

Les partenaires moléculaires impliqués dans l'interaction entre spermatozoïdes et zone pellucide chez les mammifères. Conséquences pour la fertilité humaine

Catherine Serres, Jana Auer, François Petit, Catherine Patrat et Pierre Jouannet

Université Paris Descartes, Faculté de Cochin, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

Auteur correspondant : Catherine Serres, Catherine.serres@univ-paris5.fr

Reçu le 6 septembre 2007

Résumé – Lors de l'interaction gamétique chez les mammifères, la zone pellucide, formée de trois ou quatre glycoprotéines (ZP1 à ZP4), établit une barrière d'espèce. La spécificité d'espèce reposerait sur la nature et l'organisation complexe des résidus sucrés des glycoprotéines, lesquelles sont des ligands pour les spermatozoïdes. Les récepteurs membranaires spermatiques sont multiples et agissent comme des lectines en reconnaissant des résidus sucrés de la ZP. Ils sont des molécules d'adhésion ou des récepteurs capables d'activer un signal intraspermatic pour la réalisation de la réaction acrosomique (RA). Dans l'espèce humaine, leur identification est incomplète. Une étude en cours au laboratoire, utilisant une approche directe par *far Western blot*, a identifié comme récepteurs spermatiques humains, des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres. Ce résultat montre que des enzymes glycolytiques peuvent avoir un rôle dans l'interaction gamétique, sans exercer leur activité catalytique. Par ailleurs, des anomalies d'expression de certains des récepteurs à ZP3 ont été retrouvées dans les spermatozoïdes de patients ayant des échecs de fécondation *in vitro*. Ces protéines impliquées dans l'interaction gamétique évoluent rapidement sous l'influence d'une sélection darwinienne positive. La pression de sélection, qui pourrait s'exercer lors d'un conflit sexuel, entraînerait une coévolution des molécules partenaires de l'interaction gamétique aboutissant à un isolement reproductif et la formation d'une nouvelle espèce.

Mots clés : Fécondation / récepteur spermatique / zone pellucide / infertilité / spéciation

Abstract – Molecules involved in sperm-zona pellucida interaction in mammals. Role in human fertility.

Fertilization in mammals requires an initial interaction of sperm with the oocyte envelope, the zona pellucida (ZP), before it reaches the oocyte. ZP is a highly glycosylated structure, composed of three (mouse) or four (rabbit, boar, bovine, humans...) glycoproteins. The presence of ZP around the oocyte does not allow heterospecific fertilization. This barrier is principally due to the presence of species-specific glycosylations on ZP proteins. Sperm bind ZP by means of membrane receptors which recognize carbohydrate moieties on ZP glycoproteins according to a well-precised sequential process. Upon initial attachment, spermatozoa bind ZP3/ZP4 which induces the sperm acrosome exocytosis followed by a secondary binding of acrosome reacted spermatozoa to ZP2 and by ZP penetration. The sperm receptors are adhesive proteins or integral plasma membrane proteins linked to intraspermatic signalling pathways activating the acrosome reaction. Over the last twenty years, numerous studies have been carried out to identify sperm receptors to ZP in several species, but the data in humans are still incomplete. Work initiated in our research group has identified several proteins interacting with recombinant human ZP2, ZP3 and ZP4, among which are glycolytic enzymes. These enzymes are involved in the gamete interaction by means of their

affinity to sugars and not by their catalytic properties. From a clinical point of view, an observed lack or weak expression of some sperm receptors to ZP3 in cases of idiopathic infertility associated with *in vitro* fertilization failure suggests that knowing the molecular mechanism driving the gamete recognition can be important at the diagnostic level. Furthermore, it has been shown that proteins that mediate gamete recognition diverge rapidly, as a result of positive darwinian selection. A sexual conflict can drive co-evolution of reproductive molecules in both sexes resulting in reproductive isolation and species emergence.

Key words: Fertilization / sperm receptor / zona pellucida / infertility / speciation

Introduction

À leur sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas directement fécondants. C'est lors de leur maturation post testiculaire, au cours du transit épидидymaire et ensuite lors de la remontée dans les voies génitales féminines, que les spermatozoïdes acquièrent leur capacité fécondante. Cette acquisition se traduit par un certain nombre de réaménagements de la surface membranaire et par des modifications internes de nature biochimique et métabolique qui rendent les spermatozoïdes capables d'interagir avec l'ovocyte et de le féconder. Arrivés dans le haut de l'ampoule tubaire, aux abords de l'ovocyte, les spermatozoïdes doivent se frayer un passage entre les cellules du cumulus avant d'atteindre la zone pellucide qui entoure l'ovocyte et de s'y fixer. Cette liaison primaire induit dans le spermatozoïde l'exocytose de son acrosome, appelé « réaction acrosomique » (RA), au cours de laquelle des enzymes lytiques sont libérées. La digestion limitée de la matrice pellucidaire aide à la pénétration d'un spermatozoïde mobile qui, après avoir franchi la zone pellucide, fusionne avec la membrane ovocytaire et pénètre dans l'ovocyte (voir Yanagimachi, 1994). L'interaction gamétique est donc une cascade d'événements faisant intervenir des interactions moléculaires successives entre les deux gamètes, tout d'abord entre le spermatozoïde et l'enveloppe périovocytaire puis entre le spermatozoïde ayant fait sa réaction acrosomique et l'ovocyte lui-même.

Ce manuscrit ne traite que la première étape de l'interaction gamétique, en s'appuyant sur les connaissances acquises dans différentes espèces de mammifères y compris l'Homme. Il décrit les différents partenaires moléculaires de l'interaction spermatozoïde-zone pellucide, insistant plus particulièrement sur les récepteurs spermatiques. Les résultats de travaux récents de notre laboratoire sur l'implication possible de récepteurs spermatiques dans certaines infertilités idiopathiques sont aussi présentés. Enfin nous rapportons de manière synthétique des données concernant l'évolution des molécules impliquées dans

l'interaction gamétique et les conséquences de leur divergence dans la spéciation.

