

Reçu le 6 juillet 1965.

**COMPARAISON DES SUBSTRATS DE LA COAGULATION  
DU SPERME ET DU SANG CHEZ LE COBAYE**

PAR

Jean-Marie MICHEL, Jacques SALMON et Charles JEUNIAUX  
(Institut Léon Fredericq, Biochimie, et Institut de Médecine, Département de Clinique  
et de Pathologie Médicales, Université de Liège)

---

(4 figures)

---

Depuis la fin du siècle dernier, divers auteurs ont montré que la coagulation du sperme des Mammifères, lorsqu'elle a lieu, se fait à partir d'un matériel protéique, le coagulinogène, sécrété par les vésicules séminales (BERGMANN et LEUCKART, 1855; BISCHOFF, 1852; HENSEN, 1876; STOCKARD et PAPANICOLAOU, 1919; LATASTE, 1888; MANN, 1954).

La transformation du sol protéique en un gel résulte de l'action d'un enzyme auquel CAMUS et GLEY donnèrent le nom de vésiculase (CAMUS et GLEY, 1896, 1899, 1907, 1921, 1922).

La vésiculase manque dans les vésicules séminales mais apparaît lors de l'éjaculation; chez les rongeurs, elle est sécrétée par les « glandes de la coagulation » adjacentes aux vésicules séminales (WALKER, 1910). Dans un travail plus récent, SPEYER (1959) suggère que la coagulation se fait en deux étapes: la vésiculase, sécrétée par les glandes de la coagulation, est, au moment de l'éjaculation, mise en présence d'un précurseur inactif, la procoagulase, sécrétée par les vésicules séminales. La vésiculase activerait la procoagulase en coagulase et celle-ci agirait alors sur le coagulinogène pour le transformer en un caillot de coaguline.

Ce mécanisme n'est pas sans présenter certaines analogies avec le phénomène de la coagulation du sang chez les Mammifères où une protéine soluble, le fibrinogène, est transformée en un caillot insoluble sous l'action d'un enzyme, la thrombine, lui-même activé par un autre enzyme, la thrombokinase.

De plus, certains auteurs ont montré l'existence de protéines communes au sperme et au plasma sanguin humain (ROSS *et al.*, 1942; HUGGINS *et al.*, 1942; GRAY et HUGGINS, 1942; HUGGINS

et NEAEL, 1942). D'après GRAY et HUGGINS (1942), l'étude électrophorétique du plasma séminal humain révèle l'existence de 4 fractions protéiques qui ont respectivement la même mobilité que la séralbumine, les  $\alpha$ , les  $\beta$  et les  $\gamma$  globulines du sérum sanguin; ils identifient ces 4 fractions du plasma séminal aux fractions correspondantes du sérum sanguin. GOLDBLATT (1935) a montré que le sperme renferme de la thrombokinasé.

Cependant, les résultats des travaux de GOTTERER et de ses collaborateurs (1955) montrent que chez le cobaye, la thrombine ne provoque pas la coagulation du sperme, et inversement que la vésiculase du sperme n'entraîne pas la coagulation du fibrinogène du sang. On ne peut donc dans l'état actuel des connaissances décider si le mécanisme de la coagulation du sperme et celui de la coagulation du sang se fait, chez une même espèce, aux dépens d'un même substrat protéique et au moyen d'un même système enzymatique, ce qui pourrait apparaître comme une radiation physiologique d'un même système biochimique.

Nous avons tenté d'apporter de nouveaux arguments expérimentaux à cette question en comparant les protéines qui servent de substrat à la coagulation du sperme et à la coagulation du sang chez une même espèce animale par la méthode de l'analyse immunoélectrophorétique.

### Matériel et Méthodes

Nous avons choisi le cobaye *Cavia procellus* L. comme matériel expérimental. Le sperme de cet animal se coagule après l'éjaculation et il est assez aisé de prélever le matériel coagulable des vésicules séminales (coagulinogène) avant l'éjaculation.

