

# Radicaux libres et spermatozoïdes humains : physiologie et physiopathologie

J. F. GRIVEAU ET D. LE LANNOU

*CECOS d. l'Ouest, 1 bis rue de la cochardière, 35000 Rennes, France*

## RESUME

La mise en évidence de la toxicité de l'oxygène et de ses dérivés sur certaines fonctions du spermatozoïde humain apporte un éclairage nouveau dans le champ des explorations de la fertilité masculine. Des dérivés oxygénés sont détectés dans 40 % des spermatozoïdes provenant d'hommes inféconds. Du fait de la teneur importante de leurs membranes en acides gras polyinsaturés, les spermatozoïdes humains sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique. Il existe deux sources majeures de dérivés oxygénés dans l'éjaculat, les spermatozoïdes eux mêmes et les leucocytes infiltrés dans le plasma séminal. Leur production dans l'éjaculat est corrélée de manière négative avec le potentiel de fécondation des spermatozoïdes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Si l'anion superoxyde apparaît comme le produit primaire du système générateur de dérivés oxygénés dans le sperme, le peroxyde d'hydrogène semble être le principal responsable des effets cytotoxiques engendrés par leur production excessive dans l'éjaculat. Cependant, à côté des effets potentiellement néfastes des dérivés oxygénés, il pourrait exister une production physiologique, contrôlée et bénéfique d'espèces radicalaires dans le sperme. A la fois l'anion superoxyde et le peroxyde

**d'hydrogène pourraient être nécessaires au processus de capacitation et / ou de réaction acrosomique.**

*Mots clés : radicaux libres - dérivés oxygénés - peroxydation lipidique - spermatozoïdes*

## INTRODUCTION

L'oxygène fut découvert dans l'air par le chimiste anglais Joseph Priestley en 1774. La mise en évidence de l'implication de ses dérivés dans la physiopathologie des spermatozoïdes a récemment apporté un éclairage nouveau dans le champ des explorations de la fertilité humaine. Molécule indispensable à la vie de la plupart des animaux et des plantes qui produisent leur énergie par l'oxydation de molécules biologiques au cours de la respiration, elle est également potentiellement nocive. Dans certaines conditions, en effet, l'oxygène initialement inerte, peut réagir avec des molécules organiques grâce à des processus biochimiques qui conduisent à la formation d'intermédiaires très réactifs, les radicaux libres. D'une durée de vie extrêmement courte (10-11 à 10-9 s), les radicaux libres sont des espèces atomiques ou moléculaires possédant au moins un électron non apparié sur leur orbitale la plus externe. Produits de façon permanente au sein de la matière vivante, ils réagissent très rapidement avec la plupart des composés organiques afin de stabiliser leurs structures électroniques. Dans ces réactions, les radi-

caux libres peuvent se comporter comme des oxydants (gain d'électron) ou comme des réducteurs (perte d'électron). Une réaction en chaîne est alors amorcée provoquant la modification de certaines structures biologiques et particulièrement celles riches en acides gras polyinsaturés (AGPI). Parmi les théories du vieillissement et de certaines pathologies, celles faisant intervenir une production excessive ou anormale de radicaux libres occupent aujourd'hui une place privilégiée. Selon Harman, le vieillissement serait un phénomène d'usure comparable à l'érosion d'un métal qui s'oxyde. Au niveau du spermatozoïde humain, Iwasaki et Gagnon ont récemment montré [40] que dans une population de patients consultant pour infertilité, des dérivés oxygénés étaient détectés dans 40 % des cas. McLeod fut le premier en 1943 à associer la toxicité de l'oxygène à une perte de mobilité du sperme humain, mais ce n'est que 30 ans plus tard, en 1973, que Jones et Mann suggérèrent un rôle possible d'une peroxydation lipidique dans l'étiologie de certaines de ses dysfonctions. Depuis un certain nombre d'études ont confirmé l'importance des dérivés oxygénés dans la diminution des compétences fonctionnelles des spermatozoïdes [43, 5, 7, 4, 9, 13, 12, 26, 29, 37, 39] ainsi que de ses capacités fécondantes aussi bien *in vitro* [4-6] qu'*in vivo* [10]. Cette sensibilité des spermatozoïdes humains au "stress" oxydatif serait en grande partie due à la richesse de leurs membranes en substrats oxydables que sont les AGPI [42] ainsi qu'à l'efficacité limitée de leurs systèmes de défenses antioxydantes. Cependant, à côté des effets potentiellement néfastes des dérivés oxygénés, une production physiologique, contrôlée et bénéfique d'espèces radicalaires pourrait exister dans l'éjaculat. Ce nouveau concept est le fait d'études très récentes montrant que les dérivés oxygénés pourraient intervenir de manière physiologique dans les deux grandes fonctions du spermatozoïde, la fonction cinétique qui va lui permettre de

migrer dans les voies génitales féminines et de traverser les couches périovocytaires et la fonction fusiogène qui nécessite la fixation à la zone pellucide, puis sa traversée avant la fusion des deux membranes gamétiques [7, 18, 27, 28, 36, 38].