Les partenaires moléculaires de l'interaction gamétique

les glycoprotéines de la zone pellucide

La zone pellucide (ZP) est une matrice protéique extracellulaire hautement glycosylée que l'on trouve autour des œufs de mammifères et qui a son équivalent chez d'autres vertébrés comme les amphibiens, les oiseaux, les poissons. Elle intervient lors de l'interaction gamétique en établissant une barrière d'espèce, évitant ainsi des fécondations hétérospécifiques. Après la fécondation, elle assure un bloc à la polyspermie en devenant imperméable à de nouveaux spermatozoïdes. Ensuite, elle protège l'embryon durant les premiers stades du développement préimplantatoire.

La structure de la ZP a été étudiée surtout chez la souris et le porc, des espèces qui permettent la récupération de beaucoup de matériel à faible coût. Malheureusement chez l'Homme son étude est rendue très difficile par le peu de matériel disponible qui ne peut être que de la ZP provenant d'ovocytes récupérés après un échec de fécondation *in vitro*, avec le consentement des patients. La souris a donc été l'espèce modèle privilégiée depuis le début des années 1980. La ZP murine est formée de trois glycoprotéines (ZP1, ZP2, ZP3). Les molécules de ZP2 et ZP3 forment des longs filaments pontés par ZP1 (Greve & Wassarman, 1985). Des études génétiques et phylogénétiques ont montré qu'il existait une quatrième glycoprotéine, ZP4, chez la plupart des autres espèces dont l'Homme, mais que la souris n'exprimerait pas (Spargo & Hope, 2003; Lefievre *et al.*, 2004). Sa place dans l'architecture de la ZP n'est pas encore déterminée mais elle pourrait former des complexes avec ZP3 (Yurewicz *et al.*, 1998). Après la fécondation, à la suite d'un clivage de certains oligosaccharides de ZP3 et ZP2 par les enzymes libérées à partir des granules corticaux de l'ovocyte (Miller *et al.*, 1993; Aviles *et al.*, 1997)

d'une protéolyse de ZP2 (Bauskin *et al.*, 1999) l'architecture tridimensionnelle de la ZP se modifie, la rendant ainsi imperméable à d'autres spermatozoïdes. Les glycoprotéines, ZP2, ZP3 et ZP4, sont des ligands pour des sites de liaisons sur le spermatozoïde, alors que ZP1 ne jouerait qu'un rôle structural.

ZP3 est la plus petite des molécules avec une masse moléculaire (MM) de 83 kDa chez la souris, et 50-60 kDa chez l'homme, le lapin, le porc. ZP2 est la plus grosse avec une MM de 120 à 90 kDa selon les espèces. ZP4 a une MM de 60-65 kDa environ (Greve & Wassarman, 1985; Gupta *et al.*, 1998; Bauskin *et al.*, 1999). Les différences observées dans les MM sont surtout attribuées à une différence de la glycosylation des protéines. Les branchements oligosaccharidiques *N*- ou *O*- liés sur le corps peptidique des différentes ZP sont complexes et hétérogènes. Plusieurs revues font le point sur les connaissances dans ce domaine (Benoff, 1997; Easton *et al.*, 2000). Les multiples combinaisons de sucres qui peuvent être synthétisées varient entre espèces (Noguchi *et al.*, 1992) et permettent de rendre compte des restrictions observées dans les liaisons hétérospécifiques. Ainsi le concept d'une spécificité d'espèce liée à des différences de glycosylation de la ZP s'est imposé naturellement.

Les récepteurs spermatiques du spermatozoïde

Lors de l'interaction avec la ZP, on distingue une phase initiale d'adhésion ou d'attachement de faible affinité des spermatozoïdes suivie d'une fixation serrée de haute affinité qui fera intervenir des molécules/récepteurs plus spécifiques. Ce sont des molécules de surface, localisées sur la tête des spermatozoïdes dans la région recouvrant l'acrosome ou le post acrosome, qui vont dans un premier temps interagir avec ZP3/ZP4. Cette interaction induit dans le spermatozoïde la RA qui, en extériorisant des sites situés sur la membrane acrosomique interne, permet ensuite d'autres interactions du spermatozoïde avec ZP2. Ainsi, les spermatozoïdes intacts se lient à ZP3 alors que les spermatozoïdes qui ont fait une RA reconnaissent ZP2 (Mortillo & Wassarman, 1991). On peut donc distinguer des récepteurs spermatiques impliqués dans l'attachement/adhésion, la fixation serrée primaire ou ceux permettant la fixation dite « secondaire », après la RA.

Les récepteurs sont souvent décrits comme ayant des similitudes avec des lectines, c'est-à-dire des protéines présentant une haute affinité pour certains résidus sucrés. Ainsi, chez la souris, la liaison des récepteurs spermatiques à ZP3 s'exerce par l'intermédiaire d'oligosaccharides *O*- liés sur des résidus sérine/thréonine de la chaîne polypeptidique de ZP3

(Florman & Wassarman, 1985), précisément sur Ser 332 et Ser 334 (Chen *et al.*, 1998). Les oligosaccharides *N*-liés sont aussi impliqués dans la liaison à la ZP, notamment chez le porc et les bovins (Nakano *et al.*, 1996; Yonezawa *et al.*, 2007). La nature des sucres impliqués dans la liaison au spermatozoïde fait encore débat sans doute en partie parce qu'elle varie selon les espèces. A titre d'exemple, des expériences d'inhibition compétitive de l'interaction gamétique réalisées en présence de résidus sucrés chez la souris ont impliqué le fucose (Johnston *et al.*, 1998), le galactose (Bleil & Wassarman, 1988), la *N*-acétylglucosamine (Miller *et al.*, 1992) (voir revue de Talbot *et al.*, 2003).

