.T.F., 1985. Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zonae pellucida: use of different adjuvants and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biol. Reprod.* 32, 761-772.

Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R., Nelson, M.L., Yanagimachi, H., Palumbo, N., 1988. Ovarian histopathology of bitches immunized with porcine zonae pellucidae. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 18, 94-103.

Mason, H.S., Arntzen, C.J, 1995. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends. Biotech.* 13, 388-392.

Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.J., Jiang, X., Estes, M.K., Arntzen, C.J., 1996. Expression of Norwalk virus capsid in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5335-5340.

McLain, L., Porta, C., Lomonosoff, G.P., Durrani, Z., Dimmock, N.J., 1995. Human immunodeficiency virus type 1-neutralising antibodies raised to a glycoprotein 41 peptide expressed on the surface of a plant virus. *AIDS res. Hum. Repro.* 11, 327-334.

Matschke, G.H., 1976. Oral acceptance and antifertility effects of microencapsulated diethylstilbestrol on white tailed does. *Proceeding of the Southeast Association of Game and Fish Commission.* 29, 646-651.

Matschke, G.H., 1977. Antifertility action of two synthetic progestins female white-tailed deer. *Journal of wildlife management.* 41, 194-196.

Matschke, G.H., 1980. Efficacy of steroid implants in preventing pregnancy in white tailed deer. *Journal of wildlife management.* 44, 756-758.

Matthew, R., Barber, Fayer-Hosken, R.A., 2000. Possible mechanism of mammalian immunocontraception. *Journal of reproductive immunology.* 46, 103-124.

- Mestecky, J., 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretion. *J. Clin. Immunol.* 7, 265-776.
- Mestecky, J., McGhee, J.R., 1987. Immunoglobulin A : molecular and cellular interactions involved in AgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 401, 53-245.
- Millar, S.H., Chamow, S.M., Baur, A.W., Oliver, C., Robey, F., Dean, J., 1989. Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long term contraception in female mice. *Science.* 246, 935-938.
- Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D., 1992. Complementary between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature.* 357, 589-593.
- Miller, D.J., Gong, X., Decker, G., Shur, B.D., 1993. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell. Biol.* 123, 1431-1440.
- Miller D.J., 1993. Sperm require β -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Developpement.* 118, 1279-1289.
- Miller, C.J., McGhee, J.R., Gardner, M.B., 1992. Mucosal immunity, HIV transmission and AIDS. *Lab. Invest.* 68, 129-145.
- Mircu, C., Cernescu, H., Ghise, G.H., Ardelean, V., Bonca, G.H., Violeta, I., 2000. Effects of immunization with porcine zona pellucida and oocytes upon reproductive function in the bitch. *Acta veterinaria* (Beograd). 50, 215-224.
- Moffat, A.S. 1995. Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science.* 268, 658-660.
- Mohan Raj, A.B., 1988. Biochemical, physiological and behavioural parameters as determinants of meat quality. Ph. D. *Thesis.* Queen's University of Belfast. 132p.
- Moore, H.D.M., 1990. The development of sperm-egg recognition processes in mammals. *J. Reprod. Fertil.* 42, 71-78.
- Moore, H.D.M., 1995. Modification of sperm antigens during capacitation. In 'Human Sperm Acrosom Reaction' (Eds P. Fenichel et J. Parinaud). J. Libbley, Montrouge, France. p35-43.
- Moore, H.D.M., Smith, C.A., Hartman, T.D., Bye, A.P., 1987. Visualization and characterization of the acrosome reaction of human spermatozoa by immuno-localization with monoclonal antibody. *Gamete. Res.* 17, 245-259.
- Moore, H.D.M., Jenkins, N.M., Wong, C., 1997. Immunocontraception in rodents: a review of the developpement of a sperm-based immunocontraceptive vaccine for the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 125-129.