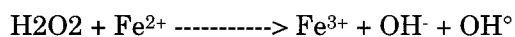
## NATURE DES DERIVES OXYGENES

L'étude de la structure électronique de la molécule d'oxygène a permis de comprendre comment les mécanismes normalement destinés à favoriser sa réaction avec les molécules organiques entraînent parfois sa toxicité. La présence de deux électrons célibataires ayant des "spins" parallèles dans sa structure électronique lui permet d'accepter un électron, le transformant ainsi en anion superoxyde ( $O_2^-$ ).

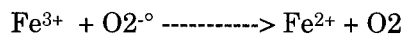
La production d'anion superoxyde *in vivo* est continue et directement liée au métabolisme de l'oxygène. Il existe deux sources majeures d'anion superoxyde dans le sperme, les spermatozoïdes eux-mêmes [3, 5, 11, 13, 40] et les leucocytes, macrophages et neutrophiles, présents dans le plasma séminal [3, 11, 43, 47, 40]. L'origine de la production excessive d' $O_2^-$  par les spermatozoïdes est encore mal connue. Elle pourrait être due à une NADPH oxydase localisée dans la membrane plasmique [2] ou bien encore provenir d'une diaphorase mitochondriale (une NADH oxydo-réductase). Faible en conditions physiologiques, cette production est accrue de manière importante dans les oligoasthénospermies [3, 8] ou après stimulation par le calcium ionophore A23187 ou des esters de phorbol [3, 5, 7]. La centrifugation répétée de spermatozoïdes non sélectionnés entraîne également une augmentation de 20 à 50 fois des taux de dérivés oxygénés dans le sperme [6, 40]. Inversement, la sélection des spermatozoïdes sur gradient de Percoll permet de réduire très significativement leurs taux dans les fractions de haute densité [6, 9, 40].

La présence de radicaux superoxydes dans les tissus vivants peut ensuite entraîner l'apparition de molécules à fort pouvoir oxydant. Produit au niveau du micro-environnement que constitue l'interface de la membrane lipidique hydrophobe et le milieu où les charges négatives de surface entraînent une chute de pH de 3 à 4 unités, l'anion superoxyde est converti sous sa forme acide conjuguée HO<sub>2</sub> et réagit très rapidement avec les acides gras polyinsaturés pour former des hydroperoxydes [16]. En présence de protons, l'anion superoxyde subit un processus de dismutation spontanée et lente qui aboutit à la formation de molécules non radicalaires, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) relativement stable, et une molécule d'oxygène. Une part importante de l'oxygène produit au cours de cette réaction est constituée d'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) [25]. L'oxygène singulet n'est pas une espèce radicalaire mais une molécule en état d'excitation qui se comporte comme un radical libre. La présence sur l'orbitale atomique externe d'un doublet électronique ayant des "spins" anti-parallèles lui permet de réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes avec formation intermédiaire d'autres espèces radicalaires.

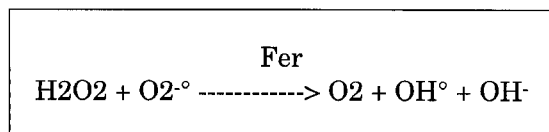
En présence de métaux de transition, le peroxyde d'hydrogène se décompose selon la réaction de Fenton (34) pour donner naissance au radical hydroxyle (OH°) :



Pour que cette réaction puisse se poursuivre, le Fe<sup>3+</sup> doit être réduit :



L'ensemble de ces deux réactions constitue le bilan d'Haber-Weiss :



Le radical hydroxyle est connu comme étant le radical libre le plus réactif. Sa

durée de vie est de l'ordre de 10-11 secondes, et les études faites *in vitro* montrent qu'il réagit instantanément sur les lieux mêmes de sa production avec les molécules biologiques. Les métaux de transition (fer, cuivre, cobalt, aluminium, manganèse) catalysent efficacement la réaction d'Haber-Weiss en réagissant aussi bien sur des peroxydes d'hydrogène que sur des lipoperoxydes. Leur disponibilité est l'une des conditions principales de la formation de radicaux libres et de la peroxydation *in vivo*. Le fer est sans aucun doute le métal le plus impliqué dans ces réactions. Cependant, dans l'organisme, il se trouve généralement complexé sous forme Fe<sup>3+</sup> à des éléments protéiques tels que la ferritine ou la lactoferrine ; dans des conditions physiologiques, il ne peut donc pas induire de manière importante la formation de radical hydroxyle ni initier la peroxydation. Cependant, des dosages de ferritine, de fer et de cuivre chez l'homme laissent penser qu'une part importante de ces métaux se trouvent à l'état libre dans le plasma sérial [48]. Ils seraient alors disponibles pour initier les chaînes de peroxydation. De plus, l'anion superoxyde produit de façon endogène par le spermatozoïde stimulerait le relargage du fer de la ferritine intracellulaire [17] et aurait également la capacité de réduire le fer lié à la transferrine en ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>), [48]. Le fer ferreux peut également réagir facilement avec l'oxygène pour former l'ion perferryl, qui, de par sa relative stabilité peut atteindre des sites distants de son lieu de formation où il se décompose en ion ferryl qui lui-même en présence d'eau se décompose instantanément en radical hydroxyle.

