

L'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ ovocytaire et spermatique dans l'interaction gamétique

Ahmed ZIYYAT^{1, 2}, Virginie BARRAUD-LANGE^{1, 2}, Jean-Philippe WOLF^{1, 2},

1 Université Paris Descartes, Institut Alfred Jost, laboratoire " Interaction Gamétique et Fusion des Membranes ", Paris

2 Hôpital Cochin, Service d'Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction, CECOS, Paris

RÉSUMÉ

Des tests d'inhibitions ont permis de proposer l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ comme le récepteur du spermatozoïde sur l'ovocyte mais des expériences d'inactivation de gène ont montré que les sous unités intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ ovocytaires n'étaient pas essentielles à la fécondation. En utilisant le Western blot et l'immunofluorescence (cytométrie de flux et microscopie), nous avons montré que l' $\alpha 6 \beta 1$ est exprimée par les spermatozoïdes de souris. Comme pour l'ovocyte, un anticorps anti- $\alpha 6$ (GoH3) inhibe spécifiquement les capacités fécondantes des spermatozoïdes.

En comparant des tests de fusion avec des ovocytes intacts (avec zone pellucide) ou des ovocytes dépellucidés, nous avons montré que la dépellucidation court-circuite la fonction de l' $\alpha 6 \beta 1$ dans le processus d'adhésion/fusion des gamètes. L' $\alpha 6 \beta 1$ est donc exprimée et fonctionnelle sur les deux gamètes au cours de l'interaction de leur membranes.

Nos résultats, ceux des expériences utilisant des ovocytes mutés systématiquement inséminés avec des spermatozoïdes de souris sauvages, ainsi que ceux des myoblastes qui sont incapables de fusionner entre eux lorsqu'ils sont mutés pour la sous-unité intégrine $\beta 1$ alors qu'ils le font avec des myoblastes sauvages, nous conduisent à formuler l'hypothèse selon laquelle la présence de la sous-unité intégrine $\beta 1$ sur une seule des deux membranes suffit pour que la fusion ait lieu. Cette hypothèse est renforcée par un phénomène d'échange de fragments membranaires entre les gamètes juste avant leur fusion que nous avons décrits tout récemment.

Mots clés : fécondation, spermatozoïde, ovocyte, intégrine

I. INTRODUCTION

La fécondation résulte de la fusion des deux gamètes mâle et femelle. Le processus de cette fusion a été décrit par le biais de la microscopie électronique. Un spermatozoïde parvient, le premier, à franchir la zone pellucide (ZP), matrice acellulaire composée de glycoprotéines, puis il pénètre dans l'espace périvitellin et s'accroche par son segment équatorial à la zone microvillaire de la membrane plasmique de l'ovocyte appelée oolemme. La fusion débute ensuite entre l'oolemme et la zone post-acrosomique de la tête spermatique. L'intégralité du spermatozoïde est alors incluse dans le cytoplasme ovocytaire. Il s'agit donc d'une fusion entre deux cellules différentes (hétérologues) et dont le mécanisme peut être rapproché de celui de la fusion des virus avec les cellules épithéliales.

Les anomalies de la fusion gamétique entraînent des stérilités encore aujourd'hui inexplicables. Comprendre le mécanisme de cette fusion est donc un enjeu essentiel pour la connaissance et le traitement de ces infertilités. C'est de plus un modèle sans autres interférences cellulaires pour étudier les processus de la fusion cellulaire car l'ovocyte est contenu dans sa zone pellucide, que seul un spermatozoïde est capable de traverser.