- Mori, K., Daitoh, T., Irahara, M., Kamada, M., Aono, T., 1989. Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am. J. Obst. Gynecol.* 161, 207-211.
- Mori, K., Daitoh, T., Kamada, M., Maeda, N., Maegawa, M., Hirano, K., Irahana, M., Aono, T., 1993. Blocking of human fertilization by carbohydrates. *Hum. Reprod.* 8, 1729-1732.
- Mossman, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.
- Mowat, A.M., 1987. The regulation of immune responses to dietary protein antigen antigens. *Immunol. Today.* 8, 93-98.
- Murray, P.D., McKenzie, D.T., Swain, S.L., Kagnoff, M.E., 1987. Interleukin 5 and Interleukin 4 produced by peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.* 139, 2669-2674.
- Myles, D. G., Primakoff, P., 1984. Localised surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilisation. *J. Cell Biol.* 99, 1634-1641.
- Myles D.G., Primakoff P., 1997. Why did the sperm cross the cumulus ? To get the oocyte. Functions of the sperm surface PH 20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol. Reprod.* 56, 320-327.
- Noguchi, S., Hatanaka, Y., Tobita, T., Nakano, M., 1992. Structural analysis of the N-linked carbohydrates chains of the 55-kDa glycoprotein family (pZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 204, 1089-1100.
- Oikawa, T., Yanagimachi, R., 1975. Block of hamster fertilization by anti-ovary antibody. *J. Reprod. Fertil.* 45, 487-494.
- Pardoll, D.M., Beckerleg, A.M., 1995. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity.* 3, 165-169.
- Parillo, F., Stradaoli, G., Dall'Aglio, C., Verini-Supplizi, A., 1996. Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. *Vet. Res. Commun.* 20, 225-236.
- Porta, C., Spall, V.E., Loveland, J., Johnson, J.E., Barker, P.J., Lomonossoff, G.P., 1994. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology.*
- Patterson, M., 1990. Developpement of vaccine targeting the zona pellucida. *Cur. Opin. Immunol.* 2, 743-747.
- Pecquet, S.S., Ehrat, P.B., 1992. Enhancement of mucosal antibody responses to *Salmonella typhimurium* and the microbial hapten phosphorylcholine in mice with X-linked

immunodeficiency by B-cell precursors from the peritoneal cavity. *Infect. Immun.* 60, 503-509.

Pockley, A.G., Montgomery, P.C., 1991. *In vivo* adjuvant effect of IL-5 and -6 on rat tear IgA antibody responses. *Immunology.* 73, 19-23.

Prasad, S.V., Wilkins, B., Dunbar, B.S., 1996. Molecular biology approaches to evaluate species variation in immunogenicity and antigenicity of zona pellucida proteins. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 50, 143-149.

Primakoff, P., 1994. Sperm proteins being studied for use in a contraceptive vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* 31, 208-210.

Primakoff, P., Myles, D.G., 1983. A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 98, 417-428.

Primakoff, P., Lathrop, W., Woolman, L., Cowan, A., Myles, D. G., 1988. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunised with the sperm protein PH-20. *Nature* (Lond.) 335, 543-546.

Quayle, A.J., Anderson, D.J., 1995. Induction of mucosal immunity in the genital tract and prospects for oral vaccines. In 'Medical Intelligence Unit. Birth Control Vaccine' (Eds G.P. Tawar, R. Raghupathy) p 149-165.

Ramsay, A.J., 1995. Vector-encoded interleukin-5 and IL-6 enhance specific mucosal immunoglobulin A reactivity *in vivo*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371, 35-42.

Ramsay, A.J., Kohonen-Corish, M., 1993. IL-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 23, 3141-3145.

Ramshaw, I.A., Ruby, J., Ramsay, A.J., Ada, G.L., Karupiah, G., 1992. Expression of cytokines by recombinant vaccinia viruses: a model for studying cytokines in virus infections *in vivo*. *Immunol. Rev.* 127, 157-182.

Raz, T., Skutelsky, E., Shalgi, R., 1996. Post fertilization changes in the zona pellucida glycoproteins of rat eggs. *Histochem. Cell. Biol.* 106, 395-403.

Raz, T., Ben-Yossef, D., Shalgi, R., 1998. Segregation of the pathways leading to cortical reaction and cell cycle activation in the rat egg. *Biol. Reprod.* 58, 94-102.