### MOYENS DE DEFENSE NATURELS

Cette production de radicaux libres, parfois excessive et potentiellement dangereuse est limitée par différents systèmes de régulation. Ces systèmes de défense, enzymatiques et non enzymatiques, assurent le

maintien d'un équilibre entre la production des espèces radicalaires et leur élimination, et permettent de faire face aux différentes étapes du processus peroxydatif. Leur efficacité demande une coopération permanente de différents systèmes ayant chacun une localisation et des cibles qui lui sont spécifiques.

## 1. Moyens enzymatiques

Trois enzymes constituent les clefs de cette protection, les superoxydes dismutases, la catalase et la glutathion peroxydase.

### a) Les superoxydes dismutases :

Ces métaloenzymes ont été décrites pour la première fois en 1969 par Mc Cord et Fridovich. La superoxyde dismutase est une enzyme cytoplasmique et mitochondriale qui accélère considérablement la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Le rôle de cette dismutation accélérée de l'anion superoxyde est d'empêcher la coexistence de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, supprimant ainsi la formation de radicaux hydroxyles ainsi que d'empêcher la réduction par l'anion superoxyde du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  nécessaire à l'initiation et l'entretien des réactions de peroxydation lipidique. Chez l'homme, deux superoxydes dismutases ont été décrites. L'une est cytosolique ; son site actif contient du cuivre et du zinc (Cu-ZnSOD), alors que l'autre est mitochondriale et renferme du manganèse (Mn-SOD). Le système des superoxydes dismutases constitue le principal mécanisme de défense des spermatozoïdes [13, 51, 53]. Il existe en effet une corrélation directe entre le maintien de la mobilité des spermatozoïdes et leur niveau d'activité SOD [13].

### b) La catalase :

L'élimination de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase s'accompagne d'une production de peroxyde d'hydrogène, qui, en présence de métaux de transition, se décompose en radicaux hydroxyles. Cette

décomposition est évitée par l'action de la catalase, localisée dans les peroxyosomes, dont le rôle est de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Son action est limitée par sa localisation exclusive dans les peroxyosomes. Bien que la présence de catalase dans le sperme humain ait été récemment montrée [41], elle apparaît être essentiellement d'origine séminale, même si une très faible activité a été trouvée dans le spermatozoïde lui-même.

### c) La glutathion peroxydase :

La glutathion peroxydase, enzyme sélénium dépendante (Se-GPX), catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes d'acides gras en utilisant le glutathion réduit (GSH) et en le transformant en glutathion oxydé (GSSG). Le système ne fonctionne que si le GSSG est continuellement régénéré en GSH. Cette réduction est assurée par une glutathion réductase en présence de NADPH. La localisation à la fois cytosolique et mitochondriale de cette enzyme lui confère une efficacité plus grande que la catalase. Dans le spermatozoïde, le système glutathion peroxydase/réductase constitue un système de défense primaire important sans lequel la superoxyde dismutase serait débordée [12].

L'un des effets pernicieux du peroxyde d'hydrogène est que, outre sa possibilité de donner naissance au radical hydroxyle, il est capable d'inhiber les activités superoxyde dismutase et glutathion peroxydase [12, 37, 56]. Il contribue ainsi à la fois à la production d'espèces radicalaires toxiques pour la cellule et en même temps à la diminution de ses défenses antioxydantes, favorisant ainsi l'initiation et la propagation d'un stress oxydatif.

## 2. Moyens non enzymatiques

Des antioxydants, plus communément appelés des "piégeurs" de radicaux libres, endogènes ou exogènes, sont susceptibles

de neutraliser ces radicaux libres et de ralentir la propagation des réactions d'oxydation. Ces systèmes de protection sont à la fois cytosoliques (glutathion, acide ascorbique) et membranaires ( $\alpha$ -tocophérol).

*a) L' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) :*

La localisation membranaire de la vitamine E, découverte en 1922 par Evans et Bishop, en fait l'antioxydant lipophile le plus efficace et le plus abondant. L'une de ses principales fonctions est de préserver l'intégrité des AGPI, en neutralisant les radicaux lipidiques ( $R^\circ$ ,  $RO^\circ$ ,  $ROO^\circ$ ) et en ralentissant la propagation de la peroxydation lipidique. La réaction implique alors un radical lipidique et un groupe hydroxyle phénolique du tocophérol pour générer un hydroperoxyde et un radical tocophéryle :



Après oxydation, la forme  $\alpha$ -tocophéryl peut être recyclée en  $\alpha$ -tocophérol par l'intermédiaire de la vitamine C [15, 24]. La vitamine E peut également agir en captant des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ou les radicaux hydroxyles [20].

*b) L'acide ascorbique (vitamine C) :*

Chez l'homme, l'acide ascorbique est exclusivement apporté par l'alimentation. En plus de son effet dans la régénération de la vitamine E, l'acide ascorbique a la capacité de piéger directement l'anion superoxyde et l'oxygène singulet [31]. Il aurait également la capacité de capter les radicaux peroxydes [15, 49], bien qu'un tel mécanisme soit infirmé par Cillard et Cillard [23].