Nous prélevons le coagulinogène en appliquant une variante de la technique décrite par GOTTERER *et al.* (1955). Les animaux mâles adultes sont anesthésiés au nembutal; après laparotomie, les artères afférentes aux vésicules séminales sont soigneusement ligaturées et l'appareil vasculaire est vidé pour éviter toute contamination du produit à extraire par du sang. On perfuse alors les vésicules par 2 ml de tampon de BRITTON et ROBINSON (1947) 0.04 M ajusté à pH 5.3 en injectant le tampon à l'aide d'une seringue dans la portion moyenne de la vésicule. On

recueille le liquide de la vésicule et le centrifuge. Le surnatant est dialysé et précipité par l'acide trichloroacétique. Nous appelons ce précipité "matériel coagulable". Nous appellerons "matériel soluble" le surnatant obtenu de cette manière.

Pour obtenir la formation de l'anticorps, nous avons injecté à deux lapins blancs du plasma sanguin de cobaye. Nous avons fait la formation des anticorps par la méthode de GOTTERER 2 fois par de l'adjuvant complet. Nous avons sacrifié l'une des pattes du lapin 10 jours, à raison d'une fois par semaine, l'autre fois, à raison d'une fois par semaine. Nous avons sacrifié le lapin et nous avons précipité l'anticorps par l'acide trichloroacétique.

Au cours de nos recherches nous avons préparé un immunsérum anti-fibrinogène. Nous avons précipité cet immunsérum en présence de fibrinogène du plasma sanguin de cobaye par la méthode de GOTTERER. De façon à séparer les protéines séminales du plasma sanguin spécifique, le précipité est lavé par le sérum ainsi obtenu ne contenant pas d'anticorps. Le sérum ainsi obtenu ne contient pas d'anticorps avec le plasma de cobaye. L'analyse immunoélectrophorétique; l'antigène.

L'analyse immunoélectrophorétique est effectuée en appliquant la méthode de GOTTERER et WILLIAMS, la méthode de GOTTERER et SCHEIDEGGER (1955).

Avant de comparer la coagulation du sperme, nous avons précipité le matériel coagulable pendant à la réaction avec l'anticorps protéines lors de l'analyse immunoélectrophorétique.

#### 1) Localisation des protéines coagulinogène et au fibrinogène (analyse immunoélectrophorétique)

Pour déterminer la localisation des protéines de départ, nous avons précipité le matériel coagulable fraîchement prélevé

GINS (1942), l'étude  
ain révèle l'existence  
ectivement la même  
β et les γ globulines  
fractions du plasma  
du sérum sanguin.  
rme renferme de la

GOTTERER et de ses  
cobaye, la thrombine  
, et inversement que  
coagulation du fibrin  
t actuel des connais-  
sation du sperme et  
ez une même espèce,  
e et au moyen d'un  
it apparaît comme  
ystème biochimique.  
x arguments expéri-  
protéines qui servent  
à la coagulation du  
méthode de l'analyse

s L. comme matériel  
coagule après l'éja-  
matériel coagulable  
vant l'éjaculation.  
iquant une variante  
(1955). Les animaux  
; après laparotomie,  
s sont soigneusement  
é pour éviter toute  
du sang. On perfuse  
RITTON et ROBINSON  
le tampon à l'aide  
de la vésicule. On

recueille le liquide de perfusion par l'extrémité distale sectionnée. Nous appelons « plasma vésical » le liquide obtenu de cette manière.

Pour obtenir la formation des anticorps nécessaires à l'application de l'analyse immunoélectrophorétique, nous avons injecté à deux lapins respectivement du plasma vésical et du plasma sanguin de cobaye, citraté à 2 %. Pour faciliter la formation des anticorps, ces différentes solutions sont diluées 2 fois par de l'adjuvant complet de Freund (Difco). On injecte 2 ml. des solutions ainsi diluées dans l'espace interdigital de l'une des pattes du lapin. Ces injections sont répétées quatre fois, à raison d'une fois par semaine en utilisant chaque fois une patte différente. A la fin de la période d'immunisation, on sacrifie le lapin et on recueille son sérum sanguin qui renferme en solution les anticorps désirés.