- Rudzki, K. 1995. Escaped rabbit calicivirus highlights Australia's chequered history of biological control. *Search*. 26, 287.
- Sacco, A.G., Yurewicz, E.C., Subramaniam, M.G., De Mayo, F.J., 1981. Zona pellucida composition: species cross reactivity and contraceptive potential of antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA). *Biol. Reprod.* 25, 997-1008.
- Sacco, A.G., Subramaniam, M.G., Yurewicz, E.C., De Mayo, F.J., Dukelow, W.R., 1983. Heteroimmunization of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) with a purified porcine zona antigen (PPZA): immune response and biologic activity of antiserum. *Fertil. Steril.* 39, 350-358.
- Sacco, A.G., Pierce, D.L., Subramaniam, M.G., Yurewicz, E.C., Dukelow, W.R., 1987. Ovaries remain functional in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) immunized with porcine zona pellucida 55,000 macromolecule. *Biol. Reprod.* 36, 481-490.
- Sacco, A.G., Yurewicz, E.C., Subramaniam, M.G., Matzat, P.D., 1989. Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with the alpha-glycoprotein component of the Mr=55,000 family. *Biol. Reprod.* 41, 523-532.
- Saling, P.M., Burks, D.J., Carballada, M.R., Dowds, C.A., Leyton, L., Mclesky, S.B., Robinson, A., Tomes, C.N., 1995. Sperm interaction with the zona pellucida: the role of ZRK. In 'Human Sperm Acrosome Reaction'. (Eds P. Fenichel et J. Parinaud) J.Libbley, Montrouge, France. p85-104.
- Schafer, E.W, Guarino, G.L., Brunton, R.B. 1977. Use of male coturnix quail in the laboratory development of avian chemosterilant. *American Society for Testing and Materials*. Philadelphia, Pennsylvania.
- SeGall, G.K., Lennarz, W.J., 1979. Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 71, 33-48.
- Sellens, M.H., Jenkinson, E.J., 1975. Permeability of the mouse zona pellucida to immunoglobulin. *J. Reprod. Fertil.* 42, 153-157.
- Shalaby, W.S.W., 1995. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74, 127-134.
- Shalgi, R., Maymon, R., Bar-Shira, B., Amihal, D., Skutelsky, E., 1991. Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 365-372.

Sharma, D.P., Ramsay, A.J., Maguire, D.J., Rolph, M.S., Ramshaw I.A., 1996. IL-4 mediates down regulation of antiviral cytokine expression and cytotoxic T-lymphocyte responses and exacerbates vaccinia virus infection *in vivo*. *J. Virol.* 70, 7103-7107.

Shivers, C.A., Dunbar, B.S., 1977. Autoantibodies to zona pellucida: a possible cause for infertility in women. *Science.* 197, 1082-1084.

Shivers, C.A., Dudkiewicz, A.B., Franklin, L.E., Fussel, E.N., 1972. Inhibition of sperm egg interaction by specific antibody. *Science.* 178, 1211-1213.

Schultz, R.M., 1986. Molecular Aspects of Mammalian Oocyte Growth and Maturation. *Cambridge University Press, Cambridge.* 5p.

Shur, B.D., Hall, N.G., 1982. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell. Biol.* 95, 574-579.

Skinner, S.M., Mills, T., Kirchick, H.J., Dunbar, B.S., 1984. Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology.* 115, 2418-2432.

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. Fertil.* 100, 35-41.

Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A., Dougherty, W.G., 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs- expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant. Cell.* 6, 1441-1453.

Somoguy, P., Frazier, J., Skinner, M.A., 1993. Fowlpox virus host range restriction : gene expression, DNA replication and morphogenesis in non permissive mammalian cells. *Virology.* 197, 439-444.

Spangler, B.D., 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56, 622-647.

Suman, K., Bamezai, A.K., Das, C., Talwar, G.P., 1986. Effect of immunization of primates against porcine zonae on fertility and hormone profiles. In: Talwar, G.P. (Ed.), *Immunological Approches to Contraception and Promotion of Fertility.* Plenum Press. New York. 291-299.

