

Interaction des gamètes et protéines de reconnaissance

Catherine Finaz
Carmen Martin Ruiz
Annick Lefèvre

La fécondation met en jeu, entre les gamètes mâles et femelles des mammifères, des mécanismes d'adhérence et d'activation comparables à ceux décrits dans le développement embryonnaire et métastatique, le système immunitaire et l'infection virale. La première étape, la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide qui protège l'ovocyte, met en jeu des interactions avec les oligosaccharides portés par les protéines de la zone pellucide; c'est à ce stade qu'interviennent les barrières d'espèce qui interdisent les fécondations croisées. Cette liaison active les spermatozoïdes en déclenchant la réaction acrosomiale qui permet la libération des enzymes protéolytiques nécessaires à la dispersion de la zone pellucide et à sa traversée. L'attachement du spermatozoïde à la membrane plasmique de l'ovocyte semble dépendre de la reconnaissance de séquences peptidiques et aboutit à l'activation de l'ovocyte et à la reprise de sa méiose. La reconnaissance de molécules complémentaires semble engendrer à chacune de ces deux étapes la stimulation de voies de transmission responsables de l'activation de l'un et l'autre gamètes.

La fécondation est un phénomène complexe qui, chez les organismes à reproduction sexuée, met en jeu une série d'interactions entre les deux gamètes haploïdes mâle et femelle. Elle aboutit à la fusion de leur matériel génétique et à la formation d'un nouvel individu diploïde.

Les gamètes et leur rencontre

L'ovocyte ovulé n'a pas achevé sa méiose, il est bloqué au stade de

métaphase II. C'est alors une grosse cellule immobile protégée par deux enveloppes, le *cumulus oophorus* et la zone pellucide (*figure 1*). Chez l'homme, le *cumulus* est composé de 3 000 cellules environ, originaires de la *granulosa* folliculaire; elles sont liées par une importante matrice intercellulaire, très riche en acide hyaluronique, qu'elles ont elles-mêmes sécrétée. La zone pellucide est, quant à elle, le produit de l'ovocyte. Elle est constituée, chez la souris et l'homme, de trois glycoprotéines plus ou moins sulfatées qui

ADRESSES

C. Finaz: directeur de recherche au Cnrs.
C. Martin Ruiz: docteur d'université.
A. Lefèvre: chargée de recherche à l'Inserm.
Inserm U. 355, Maturation gamétique et fécondation et Institut fédératif de recherche sur les cytokines, Université Paris-Sud, 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France.

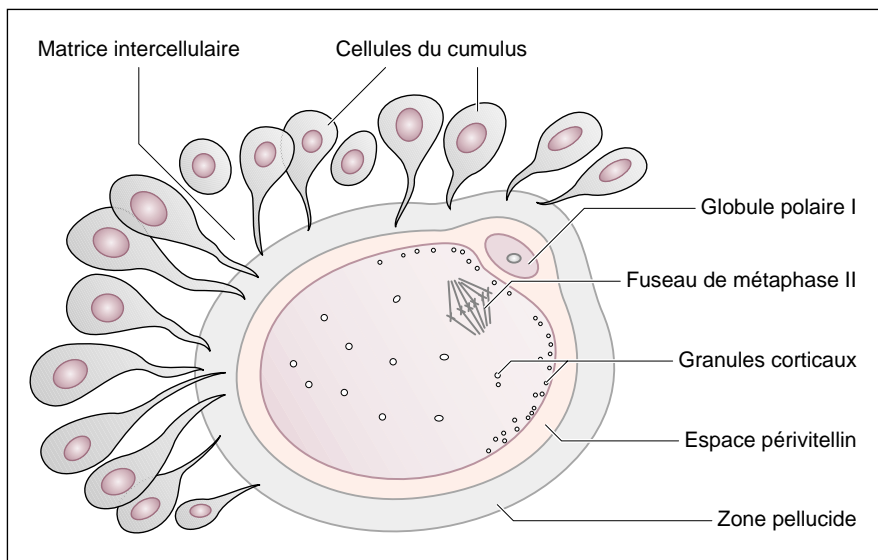


Figure 1. Ovocyte humain mûr. Le premier globule polaire a été expulsé et la méiose est bloquée au stade métaphase de sa deuxième division. L'ovocyte est entouré de ses deux enveloppes protectrices: le cumulus oophorus (seule la couche cellulaire interne, la corona radiata, est figurée ici) et la zone pellucide que le spermatozoïde va devoir franchir. La fusion du premier spermatozoïde avec la membrane plasmique de l'ovocyte entraîne la libération du contenu des granules corticaux sous la zone pellucide et empêche sa traversée par d'autres spermatozoïdes. (D'après [45].)

forment un réseau: la ZP1 établit des ponts disulfures avec les filaments composés de la répétition d'hétérodimères ZP2/ZP3.

Le spermatozoïde est une cellule extrêmement spécialisée dont la fonction consiste essentiellement à livrer le contenu de son génome haploïde à l'ovocyte tout en induisant la reprise de sa méiose. Une fois sa propre méiose terminée, le gamète mâle subit une série de transformations physiques et biochimiques qui vont en faire une petite cellule très mobile capable de se frayer un chemin jusqu'à l'ovocyte [1]. Les dernières transformations physiques, compactage du matériel nucléaire qui le rendent théoriquement inapte à toute activité transcriptionnelle, élimination de la plus grande partie du cytoplasme et acquisition de son flagelle, ont lieu dans le testicule. Sa maturation proprement dite, qui fait appel à des acquisitions et à des modifications de protéines et de constituants lipidiques, prend place essentiellement durant son transit dans l'épididyme. Plusieurs observations viennent de remettre en cause cette notion de génome quiescent: il s'agit de la présence simulta-

née dans le noyau des spermatozoïdes mûrs de transcrits spécifiques de la phase haploïde (protamines, PRM1 et 2, et protéine de transition, TNP2) et d'une activité polymérase, de l'association à la matrice nucléaire et de l'augmentation de la sensibilité à la DNase I des gènes correspondants [2]. La constitution de la tête du spermatozoïde est particulièrement complexe et joue un rôle important dans la fécondation. La partie antérieure porte sous la membrane plasmique un capuchon, l'acrosome, qui recouvre le noyau et contient des enzymes protéolytiques (figure 2).