Au cours de nos recherches, nous avons été amenés à employer un immunsérum antifibrinogène de cobaye. Nous avons préparé cet immunsérum en épuisant de l'immunsérum antiplasma sanguin de cobaye par du sérum sanguin de cobaye; de cette façon les protéines sériques sont précipitées par leur anticops spécifique, le précipité est éliminé par centrifugation. L'anti-sérum ainsi obtenu ne donne plus qu'une ligne de précipitation avec le plasma de cobaye soumis à l'analyse immunoélectrophorétique; l'antigène précipité correspond au fibrinogène.

L'analyse immunoélectrophorétique de notre matériel a été effectuée en appliquant une variante de la technique de GRABAR et WILLIAMS, la micro-immunoélectrophorèse décrite par SCHEIDEGGER (1955).

### Résultats

Avant de comparer le fibrinogène du sang et le coagulinogène du sperme, nous avons localisé l'arc de précipitation correspondant à la réaction antigène-anticorps spécifique de ces protéines lors de l'analyse immunoélectrophorétique.

1) *Localisation des arcs de précipitation correspondant au coagulinogène et au fibrogène de cobaye lors d'une analyse immunoélectrophorétique effectuée à pH 8.2.*

Pour déterminer la position de cet arc par rapport à la cuvette de départ, nous avons utilisé du plasma vésical de cobaye fraîchement prélevé. Nous avons provoqué la coagulation

d'une partie de ce plasma au moyen de vésiculase de cobaye. Nous avons écarté le caillot par centrifugation; le sérum sur-nageant contenait donc toutes les protéines du plasma vésical à l'exception du coagulinogène. Le sérum ainsi préparé et le plasma vésical ont été soumis à l'électrophorèse en gélose sur une même plaque. Après l'électrophorèse, nous avons incubé ces solutions de protéines en présence de sérum de lapin antiplasma vésical de cobaye. La figure 1 montre le diagramme immuno-électrophorétique obtenu.

On voit sur le cliché un arc très net entre « a » et « b » partant à peu près de la cuvette de départ et orienté vers la cathode. Cet arc a disparu entre « a » et « b ». Nous pouvons conclure que cet arc correspond au coagulinogène puisque celui-ci est présent en « a » et absent en « c ».

La localisation de l'arc de précipitation correspondant au fibrinogène de cobaye est basée sur le même principe.

On soumet du plasma et du sérum sanguin de cobaye à l'électrophorèse en gélose, après quoi on incube en présence d'immunsérum antiplasma sanguin de cobaye (fig. 2). Puisque le sérum est du plasma débarrassé du fibrinogène par la coagulation, l'arc de précipitation orienté vers la cathode, qui n'apparaît pas du côté de la cuvette chargée avec du sérum, est celui qui correspond à l'arc du fibrinogène observé du côté de la cuvette chargée avec du plasma.

## 2) Comparaison du fibrinogène et du coagulinogène par l'analyse immunoélectrophorétique.

Nous avons soumis du plasma sanguin et du plasma vésical de cobaye à l'analyse immunoélectrophorétique en réalisant la précipitation immuno-chimique à l'aide d'immunsérum antiplasma sanguin d'une part et d'immunsérum antiplasma vésical de cobaye d'autre part. Le diagramme immunoélectrophorétique obtenu est présenté dans la figure 3.

Abordant le problème d'une autre façon, nous avons soumis à l'électrophorèse, sur une même plaque, du plasma sanguin et du plasma vésical de cobaye; nous avons ensuite incubé ces solutions antigéniques en présence d'immunsérum anti-fibrinogène de cobaye. On trouvera le résultat de cet essai dans la figure 4.