Les mécanismes moléculaires de l'adhésion et de la fusion gamétique restent à ce jour à élucider. Toutefois, plusieurs familles de protéines exprimées à la surface de l'ovocyte et du spermatozoïde, dont les intégrines, les tétraspanines, et les ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) ont été impliquées dans la fusion membranaire des gamètes [35, 31]. Sur l'ovocyte, seule la tétraspanine CD9 s'est avérée

Correspondance :

Pr Jean-Philippe WOLF - Hôpital Cochin, Service d'Histologie Embryologie Biologie de la Reproduction, CECOS. 123, Boulevard Port Royal, 75014 Paris, France - Tel +33 (0)1 58 41 11 71 - Fax +33 (0)1 58 41 15 65 - Email jean-philippe.wolf@cch.aphp.fr

essentielle à la fusion gamétique [20, 22, 24]. Sur le spermatozoïde il a été démontré récemment que la protéine spermatique Izumo, appartenant à la famille des immunoglobulines, est elle aussi essentielle à cette fusion [18]. En dehors de ces deux molécules, dont le caractère essentiel du rôle a été clairement démontré, les autres molécules étudiées voient leurs rôles discutés dans la littérature : rôle direct ou indirect ? Rôle partiel ? Rôle redondant ? Parfois les travaux ont abouti à des résultats contradictoires, c'est notamment le cas concernant le rôle de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$.

Les intégrines sont des protéines transmembranaires impliquées dans les liaisons cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Elles sont composées de deux sous-unités α et β qui s'associent par des liaisons non covalentes. Au moins 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées [9]. Elles peuvent s'associer dans plus de 20 combinaisons différentes. Les intégrines ne sont toutefois pas uniquement des protéines d'ancrage dont le rôle serait exclusivement mécanique. Ce sont également des récepteurs membranaires qui, activant des signaux intracellulaires, sont capables d'organiser le cytosquelette. En plus du pouvoir transducteur de signaux, les intégrines peuvent être la cible de signaux intracellulaires activateurs ou désactivateurs.

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs groupes cherchent à identifier les partenaires ovocytaires et spermatiques responsables de l'adhésion et de la fusion des gamètes, d'ailleurs sans distinction claire entre ces deux étapes pourtant successives et essentielles à toute fusion membranaire. Au cours de cette revue, et en se focalisant sur le seul exemple de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$, nous verrons la contradiction des données de la littérature que nous analyserons et qui seront, très probablement, à l'origine de l'élucidation de ces mécanismes dans le futur. Enfin, nous proposerons quelques hypothèses et perspectives susceptibles de contribuer à une meilleure compréhension du rôle de cette molécule dans l'interaction gamétique.

II. L'INTÉGRINE $\alpha 6 \beta 1$ OVOCYTAIRE EST IMPLIQUÉE DANS L'INTERACTION GAMÉTIQUE

Les ovocytes non fécondés de souris expriment les messagers des sous unités intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ ainsi que les protéines correspondantes à leur surface [34, 17, 10]. L'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ a été identifiée comme le récepteur de la fertiline β de souris [1, 5] et des spermatozoïdes sont capables de se lier à des cellules somatiques transfectées exprimant l'hétérodimère $\alpha 6 \beta 1$ [1]. Des protéines ovocytaires membranaires marquées à la biotine se lient aux spermatozoïdes et inhibent la fusion des gamètes. Une expérience d'immunodéplétion avec un anticorps anti- $\alpha 6$ (GoH3) a révélé que la protéine ovocytaire responsable de cette inhibition était la sous unité $\alpha 6$ des intégrines [33]. De plus, la sous unité $\beta 1$ se lie à la tétraspanine CD9 [28], exprimée notamment dans l'ovocyte et dont l'inactivation chez la souris cause la stérilité des femelles par incapacité des ovocytes de fusionner avec les spermatozoïdes [20, 22, 24].

Récemment, nous avons montré que la clusterisation de

l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ ovocytaire au moment de l'interaction est sous le contrôle de la tétraspanine CD9 [36]. L'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ est largement confinée aux microvillosités de l'ovocyte dans la zone d'interaction, puis de fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte [34]. Très récemment, une équipe américaine a montré, d'une part, par microscopie électronique, que les microvillosités ovocytaires étaient enrichies en CD9 et d'autre part, que les ovocytes de souris délétées pour le *cd9*, incapables de fusionner, présentaient une altération de l'organisation de leurs microvillosités [29]. Ces données suggèrent une implication de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ ovocytaire dans le processus de fécondation, vraisemblablement en coopération avec d'autres protéines dont la tétraspanine CD9 connue précisément pour son rôle d'organisateur de complexe moléculaire [27] et notamment sur l'ovocyte [6, 32].