*c) Le glutathion réduit (GSH) :*

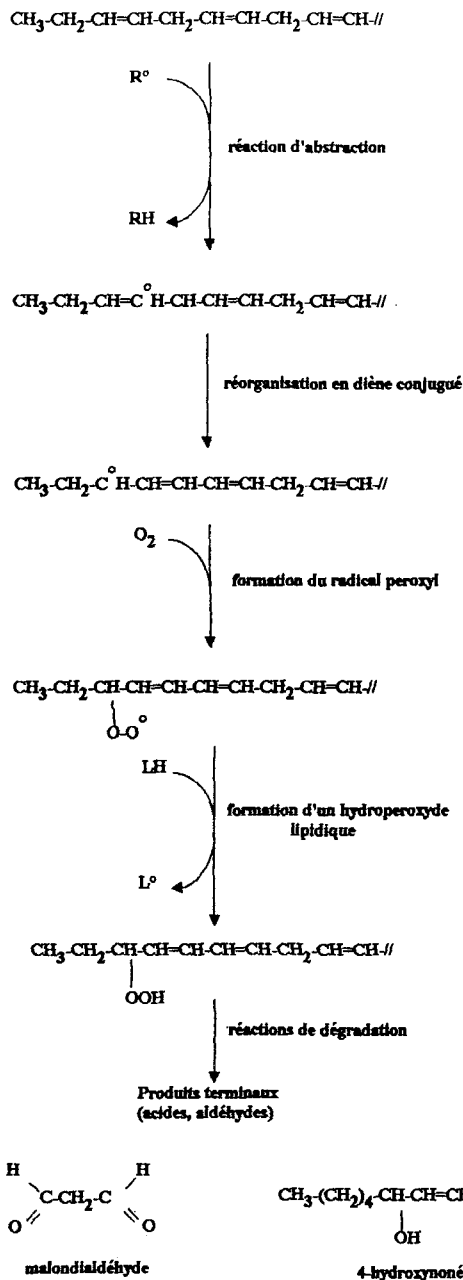
En plus de son rôle de substrat dans l'activité de la Se-GPX, le GSH peut participer de façon efficace dans la défense antiradicalaire en réagissant avec tous les radicaux libres et donner naissance à un radical thiyl ( $GS^\circ$ ). La dismutation de deux radicaux thiyls donne le glutathion oxydé qui en présence de NADPH reforme le GSH par la glutathion réductase.

*d) Antioxydants exogènes :*

Il existe de nombreux antioxydants capables de capter, de neutraliser ou de piéger les radicaux libres. Parmi les plus couramment utilisés, nous pouvons citer l'acide urique qui est un excellent chélateur du radical hydroxyl et un bon chélateur des métaux de transition ; la desferrioxamine (desferal) qui est un chélateur du fer ; les flavonoïdes qui sont des polyphénols d'origine végétale capables d'inactiver des espèces radicalaires diverses telles que l'anion superoxyde, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles [22].

### MECANISMES D'ACTION DES DERIVES OXYGENES

Lorsque les systèmes de défenses sont dépassés, la neutralisation des radicaux libres va faire intervenir d'autres systèmes cellulaires. Les dégradations radicalaires intéressent en premier lieu les structures membranaires. Cette fragilité est liée à la présence en quantité importante d'acides gras polyinsaturés dans les phospholipides constitutifs des membranes. Dans les cellules animales, les AGPI sont synthétisés à partir des acides gras essentiels tels que l'acide linoléique et l'acide linolénique apportés par l'alimentation. Des AGPI plus longs et plus insaturés sont synthétisés à partir de ces précurseurs grâce à des étapes d'élongation et de désaturation. Leur dégradation par les radicaux libres constitue le processus de lipoperoxydation. La présence de double-liaisons permet aux radicaux libres d'attaquer facilement la chaîne carbonée des AGPI pour se stabiliser, produisant ainsi un radical lipidique (Figure 1). Cette attaque constitue la première étape d'une suite de réactions en chaîne (Figure 2). Une fois la lipoperoxydation initiée, les réactions radicalaires se propagent et s'auto-amplifient du fait de la proximité des AGPI dans la structure membranaire, conduisant à sa désorganisation ainsi qu'à



**Figure 1 : Actions des radicaux libres sur les acides gras polyinsaturés.**

l'altération de ses propriétés. La présence de métaux de transition concourt également à l'amplification du processus de peroxydation lipidique en relançant de nouvelles chaînes de réaction à partir des hydroperoxydes formés. Un radical libre formé au cours de la réaction d'initiation donnerait ainsi lieu à la formation de 8 à 14

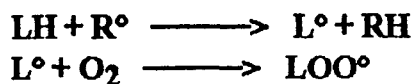
cycles de propagation. Cette chaîne de lipoperoxydation ne s'arrête que lorsque les espèces radicalaires se stabilisent en réagissant entre elles ou avec une molécule piègeuse de radicaux libres comme la vitamine E.