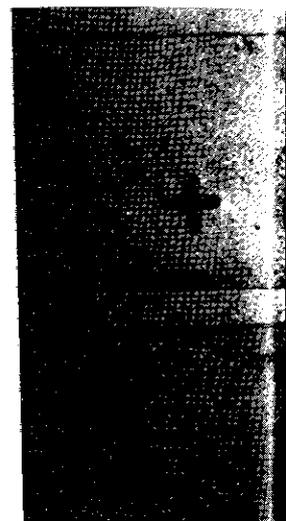


FIG. 1. — Détermination du coagulinogène de cobaye.

a = plasma vésical de cobaye  
b = immunsérum antiplasma vésical de cobaye  
c = sérum résultant de la coagulation du plasma vésical de cobaye

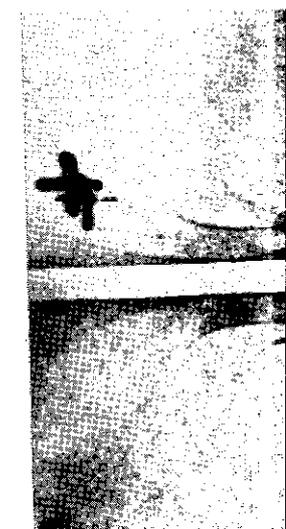


FIG. 2. — Localisation du fibrinogène de cobaye.

a = plasma sanguin de cobaye  
b = immunsérum antiplasma sanguin de cobaye  
c = sérum sanguin de cobaye

vésiculase de cobaye.  
 ation ; le sérum sur-  
 s du plasma vésical  
 ainsi préparé et le  
 thorse en gélose sur  
 nous avons incubé ces  
 de lapin antiplasma  
 diagramme immuno-

« a » et « b » partant  
 enté vers la cathode.  
 us pouvons conclure  
 puisque celui-ci est

n correspondant au  
 e principe.

n de cobaye à l'élec-  
 n présence d'immun-  
 ). Puisque le sérum  
 par la coagulation,  
 ode, qui n'apparaît  
 sérum, est celui qui  
 u côté de la cuvette

ogène par l'analyse

t du plasma vésical  
 étique en réalisant  
 l'immunsérum anti-  
 a antiplasma vésical  
 immunoélectrophoré-

nous avons soumis  
 du plasma sanguin  
 ons ensuite incubé  
 immunsérum anti-  
 sultat de cet essai

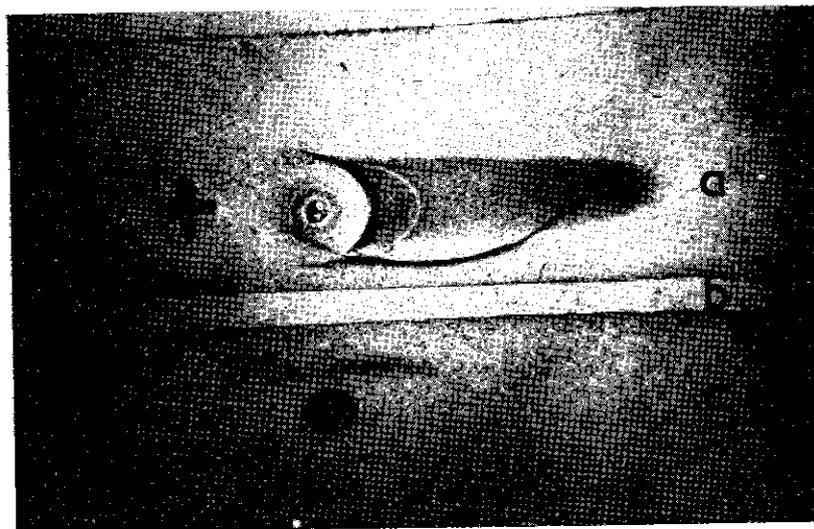


FIG. 1. — Détermination de l'arc de précipitation correspondant au coagulé de cobaye.

- a = plasma vésical de cobaye.
- b = immunsérum antiplasma vésical de cobaye.
- c = sérum résultant de la coagulation du plasma vésical de cobaye.