Parmi les différentes protéines/récepteurs identifiées, celles qui sont des protéines périphériques liées à la membrane plasmique par un ancrage Glycéro-Phosphatidyl-Inositol sont plutôt des protéines d'adhésion : par exemple la protéine P34H des spermatozoïdes humains (Boué & Sullivan, 1996). Les protéines qui sont intégrées dans la membrane plasmique et liées au cytosquelette sous-membranaire sont susceptibles de se déplacer dans la membrane. Ainsi sous l'action de la liaison à la ZP, ces protéines, comme la Galactosyl-Transferase (GalTase) chez la souris peuvent se regrouper, s'agréger et activer une voie de signalisation intraspermaticque qui déclenchera la RA (Macek *et al.*, 1991). De nombreuses études sur les mécanismes impliqués dans la RA (pour revue voir Patrat *et al.*, 2000) ont montré l'implication de récepteurs à activité tyrosine kinase et de récepteurs couplés à des protéines G (G_i , G_o), lesquels activent différents systèmes enzymatiques tels que l'adenyl cyclase et la PLC γ susceptibles de produire des messagers comme AMPc, DAG et IP3 qui participent à la régulation de l'influx calcique responsable du déclenchement de l'exocytose acrosomique.

Par ailleurs, les résidus sucrés des glycoprotéines périphériques (adsorbées) ou intégrées à la membrane plasmique des spermatozoïdes sont capables, en ayant un rôle antigénique, de stimuler la production d'auto-Anticorps Anti-Spermatozoïdes (AAS). Quand ces derniers sont dirigés contre des cibles antigéniques localisées sur la tête des spermatozoïdes, ces AAS peuvent être responsables d'une inhibition de la fixation et de la pénétration des spermatozoïdes dans la ZP et entraîner une infertilité (Zouari & Almeida, 1993; Menge *et al.*, 1999).

Modèle d'interaction spermatozoïde-zone pellucide

Les modèles moléculaires de la fixation des spermatozoïdes à l'ovocyte ont surtout été élaborés à partir d'études faites chez la souris (Wassarman, 2002; Hoodbhoy & Dean, 2004; Clark & Dell, 2006). Le plus ancien modèle était basé sur une reconnaissance,

de type lectine, des oligosaccharides de la ZP par des protéines du spermatozoïde mais, plus récemment, des expériences utilisant des ovocytes de souris exprimant ZP3 et/ou ZP2 humaines ont indiqué que la structure supramoléculaire de la ZP pouvait avoir aussi de l'importance pour la fixation des spermatozoïdes. Du côté du spermatozoïde, il a été suggéré qu'en fait ce serait un complexe multiprotéique qui reconnaîtrait la ZP par l'intermédiaire de ses différents résidus sucrés organisés spatialement d'une manière spécifique d'espèce, les différentes protéines du complexe coopérant pour activer les différents signaux nécessaires à la réalisation de la RA (Benoff, 1997). Ce complexe multimoléculaire de reconnaissance serait mis en place à la surface externe de la membrane plasmique des spermatozoïdes grâce à la médiation de molécules chaperones (Nixon *et al.*, 2005).

Caractérisation et fonction des récepteurs spermatiques

Données expérimentales

Les protéines spermatiques susceptibles d'interagir avec la ZP ont été identifiées, au cours de ces vingt dernières années, par différents types d'approche. Des études indirectes ont été réalisées lors d'expériences d'inhibition de la liaison des spermatozoïdes à la ZP en présence soit de sucres qui se fixent de manière compétitive sur des récepteurs/lectine du spermatozoïde (comme l' α -D-mannosidase, le récepteur du mannose), soit d'anticorps qui bloquent des sites antigéniques du spermatozoïde (comme la PH20, TPI). Toutefois, ces études ne permettent pas de préciser avec quelle glycoprotéine de la ZP interagissent les molécules spermatiques. D'autres approches sont plus directes lorsque les récepteurs-candidats sont isolés en se basant sur leur affinité pour la ZP. Ainsi les travaux ont eu recours à la chromatographie d'affinité (Ensslin *et al.*, 1995), à la liaison entre ZP3 et son récepteur spermatique suivie d'une immunoprécipitation des complexes ainsi formés (Bleil & Wassarman, 1990) ou encore au *far Western Blot* (Far WB) où les protéines spermatiques, séparées par électrophorèse puis transférées dans un blot, sont incubées avec des ZP solubilisées radiomarquées (Leyton & Saling, 1989). Récemment, une approche protéomique plus globale a été développée pour identifier la majorité des molécules situées dans les régions du spermatozoïde intervenant dans l'interaction avec la ZP (Stein *et al.*, 2006), mais il reste à prouver l'implication réelle des ces molécules.

Le tableau 1 indique les principales protéines impliquées dans l'interaction avec la ZP chez quelques espèces de mammifères. Il s'appuie sur les revues

faites par Benoff en 1997, Finaz et ses collaborateurs en 1998 et Wassarman en 1999, en les complétant par des données plus récentes. D'autres protéines, non rapportées ici, ont aussi été identifiées chez le rat, le cobaye et le hamster (voir Benoff, 1997). Plutôt que d'agir de manière indépendante, ces différentes protéines candidates joueraient un rôle en complémentarité avec d'autres (complexe multiprotéique), comme le suggère le fait que la fécondation peut avoir lieu même si une molécule est manquante. Ainsi, l'invalidation de l'acrosine ou de la galactosyl-transférase (GalTase) chez la souris n'empêche pas les souris d'être fertiles (Baba *et al.*, 1994; Lu & Shur, 1997).

Identification de récepteurs spermatiques à la ZP dans l'espèce humaine

Dans l'espèce humaine, la plupart des protéines candidates ont été mises en évidence lors d'expériences d'inhibition compétitive par des oligosaccharides : ainsi le récepteur du mannose, l' α -D-mannosidase, la L-Sélectine (Tableau 1). D'autres ont été recherchées par homologie aux molécules déjà décrites chez la souris (P95/Hu9), le hamster (P26H/P34H) ou le lapin (RSA/SP17). Enfin quelques protéines ont été identifiées grâce à des anticorps anti-spermatozoïdes responsables d'inhibition de la fixation des spermatozoïdes humains à la ZP (SOB3, TPI, PH20, FA-1). L'étude de l'interaction directe entre les protéines spermatiques et la ZP humaine par *far WB* (Shabanowitz & O'Rand, 1988) a montré que des protéines de 60, 35, et 18 à 16 kDa interagissent avec la ZP, mais ces protéines spermatiques n'ont pas été caractérisées et leur ligand pellucidaire n'a pas été identifié.