Face à cette intégrine ovocytaire, les spermatozoïdes expriment à leur surface des protéines ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) capables d'interagir, par leur motif disintégrine, avec les intégrines. La fertiline β ou ADAM2 se lie spécifiquement à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ et son invalidation empêche l'adhésion et donc la fusion entre les membranes des deux cellules [7, 5]. Des billes recouvertes de domaines disintégrines de l'ADAM3 (cyritestine) se lient à la surface des ovocytes de souris et cette liaison est inhibée par un anticorps anti- $\alpha 6$ (GoH3) [4, 32].

Chez l'humain aussi, l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ ovocytaire semble impliquée dans les mécanismes d'interaction et de fusion gamétiques puisque des anticorps monoclonaux anti- $\beta 1$ ou anti- $\alpha 6$ inhibent partiellement le taux de fécondation et le nombre de spermatozoïdes fusionnés avec l'ovocyte dépellucidé [19, 36].

III. L'INTÉGRINE $\alpha 6 \beta 1$ OVOCYTAIRE N'EST PAS ESSENTIELLE À L'INTERACTION GAMÉTIQUE

En nombre, il existe moins de travaux attestant la non implication de l' $\alpha 6 \beta 1$ dans l'interaction gamétique que de travaux affirmant le contraire. Seuls ces derniers apportent des preuves génétiques solides. En effet, l'inactivation du gène ovocytaire codant la sous-unité $\alpha 6$ n'a pas d'effet sur la fécondabilité des ovocytes.

Parce que l'inactivation totale du gène de la sous-unité $\alpha 6$ cause la mortalité des souriceaux juste après leur naissance, Miller et al. ont opéré d'une manière très élégante, en prélevant les ovaires des femelles dans l'heure suivant leur naissance et en les transplantant sous les capsules rénales de souris porteuses sauvages dont les ovaires ont été enlevés [8, 23]. Après 3 à 4 semaines de maturation des ovaires et une première stimulation hormonale (PMSG) de ces souris deux jours avant le prélèvement, ils ont réussi à obtenir des ovocytes au stade de vésicule germinative qu'ils ont ensuite fait maturer *in vitro* afin d'obtenir des métaphases II entièrement dépourvus d' $\alpha 6$. Lorsque ceux-ci sont inséminés *in vitro*, ils fécondent normalement [23].

Ce résultat laissait penser à une possible redondance dans la fonction des intégrines d'autant plus que plusieurs autres sous-unités, notamment celles se liant à la sous unité $\beta 1$ sont exprimées à la surface de l'ovocyte. En utilisant le

système Cre-Lox, He et al. ont généré des souris dont seules les ovocytes étaient dépourvus de la sous unité $\beta 1$ des intégrines. Ils ont ensuite montré que ces ovocytes étaient parfaitement fécondables *in vivo* et *in vitro*. Le même constat était fait avec des ovocytes n'exprimant plus la sous unité $\alpha 3$. Des expérimentations combinant des tests d'inhibition avec des anticorps anti- $\beta 3$ ou anti-av et les ovocytes invalidés pour une autre sous unité leur ont permis d'affirmer qu'aucune de ces intégrines n'était essentielle à la fusion des gamètes [14].

En outre, même si l'invalidation du gène de la fertiline β , ligand potentiel de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$, diminue nettement la fertilité (*in vivo*), elle n'empêche pas la fixation des spermatozoïdes à la membrane plasmique des ovocytes et leur fusion [7].