Une fois le tractus génital femelle traversé, les spermatozoïdes ont acquis la compétence physiologique à franchir les dernières étapes qui les séparent de l'ovocyte: on dit qu'ils sont «capacités». Le processus de la capacitation est encore mal connu, mais on sait qu'elle coïncide avec des remaniements de la membrane: modification du contenu lipidique, diminution des charges négatives, perte de groupements carbohydrates et probablement démasquage d'antigènes de surface impliqués dans la reconnaissance des gamètes. Les

spermatozoïdes, dits fléchants en raison de leur aptitude à se déplacer rapidement, arrivent d'abord au contact du cumulus qu'ils dispersent puis traversent. Ils se heurtent alors à la deuxième barrière, la zone pellucide (figure 3). Ceux dont la membrane plasmique est intacte se lient à la ZP3: on parle de liaison primaire qui provoque la rupture de la membrane plasmique et de la membrane externe de l'acrosome et aboutit à la libération du contenu acrosomial (figure 2). C'est la réaction acrosomiale qui déclenche la dissociation de la trame de la zone pellucide. Une autre liaison, dite secondaire, intervient alors pour maintenir le spermatozoïde tout en lui permettant de continuer sa progression; elle fait probablement intervenir la ZP2 et des récepteurs spermariques situés sur la membrane interne de l'acrosome. Une fois la zone pellucide traversée, le spermatozoïde n'a plus qu'à reconnaître la membrane plasmique de l'ovocyte pour pouvoir fusionner avec elle.

Comme dans bien d'autres systèmes d'interactions cellulaires, chacune de ces deux étapes de reconnaissance, de la zone pellucide et de la membrane de l'ovocyte, a probablement un but double: tout en assurant le contact entre les deux cellules, elle engendre l'activation de l'une ou de l'autre. La liaison à la zone pellucide provoque l'agrégation de récepteurs du spermatozoïde qui entraîne un mouvement de calcium et le déclenchement de la réaction acrosomiale. En revanche, la deuxième étape aboutit à l'activation de l'ovocyte et est à l'origine de la reprise de sa méiose; on observe aussi un flux entrant de calcium, cette fois dans l'ovocyte. C'est donc ce dernier qui porte le ou les récepteurs, le spermatozoïde fournissant le ou les ligands. On dispose déjà de nombreuses informations sur les molécules impliquées dans la reconnaissance de la zone pellucide en raison, sans doute, de sa constitution relativement simple. La liaison à la membrane de l'ovocyte est plus difficile à cerner et l'on connaît peu de choses sur les protéines ovocytaires impliquées dans ce processus. La localisation de chaque protéine sur le spermatozoïde suggère le niveau de son implication: (1) liaison primaire ou secon-

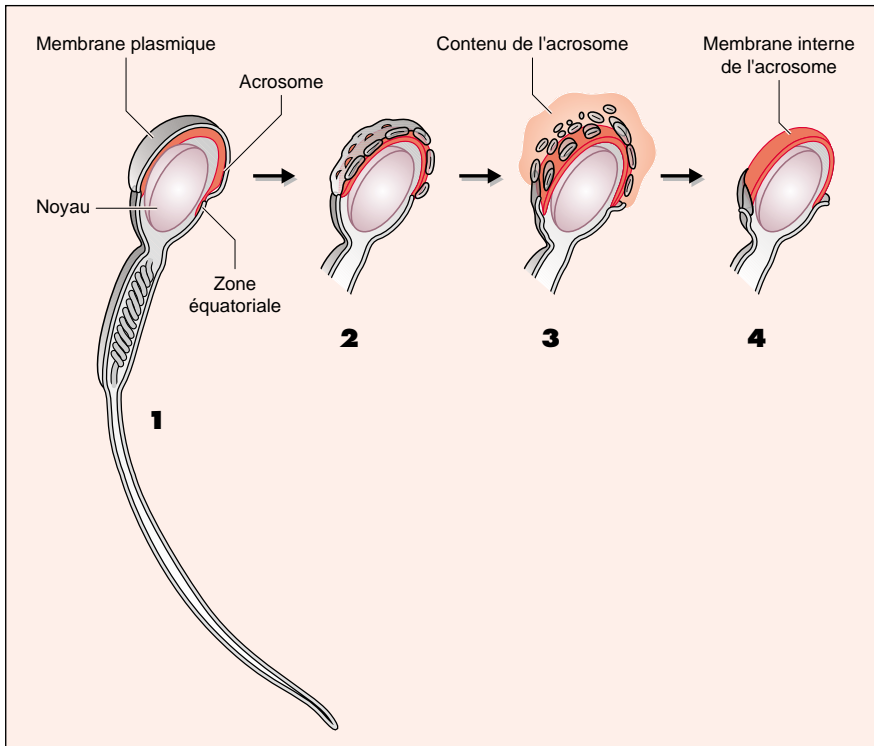


Figure 2. **Spermatozoïde humain et réaction acrosomiale.** (1) Le spermatozoïde est formé d'une tête qui contient le noyau et d'un flagelle qui lui confère sa mobilité. La composition membranaire de la tête est complexe : elle comporte sous la membrane plasmique une sorte de capuchon, l'acrosome, qui contient les enzymes indispensables à la traversée de la zone pellucide de l'ovocyte. (2) Début de la réaction acrosomiale : la membrane plasmique commence à fusionner avec la membrane acrosomiale externe. (3) Les deux membranes fusionnées se fractionnent et libèrent le contenu de l'acrosome. (4) La réaction acrosomiale est terminée et la membrane interne de l'acrosome est accessible. (D'après [46].)