En utilisant la technique du *far WB* en 2D, avec les ZP recombinantes humaines (rhZP2, rhZP3 et rhZP4, Harris *et al.*, 1999), suivie de l'identification des protéines cibles des rhZP en spectrométrie de masse (MALDI TOF), nous avons identifié plusieurs récepteurs interagissant avec rhZP2, rhZP3 et rhZP4, dont la Triosephosphate Isomerase (TPI), la Glutathion-S-transférase μ (GST μ) et deux autres enzymes de la voie de la glycolyse. La GST μ qui avait déjà été décrite comme partenaire d'une protéine ZP3-like, chez la chèvre (Hemachand *et al.*, 2002) pourrait aussi interagir avec la ZP humaine. Par ailleurs, la TPI avait déjà été caractérisée dans notre équipe comme auto-antigène immunodominant responsable de la production d'anticorps antispermatozoïdes associés à des cas d'infertilité avec échecs de fécondation (Auer *et al.*, 2000). Cette molécule est localisée sur la tête des spermatozoïdes et est impliquée dans la fixation des spermatozoïdes à la ZP (Auer *et al.*, 2004). Enfin, les deux

Tableau 1. Protéines spermatiques impliquées dans l'interaction avec la ZP.

Protéines spermatiques	Partenaire ou niveau d'interaction	Références	Observations complémentaires
Souris			
P95/ZRK	ZP3	Leyton & Saling, 1989	Activité tyrosine kinase
β galT-ase	ZP3	Miller <i>et al.</i> , 1992	Couplée à protéine Gi/Go
Sp56	ZP3	Cheng <i>et al.</i> , 1994	Localisation en surface et dans l'acrosome
FA-1	ZP3	Zhu & Naz, 1997	Homologue de FA-1 humaine
MC41	ZP2	Tanii <i>et al.</i> , 2001	Associée à une sérine protéase
Proacrosine	ZP2	Howes <i>et al.</i> , 2001	
Porc			
APz	ZP3 α	Peterson <i>et al.</i> , 1991	
Zonadhésine	ZP	Hardy & Garbers, 1994	Fonction durant la RA
spermadhésine	ZP	Dostalova <i>et al.</i> , 1995	
Sp38	ZP	Mori <i>et al.</i> , 1995	
Lapin			
RSA (54 kDa)	ZP	Abdullah <i>et al.</i> , 1991	Récepteur du galactose
RSA /SP17	ZP	Richardson <i>et al.</i> , 1994	
Homme			
P95/Hu9	Fixation 1aire	Burks <i>et al.</i> , 1995	Homologue de P95 souris
α -D-mannosidase récepteur du mannose	Fixation 1aire	Tulsiani <i>et al.</i> , 1990	
P34H	Fixation 1aire	Benoff <i>et al.</i> , 1993	
		Boué & Sullivan, 1996	Protéine liée par GPI. Homologue P26H de hamster
SLIP-1	Fixation 1aire	Rattanachaiyanont <i>et al.</i> , 2001	
FA-1	Fixation 1aire	Naz & Ahmad, 1994	Cible d'ASA. activité tyrosine kinase
TPI/P36	Fixation 2aire	Auer <i>et al.</i> , 2004	Cible d'ASA
PH20	Fixation 2aire	Hunnicuttt <i>et al.</i> , 1996	Homologue PH20 de cobaye
SP10	Fixation 2aire	Wright <i>et al.</i> , 1990	
SOB3	Fixation 2aire	Martin-Ruiz <i>et al.</i> , 1998	
SP17	ZP	O' Rand <i>et al.</i> , 1985	Homologue SP17 lapin
CD52 (SAGA-1)	Fixation 1aire	Diekman <i>et al.</i> , 1997	
L Sélectine		Lucas <i>et al.</i> , 1995	

enzymes de la voie de la glycolyse, identifiées comme récepteurs pour la ZP, avaient été décrites dans le flagelle des spermatozoïdes, où elles pourraient participer à la fourniture d'énergie pour le battement flagellaire (Gitlits *et al.*, 2000). Leur rôle dans l'interaction avec la ZP n'avait jamais été évoqué auparavant.

Sachant que la fixation des spermatozoïdes à la ZP fait intervenir les résidus sucrés de la ZP, il est intéressant de constater que les quatre protéines, que nous avons identifiées comme récepteur potentiel de la ZP, sont susceptibles d'interagir avec des sucres. Ainsi la GST μ est une enzyme de détoxification interagissant avec le glutathion (Hemachand & Shaha, 2003) et les trois autres sont des enzymes appartenant à la voie de la glycolyse (Kim & Dang, 2005). Il semblerait que dans le spermatozoïde, ces enzymes puissent avoir une fonction indépendante de leurs propriétés catalytiques (Gopalakrishnan *et al.*, 1998). C'est par leur affinité pour des sucres spécifiques qu'elles interviendraient dans la fixation des spermatozoïdes à la

ZP comme le fait la GalTase, identifiée chez la souris, et qui se fixe sur des résidus *N*-acétylglucosamine de ZP3. Il existe différentes isoformes de ces enzymes (Rao & Shaha, 2001) qui pourraient être associées aux différents rôles que l'on attribue maintenant aux enzymes glycolytiques (Kim & Dang, 2005).

Implication des récepteurs spermatiques dans l'infertilité humaine

La compréhension des bases moléculaires de l'interaction gamétique s'avère utile pour identifier les causes de certaines infertilités actuellement inexplicables et pour permettre de développer des tests fonctionnels diagnostics.

Liu et ses collaborateurs ont montré qu'il existait une véritable pathologie qu'ils ont qualifiée de « déficit en réaction acrosomique induite par la ZP »,

responsable d'infertilité et ont proposé un test pour la détecter (Liu *et al.*, 2001, 2004). Concernant les récepteurs, les travaux de Boué et Sullivan ont montré que l'expression de P34H, une protéine épидидymaire impliquée dans l'interaction avec la zone pellucide, variait d'un individu à l'autre et était significativement diminuée dans des cas d'infertilité idiopathique (Boué *et al.*, 1994, 1996). Les niveaux de P34H pourrait être un facteur prédictif du résultat de la fécondation *in vitro* (Sullivan *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'équipe de Benoff a trouvé une corrélation positive entre l'augmentation de l'expression de récepteurs au mannose à la surface des spermatozoïdes pendant la capacitation et les taux de fécondation *in vitro* (Hershlag *et al.*, 1998). Cependant à ce jour, un seul cas d'infertilité associé à un déficit en récepteur du mannose a été rapporté (Hershlag *et al.*, 1995). Enfin, il a été rapporté que certaines infertilités autoimmunes pouvaient être dues à des auto-anticorps dirigés contre le récepteur FA-1 (Hall *et al.*, 1994).