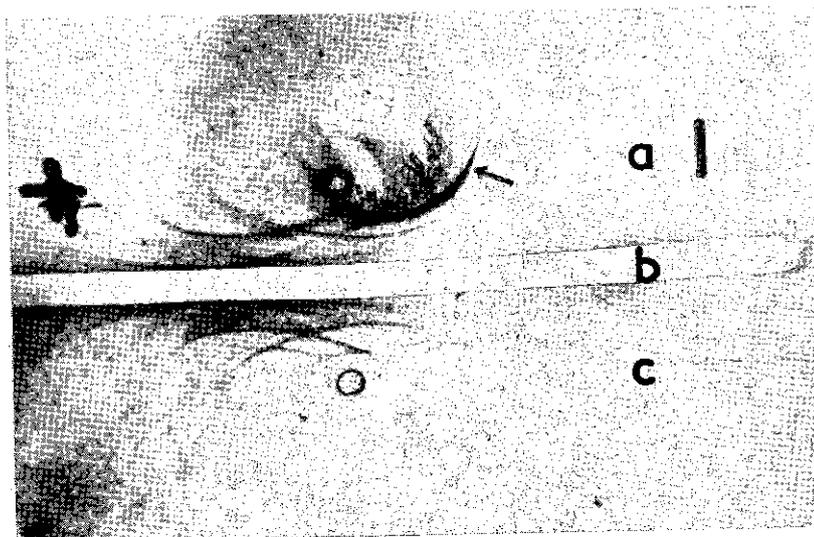


FIG. 2. — Localisation de l'arc de précipitation correspondant au fibrinogène de cobaye.

- a = plasma sanguin de cobaye.
- b = immunsérum antiplasma sanguin de cobaye.
- c = sérum sanguin de cobaye.

### Discussion

Nos résultats expérimentaux montrent que, comme le fibrinogène, le coagulinogène séminal du cobaye peut jouer le rôle d'antigène chez le lapin.

L'examen des figures 3 et 4 indique que, à pH 8,2, le coagulinogène et le fibrinogène de cobaye migrent tous deux vers la cathode, et que leurs mobilités sont voisines. Toutefois le fibrinogène est une protéine différente du coagulinogène. En effet, on voit (fig. 3) que l'arc de précipitation correspondant au coagulinogène qui apparaît très nettement entre « c » et « d » n'apparaît pas entre « c » et « b ». On voit de même que l'arc correspondant au fibrinogène entre « a » et « b » n'apparaît pas entre « c » et « b ». Si ces deux protéines étaient identiques, nous aurions obtenu une réaction de précipitation entre chacune de ces protéines et l'immunsérum renfermant l'anticorps spécifique de l'autre.

La figure 3 montre cependant qu'il existe au moins une protéine commune au plasma vésical et au plasma sanguin de

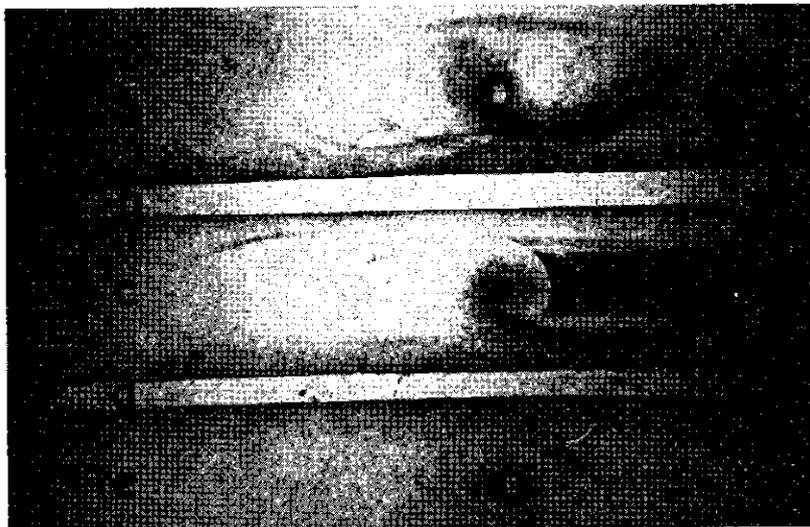


FIG. 3. — Comparaison du plasma sanguin et du plasma vésical de cobaye réalisée par immunoelectrophorèse à pH 8,2