daire à la zone pellucide selon qu'elle est portée par la membrane plasmique qui recouvre l'acrosome ou par la membrane interne de l'acrosome, (2) liaison à la membrane de l'ovocyte si elle est présente à la surface des régions équatoriales et sous-équatoriales puisqu'il a été montré que le spermatozoïde fusionne en position tangentielle avec la membrane ovocytaire [3] (figure 3). Certaines protéines sont même susceptibles de migrer d'un compartiment à l'autre et d'exercer des activités distinctes : c'est le cas de la PH-20 qui sera évoqué plus loin [4].

Le processus de l'interaction gamétique présente de légères différences d'une espèce à l'autre qui rendent les généralisations difficiles ; les plus marquantes concernent la constitution de la zone pellucide et la réaction acrosomiale. Le profil des grou-

pements glycosylés de la zone pellucide est propre à chaque espèce et le nombre de glycoprotéines qui la constituent peut varier de deux à quatre, cette diversité faisant probablement obstacle aux fécondations croisées. Pour la plupart des espèces, dont l'homme, la réaction acrosomiale du spermatozoïde est consécutive à la liaison primaire à la zone pellucide. Chez le porc et le lapin, elle commence dès la traversée du cumulus et des molécules contenues dans l'acrosome sont susceptibles de participer à la liaison primaire à la zone pellucide. Chez la plupart des mammifères, un grand nombre de spermatozoïdes se lie à la zone pellucide, tandis que très peu – voire rarement plus d'un chez l'homme – atteignent l'espace périvitellin. Chez le lapin, plusieurs spermatozoïdes traversent la zone pellucide et sont confrontés à la membrane ovocy-

taire. Les observations concernent de grandes populations de spermatozoïdes et l'on connaît mal le profil du « gagnant » qui parvient à féconder l'ovocyte.

Traversée du cumulus

Il ne s'agit pas à proprement parler d'un processus de reconnaissance. Une protéine spermatique, acquise dès le testicule et décrite originellement chez le cobaye, joue un rôle dans cette traversée. Avant la réaction acrosomiale la PH-20, d'un poids moléculaire de 64 kDa, est majoritairement ancrée à la surface de la région postacrosomiale par un groupement glycosyl-phosphatidylinositol. Elle présente de fortes analogies avec la hyaluronidase de venin d'abeille et n'exprime à ce stade que son activité enzymatique qui permet au spermatozoïde de traverser la matrice du cumulus [5]. C'est après la réaction acrosomiale que la PH-20 exerce sa deuxième fonction, de liaison.

Liaison primaire à la zone pellucide, déclenchement de la réaction acrosomiale

Les premières études réalisées ont concerné la ZP3 de souris qui est maintenant bien caractérisée. Elle porte de nombreuses chaînes latérales d'hydrates de carbone qui semblent responsables de l'interaction avec le spermatozoïde. Une étude cinétique récente met en évidence l'existence de 30 000 sites de liaison à la ZP3 par spermatozoïde de souris [6]. La liaison à ZP3 est un événement complexe faisant intervenir des récepteurs spermatiques à forte et faible affinité avec des K_d respectifs de 0,72 et 50 nM. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs protéines du spermatozoïde soient candidates au rôle de récepteurs pour la liaison primaire à la zone pellucide ; les mécanismes d'action de trois d'entre elles sont relativement bien définis.

Un anticorps anti-phosphotyrosine a permis de mettre en évidence à la surface de la région acrosomiale du spermatozoïde de souris une protéine de 95 kDa, la ZRK (*zona receptor kinase*), qui serait un récepteur possédant une activité tyrosine-kinase

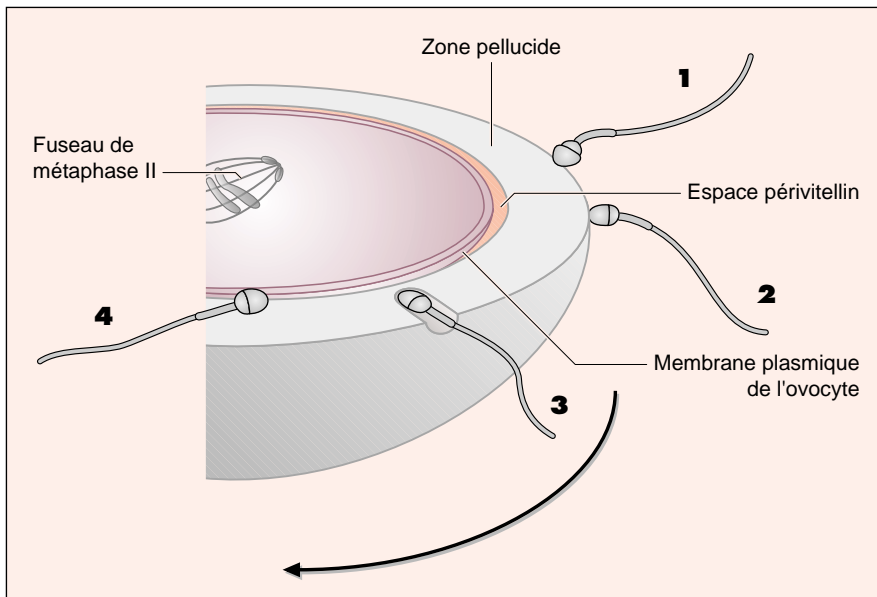


Figure 3. **Interaction du spermatozoïde et de l'ovocyte humains.** (1) Le spermatozoïde dont l'acrosome est intact se lie à la zone pellucide. C'est la liaison primaire qui déclenche la réaction acrosomiale (2). (3) Une fois le contenu de son acrosome libéré, le spermatozoïde traverse la zone pellucide. (4) Il atteint l'espace périvitellin et se lie de manière tangentielle, par sa zone équatoriale, à la membrane plasmique de l'ovocyte avant de fusionner avec elle. (D'après [46].)