Taguchi, T., McGhee, J.R., Coffman, R.L., Beagley, K.W., Eldridge, J.H., Takatsu, K., Kiyono, H., 1990. Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4+ and CD8+ T cells that secrete IFN- γ and IL-5. *J. Immunol.* 145, 68-77.

Takashi, M., Yoshinaga, K., 1974. Active immunization of rats with luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology.* 94.

Talevi, R., Gualtieri, R., Tartaglione, G.,

- Volgesang, M.M., Kraemer, D.C., Potter, G.D., Stott, G.C., 1987. The structure of the follicular oocyte of the horse. *J. Reprod. Fertil.* 35, 157-167.
- Venables, D., 1995. Is PH-20 the sperm protein hyaluronidase? *Thesis*. Australian National University, Canberra.
- Videaus C.M., 1997. Human fertilin β : identification, characterization, and chromosomal mapping of an ADAM gene family member. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 363-369.
- Walker, R.J., 1994. Novel strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine.* 12, 387-400.
- Wang, W., Sun, Q., Hosoe, M., Shioya, Y., Day, B.N., 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol. Reprod.* 56, 1376-1382.
- Wassarman, P.M., Albertini, D.F., 1994. *The Mammalian Ovum*. Raven Press, New York.
- Wassarman, P.M., 1995. Profile of a mammalian sperm receptor. *Amer. J. Reprod. Immun.* 33, 253-258.
- Wassarman, P.M., Liu, C., Litscher, E.S., 1996. Concerning the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J. Cell. Sci.*
- Weskamp G., Blobel, C.P., 1994. A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91, 2744-2751.
- Widders, P.R., Stokes, C.R., David, J.S., Bourne, F.J., 1984. Quantification of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare. *Res. Vet.* 37, 324-330.
- Wira, C., Stern, J., 1992. Endocrine regulation of the mucosal immune system in the female reproductive tract: control of IgG, IgA and secretory component during the reproductive cycle, at implantation and throughout pregnancy. In 'Hormones and foetal pathophysiology' Marcel Decker. New York. p 343-368.
- Wolgemuth, D.J., Celenza, J., Bundmann, D.S., Dunbar, B.S., 1984. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev. Biol.* 106, 1-14.
- Wood, D.M., Liu, C., Dunbar, B.S., 1981. Effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on fertility in rabbits. *Biol. Reprod.* 25, 439-450.
- Woulfe, M.R., 1970. Reproduction inhibitors for bird control. *Proceedings of the Vertebrates Pest Conference.*
- Wu, T.C., Lee, M.C., Wan, Y.J., Damjanov, I., 1984. Lectin Binding sites of the mouse ovary, intraovarian and ovulated ova. *Histochemistry.* 80, 527-533.
- Yang, S.L., Schumacher, G.F., Broer, K.A., Holt, J.A., 1983. Specific antibodies and immunoglobulins in the oviductal fluid of the rhesus monkey. *Fertil. Steril.* 39, 359-369.

Yanagimachi R., 1994. Mammalian fertilization. In 'The Physiology of Reproduction' Raven Press. New York. 5, 189-317.

Yonezawa, N., Aoki, H., Hatanaka, Y., Nakano, M., 1995. Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. *Eur. J. Biochem.* 233, 35-41.

Yonezawa, N., Hatakana, Y., Takeyama, H., Nakano, M., 1995. Binding of pig sperm receptor in the zona pellucida to the boar sperm acrosome. *J. Reprod. Fertil.* 103, 1-8.

Yonezawa, N., Mitsui, S., Kudo, K., Nakano, M., 1997. Identification of an N-glycosylated region of pig zona pellucida glycoprotein ZPB that is involved in sperm binding. *Eur. J. Biochem.* 248, 86-92.

Yonezawa, N., Fukui, N., Nakano, M., 1999. Localization of neutral N-linked carbohydrates chains in pig zona pellucida glycoprotein ZPC. *Eur. J. Biochem.* 260, 57-63.

Yurewicz, E.C., Pack, B.A., Sacco, A.G., Gupta, S.K., Gage, D.A., 1998. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicle. *J. Biol. Chem.* 273, 7488-7494.