- a = plasma sanguin de cobaye.
- b = immunsérum antiplasma sanguin de cobaye.
- c = plasma vésical de cobaye.
- d = immunsérum antiplasma vésical de cobaye.
- e = plasma sanguin de cobaye.

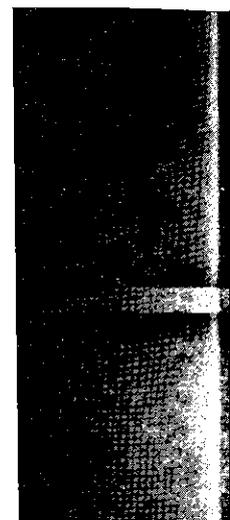


FIG. 4. — Comparaison du plasma vésical de cobaye et du plasma sanguin de cobaye par immunoelectrophorèse à pH 8,2

a = plasma vésical de cobaye ; l'arc de précipitation est situé dans la zone commune.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la figure 4. Ce plasma sanguin donne un arc de précipitation avec le complexe fibrinogène-anticorps de l'immunsérum antiplasma vésical, mais pas de précipitation avec l'immunsérum antiplasma sanguin, ce qui prouve

L'analyse immunoelectrophorétique du plasma sanguin de cobaye et du plasma vésical de cobaye montre que ces deux protéines ne sont certainement pas identiques. Le mécanisme de la précipitation se fait à partir du plasma sanguin de cobaye, ce qui prouve

ue, comme le fibrino-  
e peut jouer le rôle

e, à pH 8.2, le coa-  
grent tous deux vers  
voisines. Toutefois le  
u coagulinogène. En  
tation correspondant  
ent entre « c » et « d »  
de même que l'arc  
« b » n'apparaît pas  
étaient identiques,  
tation entre chacune  
ant l'anticorps spé-

e au moins une pro-  
plasma sanguin de



plasma vésical de cobaye

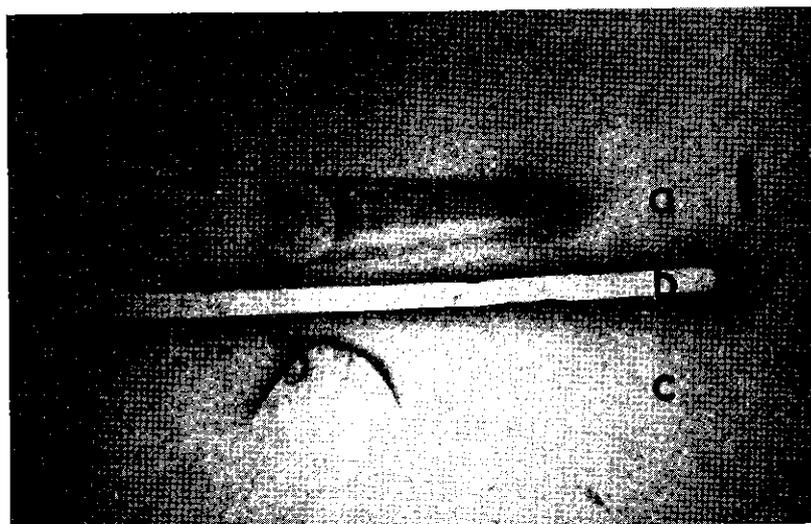


FIG. 4. — Comparaison entre fibrinogène et coagulinogène de cobaye réalisée par immunoelectrophorèse à pH 8.2.

*a* = plasma vésical de cobaye.  
*b* = immunosérum antifibrinogène de cobaye.  
*c* = plasma sanguin de cobaye.

cobaye ; l'arc de précipitation correspondant à cette protéine est situé dans la zone des globulines.