Nous avons initié une étude pour rechercher si des échecs inexplicables de fécondation *in vitro* pouvaient être dus à des défauts d'expression des récepteurs spermatiques à la ZP. Chez des hommes dont les caractéristiques spermatiques étaient normales mais pour lesquels il y avait un échec de fécondation *in vitro* avec absence ou très faible fixation des spermatozoïdes à la ZP, nous avons recherché des récepteurs à ZP3 en immunofluorescence et en far WB. Les spermatozoïdes de deux hommes sur les seize étudiés ne présentaient pas de sites de liaison pour ZP3, sites observés normalement en immunofluorescence dans la région post-acrosomique des spermatozoïdes (Figure 1). Par ailleurs nous avons trouvé que le profil des far WB de sept patients sur douze, montrait une nette sous-expression d'une à plusieurs régions protéiques interagissant avec ZP3, par comparaison à celles détectées chez les contrôles de 65-70 kDa, 35-40 kDa et 14-18 kDa (Figure 2).

Ces résultats préliminaires confirment que des altérations des récepteurs membranaires spermatiques pourraient être responsables de déficits de l'interaction gamétique et d'infertilité.

Évolution et spécificité de l'interaction gamétique

Il existe de nombreuses barrières qui participent à l'isolement reproductif responsable de la formation ou de l'identité des espèces, en limitant la rencontre des partenaires sexuels complémentaires : par exemple le territoire, la saison reproductrice, les phéromones, la compatibilité des organes génitaux etc. Si ces barrières sont levées, les individus et les gamètes peuvent se rencontrer ; la reconnaissance entre cellules sexuelles,

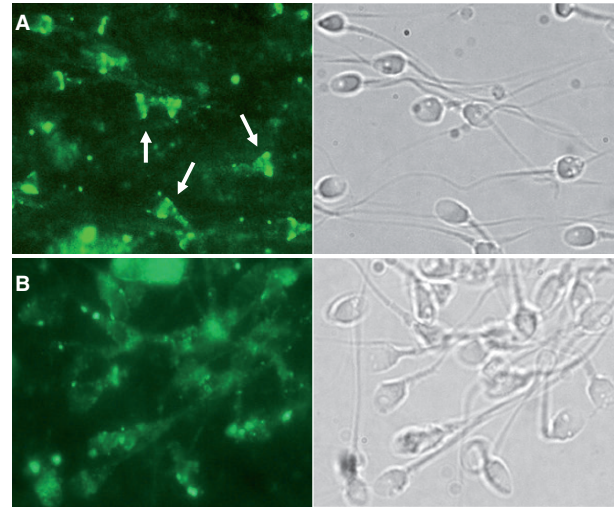


Fig. 1. Localisation en immunofluorescence des sites de liaison de ZP3 sur la tête de spermatozoïdes humains. Les spermatozoïdes de deux patients (A et B) en échec de FIV ont été fixés avec 1 % paraformaldéhyde, étalés sur lames, séchés et incubés avec de la ZP3 recombinante humaine. La visualisation des sites de liaison a été réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-ZP3 puis d'un anticorps secondaire couplé à FITC. Les images à gauche et à droite représentent le même champ illuminé respectivement en épifluorescence avec un filtre FITC et en contraste de phase. Les spermatozoïdes du patient A présentent des sites de liaison à ZP3 visibles dans la région post-acrosomique de la tête (flèches) au niveau post-acrosomique. Par contre aucune fluorescence n'est observée dans cette région sur les spermatozoïdes du patient B, démontrant l'absence ou la sous-expression de sites de liaison à ZP3 sur ses spermatozoïdes.

mâle et femelle, s'avère alors être l'ultime barrière à la fécondation hétérospécifique (Veira & Miller, 2006). La ZP est le principal obstacle aux fécondations entre espèces différentes (Wassarman, 2002). En effet si on enlève la ZP, la barrière interspécifique est levée, et le spermatozoïde peut se lier directement à la membrane de l'ovocyte : ainsi le spermatozoïde humain se fixe à l'ovocyte dépellucidé de hamster et y pénètre (Yanagimachi, 1994).

Toutefois, le degré de spécificité de l'interaction gamétique est variable. Sauf pour les espèces trop distantes, la reconnaissance entre espèces différentes peut être réduite sans être nulle : ainsi les spermatozoïdes de porc et de cheval se lient à la ZP bovine et sont capables de faire une RA à son contact (Sinowatz *et al.*, 2003), les spermatozoïdes de rat se lient à la ZP de souris (Hoodbhoy *et al.*, 2005). Dans certains cas, l'absence de barrière inter-espèce peut conduire à la formation d'espèce hybride.

La spécificité d'espèce s'est mise en place avec l'évolution des molécules partenaires dans la

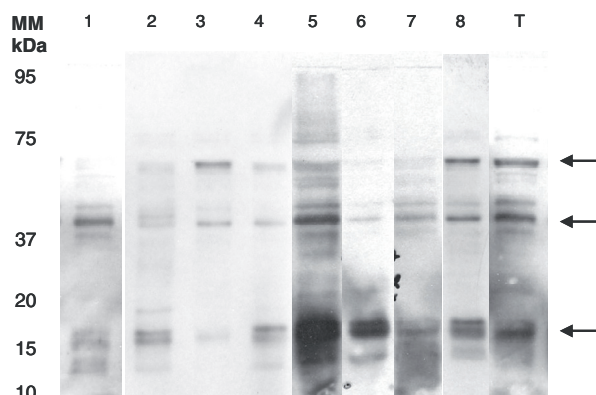


Fig. 2. Révélation en Far Western Blot des sites de liaisons de protéines spermatisques à ZP3. Les protéines spermatisques de patients (1 à 8) et d'un sperme témoin (T) ont été solubilisées, séparées en SDS PAGE puis incubées avec rhZP3. Les protéines interagissant avec ZP3 ont été mises en évidence avec un anti-ZP3 puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et révélées en chimioluminescence (ECL). Sur le sperme témoin, trois régions protéiques de liaison à ZP3 sont observées : 65-70 kDa, 35-40 kDa et 14-18 kDa. Les spermatozoïdes des patients présentent soit une sur- ou sous-expression d'une ou plusieurs régions protéiques de liaison à ZP3 (patients 1 à 7) soit un profil normal (patient 8).