IV. L'INTÉGRINE $\alpha 6\beta 1$ SPERMATIQUE ET LE MODÈLE DES MYOBLASTES

Ces contradictions de la littérature appellent une explication qui pourrait contribuer à l'élucidation du rôle que joue, ou ne joue pas, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ dans l'interaction gamétique. A la lecture de l'article publié par Almeida *et al.* en 1995 [1], nous avons remarqué que l'anticorps anti- $\alpha 6$ (GoH3) était mis pendant la fécondation *in vitro* alors que les deux gamètes étaient présents.

L'action de l'anticorps sur l'intégrine ovocytaire, dont l'expression était démontrée, semblait évidente alors que celle sur le sperme était exclue parce que l'expression de cette intégrine par le spermatozoïde de souris n'était pas «encore» démontrée.

Un autre travail sur la fusion membranaire dans un autre modèle cellulaire nous a interpellé. Celui des cellules myogéniques dont la fusion entraîne la constitution des myotubes et où les mêmes familles de molécules d'adhésion, que celles impliquées dans la fusion gamétique, interviennent. Il s'agit de l'ADAM 12 et de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$. Les myoblastes mutés, n'exprimant pas la sous-unité intégrine $\beta 1$, ne fusionnent plus entre eux pour former des myotubes, mais sont capables de fusionner avec des cellules myoblastiques sauvages. La présence de la sous-unité intégrine $\beta 1$ sur une seule des deux membranes myoblastiques suffit pour que la fusion ait lieu [30].

Or, dans tous les tests de fusion utilisant des ovocytes mutés, ce sont systématiquement des spermatozoïdes de souris sauvages qui ont été employés et nous formulons l'hypothèse selon laquelle ce même modèle serait applicable au couple spermatozoïde/ovocyte et que la fécondance des ovocytes $\alpha 6^{-/-}$ ou $\beta 1^{-/-}$ serait expliquée par la présence de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ sur le spermatozoïde. Une différence entre ces deux modèles de fusion empêche la transposition de cette hypothèse.

Contrairement au modèle homologue des myoblastes, les gamètes, hétérologues, n'expriment pas forcément les mêmes molécules. Pour lever cet obstacle, il fallait que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ soit exprimée par les spermatozoïdes de souris.

V. LA DÉPELLUCIDATION OVOCYTAIRE

COURT-CIRCUITE LE RÔLE DE L' $\alpha 6\beta 1$ DANS L'INTERACTION GAMÉTIQUE

Par ailleurs, nous avons montré que le modèle habituellement utilisé pour tous les tests de fécondance, à savoir le modèle de l'ovocyte dépellucidé présentait des biais majeurs [36, 3]. En effet, même si ce modèle présente l'avantage de pouvoir étudier directement l'interaction des membranes sans aucune interférence, la dépellucidation induit en soi des modifications importantes de la membrane ovocytaire dont le mécanisme est encore non élucidé. Ces biais conduisent à court-circuiter certaines étapes de l'interaction des membranes gamétiques.

Nous avons ainsi montré, dans un premier temps, que les anticorps anti-CD9 inhibaient la fusion des gamètes humains lorsqu'ils étaient introduits dans le milieu avant et pendant la dépellucidation, mais pas lorsqu'ils l'étaient après. Nous avons observé, entre autres, que cette dépellucidation entraînait une modification de la localisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ ovocytaire avec la formation de patches membranaires, alors que cette intégrine est distribuée de manière homogène sur les ovocytes intacts. L'anticorps anti-CD9 inhibe la relocalisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ ainsi que la fécondation suggérant que les deux phénomènes sont liés [36].

Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'anticorps anti- $\alpha 6$ (GoH3) n'avait plus d'effet sur les ovocytes de souris lorsque ceux-ci étaient déjà dépellucidés puisque cette dépellucidation provoquait la clusterisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ comme le fait l'interaction avec le spermatozoïde. L'effet de l'anticorps était donc court-circuité par la dépellucidation car celle-ci plaçait l'ovocyte à une étape ultérieure à celle de l'action de l'anticorps [3]. Or, dans la majorité des publications faisant état d'un effet inhibiteur de cet anticorps sur la fécondation chez la souris, d'une part les ovocytes étaient dépellucidés et d'autre part l'anticorps était présent pendant l'insémination. Un effet sur les spermatozoïdes devenait alors très probable.