Ces résultats sont confirmés par le diagramme repris dans la figure 4. Ce cliché montre clairement que seul le plasma sanguin donne un arc de précipitation, qui correspond au complexe fibrinogène — anticorps — anti-fibrinogène, en présence de l'immunosérum correspondant. Le plasma vésical ne donne lieu à aucune ligne de précipitation avec le même immunosérum, ce qui prouve bien qu'il ne renferme pas de fibrinogène.

### Conclusions

L'analyse immunoelectrophorétique du coagulinogène de cobaye et du fibrinogène du même animal montre que ces deux protéines diffèrent par leurs caractères immunochimiques. Ces deux protéines ne possédant pas de parenté immunochimique, ne sont certainement pas identiques ; on peut donc conclure que le mécanisme de la coagulation du sperme chez les Rongeurs se fait à partir d'un substrat protéique différent de celui de la coagulation du sang.

## BIBLIOGRAPHIE

- BERGMANN, C. et LEUCKART, R. (1855). — *Anatomisch-physiologische übersicht des Tierreichs*. Stuttgart, Müller; p. 567.
- BISCHOFF, T. L. W. (1852). — *Entwicklungsgeschichte des Meerschweinchens*. Giessen, Ricker, p. 12.
- BRITTON et ROBINSON (1947). — in LOISELEUR, *Techniques de Laboratoires*. Masson et Cie, éd., Paris, p. 17.
- CAMUS, L. et GLEY, E. (1896). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **48**, 787.
- CAMUS, L. et GLEY, E. (1897). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **49**, 787.
- CAMUS, L. et GLEY, E. (1899). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **51**, 624, 726.
- CAMUS, L. et GLEY, E. (1907). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **63**, 204.
- CAMUS, L. et GLEY, E. (1921). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **84**, 250.
- CAMUS, L. et GLEY, E. (1922). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **87**, 207.
- GOLDBLATT, M. W. (1935). — *Biochem. J.*, **29**, 1346.
- GOTTERER, G., GINSBERG, D., SCHULMAN, T., BANKS, J., et WILLIAMS-ASHMAN, H. G. (1955). — *Nature*, **176**, 1209.
- GRAY, S. et HUGGINS, C. (1942). — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **50**, 351.
- HENSEN, V. (1876). — *Z. Anat. Entwicklungsgesch.*, **1**, 213.
- HUGGINS, C. et NEABL, W. (1942). — *J. Exp. Med.*, **72**, 747.
- HUGGINS, C., SCOTT, W. W. et HEINEN, J. H. (1942). — *Am. J. Physiol.*, **136**, 467.
- LATASTE, F. (1888). — *C. R. Soc. Biol., Paris*, **40**, 817.
- MANN, Th. (1954). — *The Biochemistry of Semen*. Methuen, London.
- ROSS, V., MOORE, D. H. et MILLER, E. G. jr. (1942). — *J. Biol. Chem.*, **144**, 667.
- STOCKARD, C. R. et PAPANICOLAOU, G. N. (1919). — *Biol. Bull. Woods Hole*, **37**, 222.
- SCHEIDEGGER, J. J. (1955). — *Int. Arch. Allergy*, **7**, 103.
- SPEYERS, J. (1959). — *Fed. Proc.*, **18**, 150.
- WALKER, G. (1910). — *Bull. John Hopkins Hosp.*, **21**, 182.

## 4,800 cu PHYSIO

### Chapter Headings :

1. GENERAL
2. DIGESTION
3. RESPIRATION
4. CIRCULATION
5. BODY FLUIDS
6. METABOLISM
7. THERMOREGULATION
8. EXCRETION
9. MICTURITION
10. NERVOUS SYSTEM
11. ORGANS OF MOVEMENT

Write for full information  
A monthly abstract

## Excerpt

119-123 Herengracht  
New York Academy of Sciences  
New York, N. Y. 10011  
67 New Bond Street