La dégradation peroxydative des acides gras polyinsaturés conduit à la formation de produits de dégradation dont la nature dépend de l'acide gras dégradé et/ou du système prooxydant ayant initié la lipoperoxydation. De nombreux travaux ont montré la complexité et la multiplicité des substances qui apparaissent au cours d'un phénomène lipoperoxydatif, et la prédominance des aldéhydes parmi ces substances. Le produit le plus anciennement décrit est le malondialdéhyde ( $\text{CHO-CH}_2\text{-CHO}$ ), un dialdéhyde servant très souvent à la détection et à la quantification des phénomènes lipoperoxydatifs. Sa concentration dans le sperme est inversement proportionnelle à la mobilité et à la capacité fécondante des spermatozoïdes [7, 9]. L'un des plus connus également, le 4-hydroxynonéol (4 HNE), un produit de dégradation des acides gras polyinsaturés de la série n-6 très étudié pour sa forte réactivité avec les groupements thiols et sa toxicité [32], a également été retrouvé dans le liquide séminal humain [57].

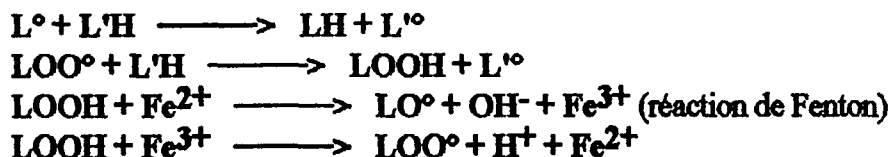
L'attaque radicalaire des acides gras polyinsaturés et la lipoperoxydation en chaîne qui en résulte sont donc à l'origine d'une désorganisation profonde de l'architecture membranaire qui perd ainsi sa souplesse et sa solidité [54, 19] avec, au plan fonctionnel, une altération des compétences cellulaires. Cette diminution de la fluidité membranaire a d'importantes conséquences sur la capacité des spermatozoïdes à initier les phénomènes de fusion associés à la réaction acrosomique [4, 37] et à la pénétration dans l'ovocyte [8, 10].

Les structures membranaires ne sont pas les seules à être les cibles des attaques radicalaires. Les radicaux libres sont parti-

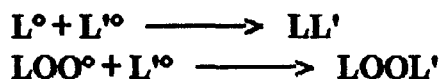
- Etape d'initiation :



- Etape de propagation :



- Etape de terminaison :



**Figure 2 : Les 3 étapes du processus de lipoperoxydation.**

**LH et L'H : acides gras polyinsaturés.**

**L° et L'° : radicaux alkyls.**

**LOO° : peroxyde lipidique (radical peroxy).**

**LOOH : hydroperoxyde lipidique.**

**Le symbole ° désigne l'électron célibataire d'une molécule radicalaire.**

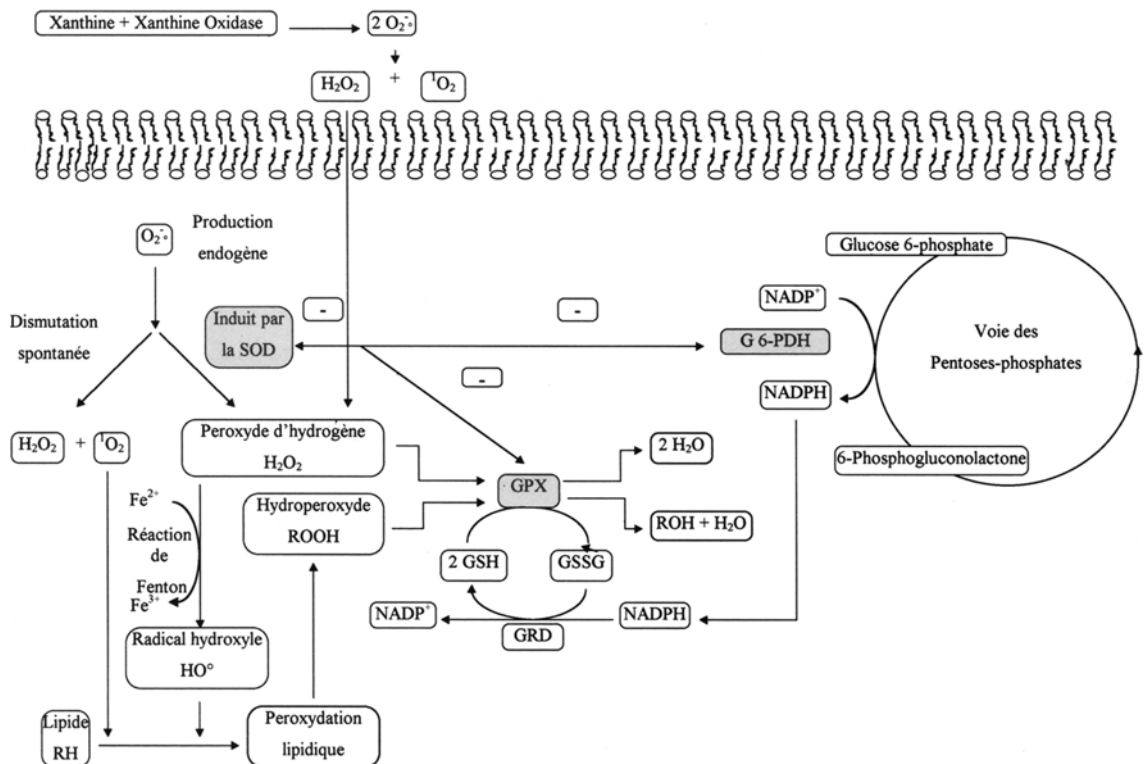
culièrement dangereux pour les acides nucléiques. Ils entraînent au sein de la molécule d'ADN des ruptures de brins et des mutations ponctuelles [24]. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la transmission ou la réplication du message génétique. Les protéines, notamment celles comportant un groupement sulhydryle, sont également des cibles privilégiées des attaques radicalaires. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires qui vont ainsi être oxydées et inactivées. De cette attaque radicalaire des protéines résultent de graves altérations du métabolisme cellulaire. Dans une étude récente, De Lamirande et Gagnon [29] ont montré que les dérivés oxygénés produits par un système xanthine / xanthine oxydase inter-