VI. LES SPERMATOZOÏDES DE SOURIS COMME LES SPERMATOZOÏDES HUMAINS EXPRIMENT L'INTÉGRINE $\alpha 6\beta 1$ À LEURS SURFACES ET CELLE-CI EST IMPLIQUÉE DANS L'INTERACTION GAMÉTIQUE

Notre hypothèse était renforcée par le fait que non seulement l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ sur le spermatozoïde humain ait déjà été décrite [11, 12, 13] mais qu'en plus le pouvoir fécondant des spermatozoïdes s'était révélé corrélé à cette expression [21, 16, 25, 26].

Nous avons ainsi montré par cytométrie, immunofluorescence et western blot que le spermatozoïde de souris exprime également l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ et que des anticorps dirigés contre l'une ou l'autre sous unité inhibent la fusion des gamètes lorsque celle-ci est réalisée en cumulus intact. En pré-incubant séparément les gamètes, nous avons constaté que l'effet des anticorps médié par les spermatozoïdes était plus important que celui médié par les ovocytes. De plus, lorsque les ovocytes sont dépellucidés, ne persiste que l'effet des anticorps sur les spermatozoïdes comme nous l'avions

suggéré [3]. L'ensemble de ces résultats remet en question les interprétations précédentes à propos du rôle des intégrines dans la fusion des gamètes.

La présence effective de cette intégrine à la surface des deux gamètes rend alors plausible l'hypothèse selon laquelle sa présence sur une des deux membranes suffit pour la réalisation de la fusion. Ceci suppose que cette molécule serait nécessaire par sa présence au sein d'un complexe moléculaire commun aux deux membranes indiquant par là-même que cette protéine ne serait pas essentielle à la première phase d'interaction et d'adhésion entre les deux gamètes, du moins pas des deux côtés.

Une seconde hypothèse non exclusive vient s'ajouter à celle-ci, en effet nous venons de rapporter un phénomène qui a lieu entre les gamètes juste avant la fusion. Il s'agit d'un échange de fragments membranaires de l'ovocyte vers le spermatozoïde lorsque celui-ci est dans l'espace périvitellin [2]. Par cet événement, le spermatozoïde récupère des protéines membranaires ovocytaires dont il est, pour certaines, complètement dépourvu. C'est notamment le cas de la tétraspanine CD9 qui pourrait jouer un rôle d'organisateur de complexes moléculaires spermatiques qui viendraient faire face à ceux existant sur le versant ovocytaire et dont la relocalisation est contrôlée par CD9 [36]. Il est donc possible que le spermatozoïde puisse récupérer de la sous unité $\beta 1$ à partir de l'ovocyte, voire d'une cellule du tractus génital ou de la corona.

En utilisant des marqueurs membranaires fluorescents, nous avons montré que ce transfert ne concerne pas uniquement quelques protéines membranaires ovocytaires telle que CD9 mais des fragments membranaires entiers [2]. Sachant que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ interagit avec CD9 [27, 28, 15, 36], il est fort possible qu'elle soit concernée par ces échanges membranaires. Après quoi, il faudra vérifier si cet échange membranaire est bidirectionnel, c'est-à-dire si le spermatozoïde aussi est capable de léguer des fragments membranaires à l'ovocyte. Ce qui permettrait d'expliquer la fusion des gamètes lors d'une invalidation unilatérale d'un gène exprimé par les deux gamètes. Ce qui est notamment le cas de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ [3].

VII. CONCLUSION

La réponse directe et formelle quant à la validité de notre hypothèse selon la quelle la présence de la sous-unité $\beta 1$ sur l'un ou l'autre des gamètes suffit pour que la fusion des deux ait lieu viendra de l'invalidation conditionnelle et bilatérale, aux niveaux des ovocytes et des spermatozoïdes, des gènes de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$.