intrinsèque [7]. Sa liaison à la ZP3 provoque l'agrégation de ses sites et son autophosphorylation, qui est inhibée aussi bien par les anticorps anti-protéine-kinase (PK) que par les inhibiteurs spécifiques des tyrosine-kinases qui bloquent alors la réaction acrosomiale. Les gènes humains et murins ont été clonés mais ces résultats ont engendré des controverses en raison de trop grandes analogies de séquence nucléotidique avec le proto-oncogène *c-Mer* [8]. Autre fait troublant, les ligands des récepteurs à activité tyrosine-kinase sont habituellement des protéines alors que, dans le cas présent, on admet que ce sont les chaînes oligosaccharidiques de la ZP3 qui jouent ce rôle.

La β -1,4-galactosyltransférase (GalTase) a été localisée précisément sur la membrane plasmique qui recouvre l'acrosome du spermatozoïde de souris. Cette enzyme a été mise en évidence sur la surface et à l'intérieur de nombreux types cellulaires. Sa fonction habituelle consiste à catalyser le transfert de galactose depuis l'UDP (uridine-diphosphate) jusqu'aux résidus amino-acétylglucosamines des glycoprotéines et des glycolipides. En tant que protéine

d'adhérence, elle peut également reconnaître des groupements glycoconjugués situés à la surface des cellules et de la matrice extra-cellulaire. L'équipe de B. Shur a montré que, dans une première étape, la GalTase du spermatozoïde de souris se lie à la manière d'une lectine aux groupements amino-acétylglucosamines terminaux de la ZP3 [9]. Cette liaison provoque une agrégation des molécules de GalTase à la surface du gamète mâle et l'activation d'une protéine G. L'agrégation obtenue par le simple ajout d'anticorps anti-GalTase aboutit au même résultat, tandis que la toxine pertussique inhibe le système. L'action provient en fait de l'association du domaine cytoplasmique de la GalTase avec une sous unité $G_{i\alpha}$, la sous-unité G_o étant indétectable sur le spermatozoïde. Lorsque le nombre de molécules disponibles est augmenté sur les spermatozoïdes de souris transgéniques surexprimant la GalTase, on observe une intensification simultanée de l'activité de la protéine G [10]. La liaison spermatozoïde-ZP3 peut être inhibée aussi bien par l'ajout d'UDP-galactose ou d'un excès de GalTase que par la suppres-

sion des groupements amino-acétylglucosamines de la ZP3. Une fois fécondé, l'ovocyte libère ses granules corticaux dont le contenu enzymatique coupe ces résidus amino-acétylglucosamines, rendant la ZP3 incapable de lier de nouveaux spermatozoïdes et faisant ainsi obstacle à la polyspermie.

Les protéines G sont censées s'associer à des récepteurs contenant sept domaines transmembranaires, ce qui n'est pas le cas de la GalTase. L'EGF (*epidermal growth factor*) représente une autre exception à cette règle puisque son couplage à la sous-unité G_i suivi de l'activation de la phospholipase γ (PLC γ) a été décrit à deux reprises dans des hépatocytes [11]. Chez l'homme, on ne détecte pas de GalTase sur la surface du spermatozoïde, ce qui rend improbable son rôle de ligand de la zone pellucide. En fait, le ou les récepteurs humains sont vraisemblablement différents, les chaînes latérales de carbohydrates étant modifiées dans la zone pellucide humaine; dans ce contexte, la mannosidase pourrait jouer le rôle de la GalTase [12].

L'intervention probable d'une autre protéine localisée sur la membrane plasmique qui recouvre l'acrosome, la sp56, a été mise en évidence chez la souris par pontage et chromatographie d'affinité avec la ZP3. Elle reconnaît des résidus galactose liés à la ZP3 et il s'agit, cette fois, d'une liaison simple de type lectine. Les gènes correspondants ont été clonés chez la souris et le lapin et leurs séquences montrent des analogies avec une famille de récepteurs, précisément avec la sous-unité α de la protéine 4B qui lie le complément [13]. Comme la GalTase, la sp56 participerait à la spécificité de la liaison spermatozoïde-zone pellucide. En effet, on la détecte à la fois chez la souris et le hamster qui acceptent une réaction croisée *in vitro*, tandis qu'elle est absente chez le cobaye et l'homme dont les spermatozoïdes sont incapables de se lier aux zones pellucides de souris.

Une quatrième protéine, la FA-1, a été mise en évidence par le groupe de Naz sur la surface du spermatozoïde humain [14]. Elle porte des résidus phosphotyrosine capables de s'autophosphoryler et d'inhiber par compétition la liaison *in vitro* de spermatozoïdes à la zone pellucide humaine.

D'autres protéines, probablement impliquées elles aussi dans la liaison primaire à la zone pellucide, sont en cours de caractérisation. La protéine Sp17 décrite chez le lapin semble bien participer à cette étape; sa séquence montre des similitudes intéressantes avec une protéine-kinase dépendante de l'AMPc [15]. Le fait que la protéine ne soit accessible à son anticorps qu'après la réaction acrosomiale ne devrait pas être un obstacle, les spermatozoïdes de lapin commençant leur réaction acrosomiale pendant la traversée du cumulus.