reconnaissance des gamètes. Ces molécules (récepteurs spermatisques et glycoprotéines de la ZP) font partie d'un panel de protéines évoluant plus rapidement que des protéines de tissus non reproducteurs (Makalowski & Boguski, 1998, Swanson & Vacquier, 2002). La comparaison de plus de 2000 protéines codées par des gènes orthologues humains et de rongeurs a montré que ZP2, ZP3, l'acrosine, SP10, toutes des molécules de l'interaction gamétique, font partie des protéines les plus divergentes. Ces molécules présentent 30 à 40 % de divergence dans leur séquence en acides aminés, la divergence étant liée à des substitutions nucléotidiques non synonymes au niveau du génome.

Habituellement, les régions fonctionnelles des protéines sont conservées d'une espèce à l'autre, mais ce n'est pas toujours le cas des molécules participant à l'interaction gamétique. Ainsi les sites divergents de ZP3 tombent dans la région 331-373 (Swanson *et al.*, 2001) où se trouve le site d'interaction avec le spermatozoïde, en particulier, les glycosylations sur Ser 332 et Ser 334 impliquées dans la reconnaissance des gamètes. Il est possible que des changements d'acides aminés proches de ces sérines puissent entraîner des changements d'oligosaccharides et ainsi affecter la spécificité d'espèce de l'interaction spermatozoïde-ZP entraînant une évolution adaptative nécessaire (Wassarman & Litscher, 1995).

Les molécules des deux gamètes étant complémentaires dans l'interaction gamétique, il faudra qu'il y ait une co-évolution de ces molécules pour maintenir leur reconnaissance réciproque. Chez l'abalone, la protéine spermatisque, lysin, s'est rapidement diversifiée pour continuer à interagir avec le récepteur ovocytaire constamment changeant (Swanson & Vacquier, 2002). Cette co-évolution de protéines partenaires, facteur d'établissement de la barrière à la fécondation, contribue à l'isolement reproductif, et à l'établissement d'une nouvelle espèce (Swanson & Vacquier, 2002; Galindo *et al.*, 2003).

L'évolution/divergence rapide des protéines impliquées dans la reproduction des vertébrés est due à une évolution adaptative, bénéfique à la reproduction, répondant à une sélection darwinienne positive (Swanson *et al.*, 2001; Wyckoff *et al.*, 2000). Cela a été montré précisément pour des molécules impliquées dans l'interaction avec la ZP comme PH20, Zonadhesin, SP17, GalT-ase (Swanson *et al.*, 2003). Cependant, la nature du ou des facteurs de pression sélective n'est pas claire; s'agit-il d'un problème de compétition entre sperme, de conflit sexuel (Gomendio *et al.*, 2006)? Utilisant une modélisation mathématique, Gavrillets (2000) montre que le conflit sexuel peut conduire à un changement perpétuel dans les caractéristiques responsable de l'isolement reproductif.

Pour conclure, il apparaît que la liaison des spermatozoïdes à la ZP est un phénomène complexe, faisant intervenir de nombreux partenaires protéiques et glucidiques. Ces derniers forment des arrangements complexes et hétérogènes sur les glycoprotéines de la ZP et sont reconnus d'une manière spécifique d'espèce par de multiples récepteurs spermatisques dont certains sont des enzymes du métabolisme des sucres. Au cours de l'évolution, ces partenaires moléculaires ont divergé rapidement sous l'influence de facteurs de sélection positive, cette adaptation évolutive pouvant conduire à l'émergence de nouvelles espèces. En clinique humaine, la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction gamétique peut avoir un intérêt diagnostique, dans la mesure où une sous-expression de certains récepteurs spermatisques a été associée à des cas d'infertilité idiopathique avec échec de fécondation *in vitro*.

Remerciements

Nous remercions J. Harris (Zonagene, Woodlands, Texas, USA) pour le don des ZP recombinantes humaines et de leurs anticorps respectifs. Les travaux du laboratoire rapportés dans ce papier ont été financés par un contrat INSERM (Convention n° 0352) et une bourse de la Société d'Andrologie de Langue Française.