Une telle confirmation suggérerait d'une part, que le mécanisme de la fusion cellulaire serait un mécanisme commun au moins aux gamètes et aux myoblastes, et d'autre part qu'il serait intéressant de revoir certains travaux consistant en des invalidations géniques unilatérales ayant aboutit par le passé à des résultats controversés et parfois contradictoires.

REFERENCES

1. ALMEIDA E.A., HUOVILA A.P., SUTHERLAND A.E. et al. : Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*, 1995, 81 : 1095-10104.
2. BARRAUD-LANGE V., NAUD-BARRIANT N., BOMSEL M., WOLF J.P., ZIYYATA A. : Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *Faseb J.*, 2007, 21: 3446-3449.
3. BARRAUD-LANGE V., NAUD-BARRIANT N., SAFFAR L. et al. : Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC Dev. Biol.*, 2007, 7 : 102.
4. BIGLER D., TAKAHASHI Y., CHEN M.S., ALMEIDA E.A., OSBOURNE L., WHITE J.M. : Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 11576-11584.
5. CHEN H., SAMPSON N.S. : Mediation of sperm-egg fusion : evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilinbeta. *Chem. Biol.*, 1999, 6 : 1-10.
6. CHEN M.S., TUNG K.S., COONROD S.A. et al. : Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1 : implications for murine fertilization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, 96 : 11830-11835.
7. CHO C., BUNCH D.O., FAURE J.E. et al. : Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science*, 1998, 281 : 1857-1859.
8. COX S.L., SHAW J., JENKIN G. : Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *J. Reprod. Fertil.*, 1996, 107 : 315-322.
9. EVANS J.P. : The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum. Reprod. Update*, 2002, 8 : 297-311.
10. EVANS J.P., SCHULTZ R.M., KOPF G.S. : Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, 40 : 211-220.
11. FUSI F.M., VIGNALI M., BUSACCAM., BRONSON R.A. : Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1992, 31 : 215-222.
12. GLANDER H.J., SCHALLER J. : Beta 1-integrins of spermatozoa : a flow cytophotometric analysis. *Int. J. Androl.*, 1993, 16 : 105-111.
13. GLANDER H.J., SCHALLER J., WEBER W., ALEXANDER H., HAAKE K.W. : In vitro fertilization: increased VLA (very late antigen) integrins and fibronectin after acrosome reaction. *Arch. Androl.*, 1996, 36 : 177-185.
14. HE Z.Y., BRAKEBUSCH C., FASSLER R., KREIDBERG J.A., PRIMAKOFF P., MYLES D.G. : None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev. Biol.*, 2003, 254 : 226-237.
15. HEMLER M.E. : Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1998, 10 : 578-585.
16. HENKEL R., SCHALLER J., GLANDER H.J., SCHILL W.B. : Low expression of adhesion molecules and matrix proteins in patients showing poor penetration in zona-free hamster oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, 2 : 335-339.
17. HIERCK B.P., THORSTEINSDOTTIR S., NIESSEN C.M. et al. : Variants of the alpha 6 beta 1 laminin receptor in early murine development : distribution, molecular cloning and chromosomal localization of the mouse integrin alpha 6 subunit. *Cell Adhes. Commun.*, 1993, 1 : 33-53.
18. INOUE N., IKAWA M., ISOTANIA., OKABE M. : The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 2005, 434 : 234-238.
19. JI Y.Z., WOLF J.P., JOUANNET P., BOMSEL M. : Human gamete fusion can bypass beta1 integrin requirement. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 682-689.

ABSTRACT

Sperm and oocyte $\alpha 6 \beta 1$ integrin in gamete interaction

Ahmed ZIYYAT, Virginie BARRAUD-LANGE,
Jean-Philippe WOLF

Based on inhibition tests, the $\alpha 6 \beta 1$ integrin was suggested to be a sperm receptor, but further experiments using gene deletion techniques have shown that neither oocyte $\alpha 6$, nor $\beta 1$ integrin subunits were essential for mouse fertilization. Using Western blot analysis and immunofluorescence (flow cytometry and microscopy), we have shown that mouse sperm expresses the $\alpha 6 \beta 1$ integrin.