La protéine P26h a été identifiée chez le hamster grâce à son affinité pour la zone pellucide. Elle est d'origine épидидymaire, se fixe à la surface de la région acrosomiale du spermatozoïde et, une fois injectée à des mâles fertiles, provoque une immunisation contraceptive sans effet secondaire [16]. L'anticorps anti-P26h reconnaît chez l'homme une protéine, la P34H, qui est impliquée dans la liaison à la zone pellucide *in vitro* et semble indispensable à une fertilité normale [17].

Enfin, les spermathésines de porc forment une famille de protéines de type lectine qui sont sécrétées par les glandes accessoires et s'attachent à la surface de la région acrosomiale des spermatozoïdes lors de l'éjaculation. L'une d'elles, qui est capable d'inhiber la liaison spermatozoïde-zone pellucide de manière dépendante de sa concentration, montre une affinité particulière pour les oligosaccharides O liés de la ZP3 [18].

En résumé, trois des protéines décrites semblent être des récepteurs liés à l'activation d'une voie de transmission. Ces récepteurs sont de deux types: récepteur couplé à une protéine G et récepteur à activité tyrosine-kinase. Si l'on fait l'analogie avec les cellules somatiques, la GalTase module probablement une PLC de type β tandis que la ZRK et la FA-1 activeraient directement l'isoforme γ . Dans un cas comme dans l'autre, leur liaison à la ZP3 permet la transformation du phosphatidyl inositol en inositol trisphosphate (IP3) et diacylglycérol, et la cascade des événements engendrés aboutit à l'exocytose du contenu acrosomial. Ces résultats sont en accord avec les observations directes faites sur la

réaction acrosomiale [19]. D'autres travaux ont mis en évidence, dans les spermatozoïdes, l'activation des canaux calciques dépendants du potentiel par la zone pellucide [20] et de l'adénylyl-cyclase par la ZP3 [21]. Dans ces deux cas les effecteurs spermatiques ne sont pas connus. A l'origine de la réaction acrosomiale, on décèle donc l'intervention de plusieurs voies de transmission qui convergent vers l'activation des protéine-kinases A et C.

Liaison secondaire à la zone pellucide

La proacrosine semble jouer un rôle déterminant dans cette étape. Elle a été particulièrement étudiée chez le lapin et le porc, mais les gènes correspondants ont été clonés chez l'homme, la souris et le rat. La proacrosine est le précurseur inactif ou zymogène de l'acrosine qui appartient à la superfamille des sérine-protéases. Contenue dans l'acrosome, elle est accessible une fois la réaction acrosomiale effectuée. Chez le porc, on a montré que la proacrosine, détectable sous deux formes de 55 et 53 kDa, donne naissance aux acrosines α et β de masses molaires 49 et 36 kDa [22] qui, seules, expriment l'activité enzymatique. En revanche, la pro-acrosine serait impliquée dans une liaison de type électrostatique aux groupements sulfatés de la zone pellucide qui sont, chez l'homme et les rongeurs, portés essentiellement par la ZP2. Cette liaison est comparable à celle de la bindine des spermatozoïdes d'oursin au moment de leur interaction avec la gelée ovocytaire et l'enveloppe vitelline. Cet exemple est le témoignage d'une évolution très conservatrice. En résumé, l'interaction de la pro-acrosine avec la zone pellucide chez les mammifères aurait un double but: dans un premier temps, la liaison de l'enzyme à son substrat, puis la conversion de la pro-acrosine en acrosine active. Ce système pourrait rendre compte de la double fonction du spermatozoïde qui doit tout à tour s'attacher à la trame de la zone pellucide, la digérer, se détacher pour progresser, s'attacher de nouveau...

Les résultats d'une expérience récente viennent ébranler cet édifice.

En effet, les spermatozoïdes de souris porteuses d'un gène de proacrosine/acrosine muté sont capables de traverser la zone pellucide en dépit d'une absence totale d'activité protéase et on n'observe pas, à terme, de perturbation de leur fertilité [23]. La pénétration et la fécondation des ovocytes accusent tout de même un retard de 30 minutes en fécondation *in vitro*...

Chez le cobaye, bien qu'on n'en ait pas encore de preuve directe, la protéine PH-20 qui exerce une activité hyaluronidase pour traverser le cumulus pourrait être le récepteur de ZP2. Au moment de la réaction acrosomiale, elle est lysée en deux polypeptides de 41 et 27 kDa qui restent liés par des ponts disulfures [5]. Ils migrent alors vers la membrane interne de l'acrosome, rejoignant un lot de peptides de PH-20 préexistants. A ce moment, la protéine exprime sa capacité de lier la zone pellucide qui est distincte de son activité enzymatique. Les deux sites actifs sont situés de part et d'autre du site de clivage supposé être à l'origine de l'activation de la fonction de liaison. Cette protéine semble jouer un rôle analogue chez le macaque et les gènes correspondants ont été clonés chez le lapin, le rat, le macaque et l'homme.

Une autre protéine localisée elle aussi dans l'acrosome et identifiée chez l'homme, la souris, le singe et le porc, la SP-10, pourrait intervenir dans la liaison secondaire [24]. Cette hypothèse vient d'être confirmée par des résultats obtenus *in vitro* chez les bovins, alors que la protéine avait été initialement tenue pour responsable de la liaison à l'ovocyte [25].