féraient avec le métabolisme énergétique des spermatozoïdes conduisant à une chute du niveau en ATP et à une immobilisation de la cellule probablement due à une baisse des phosphorylations des protéines axonémiales. Nos propres travaux utilisant le même système générateur de dérivés oxygénés, montrent par ailleurs une inhibition partielle de la glucose 6 phosphate déshydrogénase, la première enzyme du cycle des pentoses phosphates, principale voie métabolique conduisant à la production de NADPH dans la cellule [37]. Le peroxyde d'hydrogène provenant de la dismutation spontanée de l'anion superoxyde apparaît comme l'intermédiaire clé dans les effets cytotoxiques observés sur les spermatozoïdes humains après exposition au systè-

me xanthine / xanthine oxydase. Les mécanismes par lesquels il semble exercer ses effets pourraient être liés à une diminution des défenses antioxydantes du spermatozoïde. Nous avons en effet montré que sa présence en quantité importante dans le milieu d'incubation entraînait une réduction significative des activités superoxyde dismutase et glutathion peroxydase, diminution favorisant l'initiation et la propagation d'un processus peroxydatif se traduisant par une augmentation du taux d'hydroperoxydes dans la cellule ainsi que par une dégradation des acides gras polyinsaturés constitutifs de leurs membranes [37] (Figure 3). L'addition de catalase prévient tous les effets cytotoxiques observés en présence de peroxyde d'hydrogène.

## CAPACITATION, REACTION ACROSOMIQUE ET DERIVES OXYGENES

Tout comme dans différents types cellulaires où il a été montré que certaines réactions radicalaires pouvaient entrer dans le métabolisme physiologique de la cellule (activité des cyclooxygénases et lipooxygénases, phagocytose...), de très récentes études sur les spermatozoïdes [18, 27, 28, 36, 38] semblent montrer que les dérivés oxygénés pourraient intervenir dans les processus de capacitation et de réaction acrosomique. Présents à faibles concentrations, les mécanismes d'action des dérivés oxygénés apparaissent très spécifiques. Le peroxyde d'hydrogène pourrait ainsi moduler certaines activités enzymatiques par des



**Figure 3 : Représentation schématique de l'hypothèse des événements induits par le système xanthine/xanthine oxydase sur certaines activités enzymatiques des spermatozoïdes humains. La peroxydation lipidique est montrée comme le résultat de l'inhibition des systèmes de défense enzymatiques des spermatozoïdes induite par le peroxyde d'hydrogène. En diminuant les activités superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et glucose 6 phosphate déshydrogénase, le peroxyde d'hydrogène permettrait, en synergie avec la production endogène de dérivés oxygénés, l'accumulation de peroxydes lipidiques toxiques ainsi que le développement de la peroxydation lipidique.**



modifications oxydatives des domaines de régulation des activités de la tyrosine kinase [46] ou de la protéine kinase C [35]. Nous avons récemment montré que sa présence à faible concentration dans le milieu d'incubation des spermatozoïdes pouvait accélérer le processus de capacitation, accélération se traduisant par une apparition précoce du mouvement hyperactivé et de l'inductibilité de la réaction acrosomique. *A contrario*, l'addition de catalase dans le milieu pendant le processus de capacitation prévient l'apparition de l'hyperactivation et réduit très significativement le taux de réaction acrosomique induite [36]. Cette réduction de la réaction acrosomique pourrait être due à une diminution des phosphorylations d'une tyrosine kinase membranaire ainsi que l'ont récemment suggéré Aitken et coll. [1]. L'anion superoxyde pourrait également avoir son importance dans le processus de capacitation. En effet, l'incubation des spermatozoïdes en présence du système xanthine / xanthine oxydase / catalase ou en présence de sérum de cordon foetal (un fluide biologique), provoque une augmentation de l'hyperactivation [27]. De plus, la présence de superoxyde dismutase dans le milieu prévient cette augmentation du mouvement hyperactivé.