Références

- Abdullah M., Widgren E.E. & O'Rand M.G., A mammalian sperm lectin related to rat hepatocyte lectin-2/3. Purification from rabbit testis and identification as a zona binding protein. *Mol. Cell Biochem.*, 1991, 103, 155-161.
- Auer J., Senechal H., Desvaux F.X., Albert M. & De Almeida M., Isolation and characterisation of two sperm membrane proteins recognised by sperm-associated antibodies in infertile men. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 57, 393-405.
- Auer J., Camoin L., Courtot A.M., Hotellier F. & De Almeida M., Evidence that P36, a human sperm acrosomal antigen involved in the fertilization process is triosephosphate isomerase. *Mol. Reprod. Dev.*, 2004, 68, 515-523.
- Avilés M., Jaber L., Castells M., Ballesta J. & Kan F.W., Modifications of carbohydrate residues of ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol. Reprod.*, 1997, 57, 1155-1163.
- Baba T., Azuma S., Kashiwabara S. & Toyoda Y., Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 31845-31849.
- Bauskin A.R., Franken D.R., Eberspaecher U. & Donner P., Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5, 534-540.
- Benoff S., Carbohydrates and fertilization : an overview. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997, 7, 599-637.
- Benoff S., Cooper G.W., Hurley I., Napolitano B., Rosenfeld D.L., Scholl G.M. & Hershlag A., Human sperm fertilizing potential *in vitro* is correlated with differential expression of a head-specific mannose-ligand receptor. *Fertil. Steril.*, 1993, 59, 854-862
- Bleil J.D. & Wassarman P.M., 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. USA*, 1988, 18, 6778-6782.
- Bleil J.D. & Wassarman P.M., Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 5563-5567.
- Boué F. & Sullivan R., Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. *Biol. Reprod.*, 1996, 54, 1018-1024.
- Boué F., Bérubé B., De Lamirande E., Gagnon C. & Sullivan R., Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol. Reprod.*, 1994, 51, 577-587.
- Burks D.J., Carballada R., Moore H.D. & Saling P.M., Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science*, 1995, 269, 83-86
- Chen J., Litscher E.S. & Wassarman P.M., Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 6193-6197.
- Cheng A., Le T., Palcios M., Bookbinder L.H., Wassarman P.M. & Bleil J.D., Sperm-egg recognition in the mouse : characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J. Cell Biol.*, 1994, 125, 867-878.
- Clark G.F. & Dell A., Molecular models for murine sperm-egg binding. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 13853-13856.
- Diekman A.B., Westbrook-Case V.A., Naaby-Hansen S., Klotz K.L., Flickinger C.J. & Herr J.C., Biochemical characterization of sperm agglutination antigen-1, a human sperm surface antigen implicated in gamete interactions. *Biol. Reprod.*, 1997, 57, 1136-1144.
- Dostálová Z., Calvete J.J., Sanz L. & Töpfer-Petersen E., Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 230, 329-336.
- Easton R.L., Patankar M.S., Lattanzio F.A., Leaven T.H., Morris H.R., Clark G.F. & Dell A., Structural analysis of murine zona pellucida glycans. Evidence for the expression of core 2-type O-glycans and the Sd(a) antigen. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 7731-7742
- Ensslin M., Calvete J.J., Thole H.H., Sierralta W.D., Adermann K., Sanz L. & Topfer-Petersen E., Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, 1995, 376, 733-738.
- Finaz C., Martin-Ruiz C. & Lefevre A., Interaction des gamètes et protéines de reconnaissance. *Médecine/Sciences*, 1998, 14, 175-182.
- Florman H.M. & Wassarman P.M., O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*, 1985, 41, 313-324.
- Galindo B.E., Vacquier V.D. & Swanson W.J., Positive selection in the egg receptor for abalone sperm lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 4639-4643.
- Gavrilets S., Rapid evolution of reproductive barriers driven by sexual conflict. *Nature*, 2000, 403, 886-889.
- Gitlits V.M., Toh B.H., Loveland K.L. & Sentry J.W., The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. *Eur. J. Cell Biol.*, 2000, 79, 104-111.
- Gomendio M., Martin-Coello J., Crespo C., Magana C. & Roldan E.R.S., Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 15113-15117.
- Gopalakrishnan B., Aravinda S., Pawshe C.H., Totey S.M., Nagpal S., Salunke D.M. & Shaha C., Studies on glutathione S-transferases important for sperm function : evidence of catalytic activity-independent functions. *Biochem. J.*, 1998, 329, 231-241.
- Greve J.M. & Wassarman P.M., Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.*, 1985, 181, 253-264.
- Gupta S.K., Yurewicz E.C., Sacco A.G., Kaul R., Jethanandani P. & Govind C.K., Human zona pellucida glycoproteins : characterization using antibodies against recombinant non-human primate ZP1, ZP2 and ZP3. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998, 4, 1058-1064.

- Hall J.L., Engel D. & Naz R.K., Significance of antibodies against human sperm FA-1 antigen in immunoinfertility. *Arch. Androl.*, 1994, 32, 25-30.
- Hardy D.M. & Garbers D.L., Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 19000-19004.
- Harris J.D., Seid C.A., Fontenot G.K. & Liu H.F., Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr. Purif.*, 1999, 16, 298-307.
- Hemachand T. & Shaha C. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Lett.*, 2003, 538, 14-18.
- Hemachand T., Gopalakrishnan B., Salunke D.M., Totey S.M. & Shaha C. Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *J. Cell Sci.*, 2002, 115, 2053-2065.
- Hershlag A., Cooper G.W. & Benoff S., Pregnancy following discontinuation of a calcium channel blocker in the male partner. *Hum. Reprod.*, 1995, 10, 599-606
- Hershlag A., Scholl G.M., Jacob A., Mandel F.S., Guhring P., Paine T., Cooper G.W. & Benoff S., Mannose ligand receptor assay as a test to predict fertilization *in vitro* : a prospective study. *Fertil. Steril.*, 1998, 70, 482-491.
- Hoodbhoy T. & Dean J., Focus on fertilization : insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction*, 2004, 127, 417-422
- Hoodbhoy T., Joshi S., Boja E.S., Williams S.A., Stanley P. & Dean J., Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 12721-12731.
- Howes E., Pascall J.C., Engel W. & Jones R., Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin ; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J. Cell Sci.*, 2001, 114, 4127-4136.
- Hunnicut G.R., Primakoff P. & Myles D.G., 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.*, 1996, 55, 80-86.
- Johnston D.S., Wright W.W., Shaper J.H., Hokke C.H., Van Den Eijnden D.H. & Joziassie D.H., Murine sperm zona binding, a fucosyl residue is required for a high-affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, β -galactosyl-capped oligosaccharide. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 1888-1895.
- Kim J.-W., & Dang C.V., Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in biochem.Sci.*, 2005, 30, 142-150.
- Lefèvre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I.A., Monk M., Hughes D.C. & Barratt C., Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.*, 2004, 19, 1580-1586.
- Leyton L. & Saling P., 95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*, 1989, 57, 1123-1130.
- Liu D.Y., Garret C. & Baker H.W., Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in *in vitro* fertilization-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil. Steril.*, 2004, 82, 1251-1263.
- Liu D.Y., Clarke G.N., Martic M., Garrett C. & Baker H.W., Frequency of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 1185-1190.
- Lu Q. & Shur B.D., Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development*, 1997, 124, 4121-4131.
- Lucas H., Le Pendu J., Harb J., Moreau A., Bercegeay S & Barrière P., Identification of spermatozoa L-selectin and two potential pellucida ligands. *C. R. Acad. Sci. III.*, 1995, 318, 795-801.
- Macek M.B., Lopez L.C. & Shur B.D., Aggregation of β 1, 4- galactosyltransferase on mouse sperm induces the acrosome reaction. *Dev. Biol.*, 1991, 147, 440-444.
- Makalowski W. & Boguski M.S., Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome : an analysis of 2,820 orthologous rodent and human sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 9407-9412.
- 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.*, 1998, 49, 286-297.
- Menge A.C., Christman G.M., Ohl D.A. & Naz R.K., Fertilization antigen-1 removes antisperm autoantibodies from spermatozoa of infertile men and results in increased rates of acrosome reaction. *Fertil. Steril.*, 1999, 71, 256-260.
- Miller D.J., Macek M.B. & Shur B.D., Complementarity between sperm surface β 1, 4- galactosyl-transferase and egg coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*, 1992, 357, 589-593.
- Miller D.J., Gong X.H., Decker G. & Shur B.D., Egg cortical granule N- acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell Biol.*, 1993, 123, 1431-1440.
- Mori E., Kashiwabara S., Baba T., Inagaki Y. & Mori T., Amino acid sequences of porcine Sp38 and proacrosin required for binding to the zona pellucida. *Dev. Biol.*, 1995, 168, 575-583.
- Mortillo S. & Wassarman P.M., Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development*, 1991, 113, 141-149.
- Nakano M., Yonezawa N., Hatanaka Y. & Noguchi S., Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1996, 50, 25-34.
- Naz R.K. & 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.