Liaison à la membrane de l'ovocyte et fusion

La protéine PH-30, rebaptisée récemment fertiline, pourrait jouer un rôle déterminant dans la reconnaissance de l'ovocyte. D'origine testiculaire, elle a été mise en évidence chez le cobaye grâce à l'effet inhibiteur de l'anticorps anti-fertiline sur la liaison spermatozoïde-ovocyte *in vitro*. C'est un dimère dont les gènes ont été clonés d'abord chez le cobaye puis chez la souris, le macaque et l'homme [26, 27]. La sous-unité β appartient à une famille de protéines riches en cys-

téine qui contiennent un domaine désintégrine, les métalloprotéases. Ce domaine désintégrine, que l'on retrouve dans certaines protéines de venin de serpent, entre en compétition avec les intégrines des plaquettes pour leur liaison au fibrinogène et inhibe leur agrégation. La fertiline ne porte pas le motif de liaison RGD (Arg-Gly-Asp) classique observé dans 50 % des molécules de liaison des intégrines, mais un motif TDE (Thr-Asp-Glu).

Parallèlement, des travaux menés par les groupes de Bronson et de Fusi (Milan, Italie) ont mis en évidence à la surface des ovocytes de plusieurs mammifères, dont l'homme, des récepteurs de type intégrine capables de se lier à la fibronectine et ont montré que l'ajout d'oligopeptides contenant le motif RGD inhibe la liaison spermatozoïde-ovocyte [28]. En outre, des arguments indirects suggèrent que la sous-unité β de la fertiline se lierait à une intégrine de type $\alpha_6\beta_1$ portée par l'ovocyte [29].

On a observé, en contrepoint, la présence sur le spermatozoïde humain de fibronectine et de vitronectine : toutes deux contiennent le motif RGD et sont des ligands habituels des intégrines dans la lame basale [30, 31]. La démonstration récente de la présence simultanée d'intégrines β sur le spermatozoïde humain éjaculé ainsi que l'établissement d'une corrélation positive entre leur expression et l'aptitude à féconder rendent la situation bien plus complexe qu'on ne l'avait imaginée au départ [32]. Ces résultats soulignent l'importance du rôle du système intégrine dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte sans oublier que ces molécules interviennent probablement aussi au cours de la spermatogénèse et de la nidation de l'œuf.

On a déjà observé dans d'autres systèmes de reconnaissance que l'adhérence de la cellule à des composés de la matrice extracellulaire entraîne l'apparition de signaux de transmission tels que la régulation de l'antiport Na^+/H^+ , un flux entrant de calcium, la stimulation de la synthèse d'inositol trisphosphate et des phosphorylations de tyrosine. Ces processus paraissent directement liés à l'agrégation des sites intégrines de la surface cellulaire et à leur liaison au cytosquelette. Là encore, il semble que la liaison gamétique soit à

l'origine de l'activation d'une cellule, l'ovocyte cette fois, et qu'elle procède de la stimulation d'une ou plusieurs voies de transmission.

Pour l'instant, seules trois protéines sont concernées par la fusion des membranes gamétiques. Les deux premières sont, soit semblables, soit comparables aux protéines qu'utilisent les virus pour pénétrer leurs cellules hôtes (*m/s n° 5, vol. 8, p. 491*). La sous-unité α de la fertiline de cobaye porte une hélice α asymétrique qui regroupe sur l'une de ses faces de nombreux résidus hydrophobes et participe à la fusion membranaire [26]. Le rôle de la fertiline α vient cependant d'être remis en cause chez l'homme, seul un pseudogène non fonctionnel étant présent dans le génome [33]. Par ailleurs, l'antigène de surface des lymphocytes CD46, qui est le récepteur du virus de la rougeole, semble impliqué dans ce processus dans la mesure où l'anticorps qui lui correspond inhibe la liaison des spermatozoïdes aux ovocytes et leur pénétration [34]. Enfin, la démonstration du rôle de la protéine DE de rat dans la fusion des gamètes vient de ce que son anticorps inhibe la pénétration des ovocytes sans modifier la liaison des spermatozoïdes proprement dite [35]. Cette protéine est d'origine épидидymaire et se fixe sur la région équatoriale du spermatozoïde.

Quelles relations avec la fécondité ?

Les animaux de laboratoire souffrent rarement de troubles spontanés de la reproduction et sont donc de piètres modèles d'étude. Seule l'obtention d'animaux transgéniques peut apporter des informations mais les résultats sont souvent difficiles à interpréter, comme nous l'avons vu dans le cas de l'acrosine. Pour l'instant, rares sont les protéines dont on a testé le rôle par cette technique et seules les souris déficientes en ZP3 sont stériles [36].

Chez l'homme, on n'a établi de corrélation entre l'expression d'une protéine par le spermatozoïde et l'aptitude à féconder que pour la P34H [17]. Afin de caractériser directement des molécules de reconnaissance humaines, plusieurs groupes ont développé une stratégie fondée

sur la fabrication d'anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines du spermatozoïde humain et leur sélection selon leur capacité d'inhiber l'une des étapes de la fécondation [37, 38]. Parmi les antigènes correspondants à ces anticorps, la protéine FA1 semble impliquée dans la liaison primaire [14], la protéine SOB3 dans la liaison secondaire à la zone pellucide [39], les protéines FA2, SOB1 et SOB2 participant à la liaison à la membrane ovocytaire [38, 40, 41]. L'ADNc correspondant à SOB1 vient d'être séquencé ; il s'agit d'un nouveau gène. Dans le même esprit, l'utilisation d'anticorps dirigés contre des protéines du système immunitaire a permis de mettre en évidence sur le spermatozoïde la présence de la protectine ou CD59. Cette protéine protège le gamète en réglant le complément et semble, en outre, intervenir dans sa liaison à l'ovocyte [42]. Cette observation n'est pas surprenante dans la mesure où la CD59 est aussi impliquée dans la formation des rosettes entre lymphocytes T et globules rouges.