De manière analogue au fait que la peroxydation de liposomes contenant des acides gras polyinsaturés induit l'agrégation et la fusion des vésicules [59], la peroxydation lipidique des spermatozoïdes apparaît conduire à une augmentation soudaine de leur capacité à se lier à la zone pellucide [7]. Dans d'autres types cellulaires dont les fonctions sont caractérisés par des phases d'augmentation d'adhésivité tels que les polynucléaires neutrophiles ou les plaquettes, un rôle médiateur de l'anion superoxyde a été montré [14, 58]. De façon similaire, nos travaux montrent qu'il pourrait être impliqué dans le processus de la réaction acrosomique. En effet, si l'induction de la réaction acrosomique par un calcium ionophore ou des esters de phorbol entraîne

une production massive et soudaine d'anion superoxyde dans le milieu d'incubation, en présence de superoxyde dismutase cette production n'est plus détectée et le taux de réaction acrosomique est réduit de manière très significative [38]. La déestérification des phospholipides membranaires par l'anion superoxyde pourrait fournir une des clés pouvant expliquer son rôle biologique. En effet, il a été récemment montré par Deby et coll [30] que dans les conditions aprotiques de l'intérieur des membranes biologiques où la demi-vie de l'anion superoxyde peut être de plusieurs heures [60], ce dernier pourrait induire la déestérification des phospholipides membranaires. Nos travaux suggèrent qu'un tel mécanisme pourrait être impliqué dans le processus de la réaction acrosomique. En effet, la présence d'anion superoxyde dans le milieu d'incubation des spermatozoïdes entraîne la libération d'acides gras non estérifiés de leurs membranes, libération totalement inhibée en présence de superoxyde dismutase [38]. Cette libération d'acides gras non estérifiés pourrait accroître, à travers une augmentation de la fluidité membranaire [55] et l'action déstabilisante des lysophospholipides produits au cours de ce processus [44], la fusiogénicité de la membrane et permettre ainsi les évènements de fusion associés à la réaction acrosomique et à la pénétration dans l'ovocyte.

## CONCLUSION

L'identification des dérivés oxygénés responsables de la réduction des capacités fonctionnelles des spermatozoïdes, ainsi que leurs mécanismes d'action présidant à un stress oxydatif, peut avoir des conséquences importantes en termes diagnostiques et thérapeutiques dans l'optimisation des conditions de préparation et de culture des spermatozoïdes dans les programmes d'aide médicale à la procréation. En termes diagnostiques tout d'abord, à la vue du stress oxydatif potentiel que repré-

sente la présence dans le plasma séminal de leucocytes dont les effets cytotoxiques sur différents types cellulaires sont médiés par le peroxyde d'hydrogène. En termes thérapeutiques ensuite, où l'utilisation d'antioxydants pourrait permettre de limiter les effets délétères des dérivés oxygénés non seulement sur les spermatozoïdes [6, 39], mais également sur les embryons [19]. D'un autre côté, la présence de dérivés oxygénés en faibles concentrations semble être un préalable indispensable à la capacité fécondante du spermatozoïde.

## REFERENCES

1. AITKEN R. J., PATERSON M., VAN DUIN M. (1994) : Control of fertilization. Présenté au 10ème congrès de l'ESHRE, Bruxelles, 27-29 juin.
2. AIKEN R. J., FORD W. C. L. (1988) : Investigation of cellular mechanisms regulating the release of superoxide anion by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, Abst Ser 1, 40.
3. AITKEN R. J., BUCKINGHAM D., WEST K., WU F. C., ZIKOPOULOS K, RICHARDSON DW (1992) : Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94, 451-462.
4. AITKEN R. J., BUCKINGHAM D. W., HARKISS D. (1993a) : Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97, 441- 450.
5. AITKEN R. J., CLARKSON J. S. (1987) : Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81, 459-469.
6. AITKEN R. J., CLARKSON J. S. (1988) : Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9 : 367-376.
7. AITKEN R. J., CLARKSON J. S., FISHEL S. (1989a) : Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 40, 183-197.
8. AITKEN R. J., CLARKSON J. S., HARGREAVE T. B., IRVINE D. S., WU F. C. W. (1989b) : Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology*, 10, 214-220.
9. AITKEN R. J., HARKISS D., BUCKINGHAM D. W. (1993b) : Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, 257-265
10. AITKEN R. J., IRVINE D. S., WU F. C. (1991) : Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 164, 542-551.
11. AITKEN R. J., WEST K. M. (1990) : Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13, 433-451.
12. ALVAREZ J. G., STOREY B. T. (1989) : Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid. *Gamete Research*, 23, 77-90.
13. ALVAREZ J. G., TOUCHSTONE J. C., BLASCO I., STOREY B. T. (1987) : Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 8, 338-348.
14. BEAPARK T., SAVEMINI D., SNEDDON J. M., VANE J. R. (1988) : Endothélium -derived relaxing factor (EDRF) and superoxide anions modulate platelet adhesion to endothelial cells. *Journal of Physiology*, 339, 12P.
15. BENDICH A., MACHLIN L. J., SCANDURRO O. (1986) : The antioxidant role of vitamin C. *Advance in Free radicals Biology and Medicine*, 2, 419-444.
16. BIELSKI B. J. H., ARUDI R. L., SUTHERLAND M. W. (1983) : A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>- with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, vol 258, 8, 4759-4761.
17. BIEMOND P., VAN ELJK H. G., SWAAK A. J. G., KOSTER J. F. (1984) : Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes : possible mechanism in inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 73, 1576-1579.
18. BIZE I., SANTANDER G., CABELLO P., DRISCOLL D., SHARPE C. (1991) : Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biology of Reproduction*, 44, 398-403.
19. BLOCK E. R. (1991) : Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 20, 362-369.
20. CHOW C. K. (1991) : Vitamin E and oxidative stress. *Free Radicals Biology and Medicine*, 11, 215-232.
21. CHUN Y. S., KIM J. H., LEE H. T., CHUNG K. S. (1994) : Effect of superoxide dismutase on the development of preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*, 41, 511-520.