As for oocytes, binding of GoH3 anti-alpha6 antibody to sperm induces specific inhibition of sperm fertilizing ability. Comparing zona-intact and zona-free eggs in fusion tests, we have shown that removal of the zona pellucida bypasses the $\alpha 6 \beta 1$ integrin role in the adhesion/fusion process of oocyte fertilization. The $\alpha 6 \beta 1$ integrin is expressed by both gametes and is functional during their membrane interactions.

Our results, previous reports on fertilization of $\alpha 6$ or $\beta 1$ integrin subunit-deleted oocytes by wild-type sperm and the fusion ability of $\beta 1$ mutant myoblasts when they were co-cultured with wild-type myoblasts suggest that the presence of $\alpha 6 \beta 1$ integrin on one of the two gamete membranes can rescue the fertilization process. This hypothesis is further supported by the recently reported exchange of membrane fragments occurring between gametes prior to fusion.

Key words : fertilization, sperm, oocyte, integrin, zona pellucida

20. KAJI K., ODA S., SHIKANO T. et al. : The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.*, 2000, 24 : 279-282.
21. KLENTZERIS L.D., FISHEL S., MCDERMOTT H., DOWELL K., HALL J., GREEN S. : A positive correlation between expression of beta 1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 728-733.
22. LE NAOUR F., RUBINSTEIN E., JASMIN C., PRENANT M., BOUCHEIX C. : Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 2000, 287 : 319-321.
23. MILLER B.J., GEORGES-LABOUESSE E., PRIMAKOFF P., MYLES D.G. : Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J. Cell. Biol.*, 2000, 149 : 1289-1296.
24. MIYADO K., YAMADA G., YAMADA S. et al. : Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, 2000, 287 : 321-324.
25. REDDY K.V., MEHERJI P.K., SHAHANI S.K. : Integrin cell adhesion molecules on human spermatozoa. *Indian J. Exp. Biol.*, 1998, 36 : 456-463.
26. REDDY V.R., RAJEEV S.K., GUPTA V. : Alpha 6 beta 1 Integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. *Fertil. Steril.*, 2003, 79 Suppl 3 : 1590-1596.
27. RUBINSTEIN E., LE NAOUR F., LAGAUDRIERE-GESBERT C., BILLARD M., CONJEAUD H., BOUCHEIX C. : CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur. J. Immunol.*, 1996, 26 : 2657-2665.
28. RUBINSTEIN E., POINDESSOUS-JAZAT V., LE NAOUR F., BILLARD M., BOUCHEIX C. : CD9, but not other tetraspans, associates with the beta1 integrin precursor. *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27 : 1919-1927.
29. RUNGE K.E., EVANS J.E., HE Z.Y. et al. : Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev. Biol.*, 2007, 304 : 317-325.
30. SCHWANDER M., LEU M., STUMM M. et al. : Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell*, 2003, 4 : 673-685.
31. SNELL W.J., WHITE J.M. : The molecules of mammalian fertilization. *Cell*, 1996, 85 : 629-637.
32. TAKAHASHI Y., BIGLER D., ITO Y., WHITE J.M. : Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs : role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12 : 809-820.
33. TAKAHASHI Y., YAMAKAWA N., MATSUMOTO K., TOYODA Y., FURUKAWA K., SATO E. : Analysis of the role of egg integrins in sperm-egg binding and fusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 56 : 412-423.
34. TARONE G., RUSSO M.A., HIRSCH E. et al. : Expression of beta 1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte. *Development*, 1993, 117 : 1369-1375.
35. YANAGIMACHI R. : Fertility of mammalian spermatozoa : its development and relativity. *Zygote*, 1994, 2 : 371-372.
36. ZIYYAT A., RUBINSTEIN E., MONIER-GAVELLE F. et al. : CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha6beta1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J. Cell. Sci.*, 2006, 119 : 416-424.

Manuscrit reçu : décembre 2007 ; accepté mars 2008.

Bourse SALF 2006.