Deux études ont, par ailleurs, mis en évidence dans les sérums de patients infertiles ou vasectomisés la présence d'auto-anticorps dirigés contre la FA1 et la Sp17 [43, 44]. On sait, en effet, que dans 5 % à 10 % des couples infertiles l'homme ou la femme sécrète des anticorps dirigés contre les spermatozoïdes du couple. Leur présence, probablement secondaire à un traumatisme mécanique ou infectieux, est responsable de la stérilité des couples sans autre affection décelable. On les trouve dans l'épididyme ou le tractus génital de la femme et ils peuvent inhiber, soit la liaison à la zone pellucide, soit la reconnaissance de l'ovocyte. Une situation immunologique équivalente est observée chez les hommes vasectomisés dans un but contraceptif : l'accumulation de spermatozoïdes dans l'épididyme stimule la synthèse d'anticorps dirigés essentiellement contre leurs protéines de surface. Plusieurs d'entre elles ont été mises en évidence à l'aide de ces anticorps mais il est très difficile de les caractériser et de les identifier en raison de la rareté du matériel.

A la suite de ces observations, les protéines de reconnaissance du spermatozoïde sont devenues une cible de

choix pour tenter d'élaborer des modèles de contraception vaccinale. En effet, malgré les résultats contraceptifs obtenus, les essais réalisés avec la ZP3 se sont montrés décevants : ils provoquent des affections ovariennes susceptibles d'entraîner une stérilité définitive, ce qui n'est pas acceptable dans l'espèce humaine. Un mode de contraception réversible reconstituerait une situation « naturelle » dont le seul effet décelable est la stérilité, à la condition que les protéines ou les fragments de protéines utilisés soient spécifiques du spermatozoïde et du tractus génital masculin. Il pourrait être appliqué aussi bien à l'homme qu'aux animaux, mais dans des contextes éthiques différents. En revanche, il n'y a pas pour l'instant d'application de ces découvertes au traitement de l'infertilité.

Évolution

Les systèmes de reconnaissance cellulaires interviennent à de nombreuses reprises dans l'organisme dans des situations tant normales que pathologiques : l'embryogenèse, la réaction immunitaire et le processus inflammatoire, la dissémination des métastases, l'adhérence d'agents infectieux... Ils font appel à deux types de dialogue qui mettent en jeu ce que l'on peut appeler un langage sucré et un langage protéique. En ce qui concerne le premier, la liaison de protéines de type lectine à des groupements glycosylés offre de multiples possibilités. L'existence d'isomères et la formation de structures latérales branchées peut en effet engendrer un grand nombre de configurations à partir de quelques saccharides. Il est logique que ce langage ait été sélectionné par l'évolution pour assurer la spécificité d'espèce de la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide. La liaison à la membrane de l'ovocyte semble, quant à elle, privilégier le langage protéique. La spécificité n'est plus nécessaire à ce stade puisque seuls le ou les spermatozoïdes, selon les espèces, qui ont franchi le premier barrage y parviennent. Dans l'un et l'autre cas, si les molécules décrites pour l'instant présentent des particularités propres à la reconnaissance des gamètes, elles sont cependant souvent proches de protéines déjà décrites dans d'autres

systèmes physiologiques. C'est donc l'association de plusieurs systèmes d'adhérence, dont l'efficacité est éprouvée, qui fait l'originalité de la reconnaissance des gamètes. Ces observations témoignent une fois de plus d'une évolution remarquablement conservatrice et économe ■

RÉFÉRENCES

- Jégou B. La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. *Med Sci* 1995; 11 : 519-27.
- Kramer JA, Krawetz SA. RNA in spermatozoa : implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod* 1997; 3 : 473-8.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In : Knobil E, Neill JD, eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988 : 135-85.
- Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? to get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and Fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 1997; 56 : 320-7.
- Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in sperm-zona binding. *Biol Reprod* 1996; 55 : 80-6.
- Thaler C, Cardullo RA. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *J Biol Chem* 1996; 271 : 23289-97.
- Leyton L, Saling PM. 95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as substrates for tyrosine kinase in response to zona binding. *Cell* 1989; 57 : 1123-30.
- Bork P, Tsai JY, Silver LM. Sperm-egg binding protein or proto-oncogen? *Science* 1996; 271 : 1431-5.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD. Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 1992; 357 : 589-93.
- Gong X, Dubois DH, Miller DJ, Shur BD. Activation of a G protein complex by aggregation of β -1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 1995; 269 : 1718-21.
- Yang L, Baffy G, Rhee SG, Manning D, Hansen CA, Williamson JR. Pertussis toxin-sensitive Gi protein involvement in epidermal growth factor-induced activation of phospholipase C- γ in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1991; 266 : 22451-8.
- Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Orgebin-Crist MC. Human sperm plasma membrane possesses α -D-mannosidase activity. *Biol Reprod* 1990; 42 : 843-58.
- Bookbinder LH, Cheng A, Bleil JD. Tissue- and species-specific expression of sp56,

a mouse sperm fertilization protein. *Science* 1995; 269 : 86-9.

14. Naz RK, Ahmad K. Molecular identities of human sperm proteins that bind human zona pellucida : nature of sperm-zona interaction, tyrosine kinase activity and involvement of FA-1. *Mol Reprod Dev* 1994; 39 : 397-408.

15. Richardson RT, Yamasaki N, O'Rand MG. Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev Biol* 1994; 165 : 688-701.

16. Bérubé B, Sullivan R. Inhibition of *in vivo* fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol Reprod* 1994; 51 : 1255-63.

17. Boué F, Sullivan R. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H, an epididymal sperm protein. *Biol Reprod* 1996; 54 : 1018-24.

18. Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. Boar spermadhesin AWN-1 : oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Eur J Biochem* 1995; 230 : 329-36.