- Nixon B., Asquith K.L. & Aitken R.J., The role of molecular chaperones in mouse sperm-egg interactions. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2005, 240, 1-10.
- Noguchi S., Hatanaka Y., Tobita T. & Nakano M., Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55 kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 204, 1089-1100.
- O'Rand M.G., Matthews J.E., Welch J.E. & Fisher S.J., Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human, and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. *J. Exp. Zool.*, 1985, 235, 423-428.
- Patrat C., Serres C. & Jouannet P., The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell.*, 2000, 92, 255-266.
- Peterson R.N., Campbell P., Hunt W.P. & Bozzola J.J., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991, 28, 260-71.
- Rao A.V. & Shaha C., Multiple glutathione S-transferase isoforms are present on male germ cell plasma membrane. *FEBS Lett.*, 2001, 507, 174-180.
- Rattanachaiyanont M., Weerachayanukul W., Léveillé M.C., Taylor T., D'Amours D., Rivers D., Leader A. & Tanphaichitr N., Anti-SLIP1-reactive proteins exist on human spermatozoa and are involved in zona pellucida binding. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001, 7, 633-640.
- Richardson R.T., Yamasaki N. & O'Rand M.G., Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev. Biol.*, 1994, 165, 688-701.
- Shabanowitz R.B. & O'Rand M.G., Molecular changes in the human zona pellucida associated with fertilization and human sperm-zona interactions. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1988, 541, 621-632.
- Sinowatz F., Wessa E., Neumüller C. & Palma G., On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Domest. Anim.*, 2003, 38, 141-146.
- Spargo S.C. & Hope R.M., Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol. Reprod.*, 2003, 68, 358-362.
- Stein K.K., Go J.C., Lane W.S., Primakoff P. & Myles D.G., Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics*, 2006, 6, 3533-3543.
- Sullivan R., Legare C., Villeneuve M., Foliguet B. & Bissonnette F., Levels of P34H, a sperm protein of epididymal origin, as a predictor of conventional *in vitro* fertilization outcome. *Fertil. Steril.*, 2006, 85, 1557-1559.
- Swanson W.J. & Vacquier V.D., The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3, 137-144.
- Swanson W.J., Nielsen R. & Yang Q., Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 2003, 20, 18-20.
- Swanson W.J., Yang Z., Wolfner M.F. & Aquadro C.F., Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 2509-2514.
- Talbot P., Shur B.D. & Myles D.G., Cell adhesion and fertilization : steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.*, 2003, 68, 1-9.
- Tanii I., Oh-oka T., Yoshinaga K. & Toshimori K. A mouse acrosomal cortical matrix protein, MC41, has ZP2-binding activity and forms a complex with a 75-kDa serine protease. *Dev. Biol.*, 2001, 238, 332-341.
- Tulsiani D.R., Skudlarek M.D. & Orgebin-Crist M.C., Human sperm plasma membranes possess alpha-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol. Reprod.*, 1990, 42, 843-858.
- Vieira A. & Miller D.J., Gamete interaction : is it species-specific? *Mol. Reprod. Dev.*, 2006, 73, 1422-1429.
- Wassarman P.M., Mammalian fertilization : molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, 1999, 96, 175-183.
- Wassarman P.M., Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J. Med.*, 2002, 69, 148-155.
- Wassarman P.M. & Litscher E.S., Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 1995, 30, 1-19.
- Wyckoff G.J., Wang W. & Wu C-I., Rapid evolution of male reproductive genes in the descent of man. *Nature*, 2000, 403, 304-308.
- Wright R.M., John E., Klotz K., Flickinger C.J. & Herr J.C., Cloning and sequencing of cDNAs coding for the human intra-acrosomal antigen SP-10. *Biol. Reprod.*, 1990, 42, 693-701.
- Yanagimachi R., Mammalian fertilization. In Knobil E. & Neill J.D. (eds) *The Physiology of Reproduction*. 1994, 2nd edn., Raven Press Ltd, New York, 189-317.
- Yonezawa N., Kanai S. & Nakano M., Structural significance of N-glycans of the zona species-selective recognition spermatozoa between pig and cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2007, 63, 217-228.
- Yurewicz E.C., Sacco A.G., Gupta S.K., Xu N. & Gage D.A., Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 7488-7494.
- Zhu X. & Naz R.K., Fertilization antigen-1 : c DNA cloning, testis-specific expression, and immunocontraceptive effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 4704-4709.
- Zouari R. & De Almeida M., Effect of sperm-associated antibodies on human sperm ability to bind to zona pellucida and to penetrate zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Immunol.*, 1993, 24, 175-186.