19. Roldan ERS, Murase T, Shi QX. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 1994; 266 : 1578-81.

20. Florman HM, Corron M, Kim TD, Babcock D. Activation of voltage dependant calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1992; 152 : 304-14.

21. De Jonge CJ, Han H, Lawrie H, Mack S, Zaneveld L. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second messenger pathway. *J Exp Zool* 1991; 258 : 113-25.

22. Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K, Itoh H, Michikawa Y, Kimura K, Takada M, Fukamizu A, Arai Y. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J Biol Chem* 1989; 264 : 11920-7.

23. Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm of mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 1994; 269 : 31845-9.

24. Wright RM, John E, Klotz K, Flickinger CJ, Herr JC. Cloning and sequencing of cDNAs coding for the human intra-acrosomal antigen SP-10. *Biol Reprod* 1990; 42 : 693-701.

25. Coonrod SA, Herr JC, Westhusin ME. Inhibition of bovine fertilization *in vitro* by antibodies to SP-10. *J Reprod Fert* 1996; 107 : 287-97.

26. Blobel DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992; 356 : 248-52.

27. Gupta SK, Alves K, O'Neil Palladino L, Mark GE, Hollis GF. Molecular cloning of the human Fertilin β subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224 : 318-26.

RÉFÉRENCES

28. Bronson RA, Fusi MF. Integrins and human reproduction. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 153-68.
29. Almeida EAC, Huovila APJ, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM. Mouse egg integrin $\alpha 6 \beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* 1995; 81: 1095-104.
30. Miranda PV, Tezon JG. Characterization of fibronectin as a marker for human epididymal sperm maturation. *Mol Reprod Dev* 1992; 33: 443-50.
31. Fusi FM, Bernocchi N, Ferrari A, Bronson RA. Is vitronectin the velcro that binds the gametes together? *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 859-66.
32. Klentzeris L, Fishel S, Mac Dermott H, Dowell K, Hall J, Green S. A positive correlation between expression of $\beta 1$ -integrin cell adhesion molecules and fertilization ability of human spermatozoa *in vitro*. *Mol Human Reprod* 1995; 10: 728-33.
33. Jury JA, Frayne Y, Hall L. The human fertilin α gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochem J* 1997; 321: 577-81.
34. Taylor CT, Biljan MM, Kingsland CR, Johnson PM. Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction *in vitro* by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Hum Reprod* 1994; 9: 907-11.
35. Cohen DJ, Munuce MJ, Cuasnicu P. Mammalian sperm-egg fusion: the development of rat oolemma fusibility during oogenesis involves the appearance of binding sites for sperm protein DE. *Biol Reprod* 1996; 55: 200-6.
36. Rankin T, Familiari M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 1996; 122: 2903-10.
37. Anderson DJ, Johnson PM, Alexander NJ, Jones WR, Griffin PD. Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: report of two WHO-sponsored workshops, June 30, 1986, Toronto, Canada. *J Reprod Immunol* 1987; 10: 231-57.
38. Boué F, Duquenne C, Lassalle B, Lefèvre A, Finaz C. FLB1, a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recognition process. *Biol Reprod* 1995; 52: 267-78.
39. Martin-Ruiz C, Duquenne C, Treton D, Lefèvre A, Finaz C. SOB3, a human sperm protein involved in zona pellucida binding: physiological and biochemical analysis, purification. *Mol Reprod Dev* 1997 (sous presse).
40. Naz RJ, Morte C, Garcia-Framis V, Kaplan P, Martinez P. Characterization of a sperm-specific monoclonal antibody and isolation of 95-kilodalton fertilization antigen-2 from human sperm. *Biol Reprod* 1993; 49: 1236-44.
41. Lefèvre A, Martin Ruiz C, Chokomian S, Duquenne C, Finaz C. Characterization and isolation of SOB2, a human sperm protein with a potential role in oocyte membrane binding. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 507-11.
42. Fénichel P, Cervoni F, Hofmann P, Dec kert M, Emiliozzi C, Hsi BL, Rossi B. Expression of the complement regulatory protein CD59 on human spermatozoa: characterization and role in gametic interaction. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 338-46.
43. Naz RK. Involvement of fertilization antigen (FA-1) in involuntary immunoinfertility in humans. *J Clin Invest* 1987; 80: 1375-83.
44. Lea IA, Adoyo P, O'Rand MG. Autoimmunogenicity of the human sperm protein Sp17 in vasectomized men and identification of linear B cell epitopes. *Fertil Steril* 1997; 67: 355-61.
45. Tesarik J, Testart J. La fécondation. *La Recherche* 1989; 20: 1008-20.
46. Wassarman PM. Fertilization in mammals. *Sci Am* 1988; 259: 52-8.

TIRÉS À PART

C. Finaz.

Summary

Gamete interaction and adhesion proteins

Fertilization implicates the intervention of adhesion and activation mechanisms between male and female mammalian gametes comparable to those already described for metastasis, embryonal development, immune system functioning and viral infection. Recognition proteins thus far discovered in animals intervene at essentially two levels: (1) association of the spermatozoa with, and penetration of the acellular protective envelope of the oocyte, the zona pellucida; (2) sperm attachment to the oocyte plasma membrane. The first step involves interactions with oligosaccharides associated with the proteins of the zona pellucida. It is at this stage that species barriers take place to prevent cross fertilization. This association activates the spermatozoa by triggering the acrosomal reaction which allows release of the proteolytic enzymes necessary to dissociate the zona pellucida. The attachment to the oocyte plasma membrane seems to depend on peptidic sequences. It culminates in the activation of the oocyte and continuation of meiosis. Recognition events between complementary molecules initiate, at each of the two steps, the transduction pathways responsible for the activation of the respective gametes.

6^e Symposium de Génétique Humaine
Paris, France
15-16 mai 1998