22. CILLARD J., MOREL I., CILLARD P., LESCOAT G., GICQUEL M. (1989) : Flavonoïds as free radicals scavengers. In : *Flavonoïds in Biology and Medicine*.
23. CILLARD J., CILLARD P. (1987) : Antioxidant activity of associated alpha-tocopherol and ascorbic acid in aqueous media. *Revue Française des Corps Gras*, 34, 271-274.
24. COMPORTI M. (1989) : Three models of free radical-induced cell injury. *Chemical and Biological interactions*, 72, 1-56.
25. COREY E. J., MEHROTRA M. M., KHAN A. U. (1987) : Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 145, 2, 842-846.
26. DE LAMIRANDE E., GAGNON C. (1992a) : Reactive oxygen species and human spermatozoa. I- Effects on the motility of intact Spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*, Vol. 13, n° 5, 368 - 378
27. DE LAMIRANDE E., GAGNON C. (1993a) : A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16, 21-25.
28. DE LAMIRANDE E., GAGNON C. (1993b) : Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radicals Biology and Medicine*, 14, 157-166.
29. DE LAMIRANDE E., GAGNON C. (1992 b) : Reactive oxygen species and human spermatozoa II - Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, Vol. 13, n° 5, 379 - 386
30. DEBY C., BOES M., PINCEMAIL J., BOURDON-NEURAY J., DEBY-DUPONT G. (1990) : degradation of membrane phospholipids by a direct nucleophilic action of superoxide anion. *Free Radicals, Lipoproteins and Membrane lipids*, Eds A Crastes de Paulet, L Douste-Blazy et R paolletti. Plenum Press, New-York, pp105-113.
31. DOBA T., BURTON G. W., IGOLD K. U. (1985) : Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamine C. *Biochemical Biophysical Acta*, 835, 298-303.
32. ESTERBAUER H., SHAUR R. J., ZOLLNER H. (1991) : Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 11, 81-128.
33. EVANS H., BISHOP K. S. (1922) : on the existence of a hitherto unrecognised dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56, 650-651.
34. FENTON H. (1984) : Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of Chemical Society*, 65, 899-903.
35. GOPALAKRISHNA R., ANDERSON W. B. (1989) : Ca<sup>2+</sup> and phospholipid-independent activation of protein kinase C by the selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 86, 6758-6762.
36. GRIVEAU J. F., RENARD P., LE LANNOU D. (1994) : An in vitro promoting role of human sperm capacitation for hydrogen peroxide. *International Journal of Andrology*, 17, 300-307.
37. GRIVEAU J. F., DUMONT E., RENARD P., LE LANNOU D. (1995) : Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103, 17-26.
38. GRIVEAU J. F., RENARD P., LE LANNOU D. (1995) : Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction in vitro. *Internal Journal of Andrology*, sous presse.
39. GRIVEAU J. F., LE LANNOU D. (1994) : Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *International Journal of Andrology*, 17, 225-231.
40. IWASAKI A., GAGNON C. (1992) : Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, 57, n° 2, 409-416
41. JEULIN C., SOUFIR J. C., WEBER P., LAVAL-MARTIN D., CALVAYRAC R. (1989) : Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*, 24, 185-196.
42. JONES R., MANN T., SHERINS R. J. (1979) : Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa : spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31, 531-537.
43. KESSOPOULOU E., TOMLISON M. J., BARRAT C. R. L., BOLTON A. E., COOKE L. D. (1993) : Origin of reactive oxygen species in human semen : spermatozoa or leucocytes ? *Journal of Reproduction and Fertility*, 94, 463-470.
44. KINNAIRD A. A. A., CHOY P. C., MAN R. Y. K. (1988) : Lysophosphatidylcholine accumulation in the ischemic canine heart. *Lipids*, 23, 32-35.
45. KOPPENOL W. H. (1976) : reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *Nature*, 262, 420-421.
46. KOSHIO O., AKANUMA Y., KASUGA M. (1988) : Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in intact cells. *Biochemical journal*, 250, 95-101.
47. KOVALSKI N. N., DE LAMIRANDE E., GAGNON C. (1992) : Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility : protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertility and Sterility*, vol. 58, 4, 809-816.

48. KWENANG A., KROUS M. J., KOSTER J. F., VAN ELJK H. G. (1987) : Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Human Reproduction*, 2, 387-388.
49. MC CAY P. B. (1985) : Vitamin E : interactions with free radicals and ascorbate. *Annual Revue of Nutrition*, 5, 323-340.
50. MC LEOD J. (1943) : The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology*, 138, 512-518.
51. MENNELA M. R. F., JONES R. (1980) : Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involment of superoxides in metal-iron-catalysed lipid-peroxidation reactions in semen. *Biochemical Journal*, 191, 289-297.
52. NIKI E., TSUCHIYA J., TANIMURA R., KAMIYA Y. (1982) : Role of vitamin C as an antioxidant. *Chemistry Letters*, 6, 789-792.
53. NISSEN H. P. AND KREYSEL H. W. (1983) : Superoxide dismutase in human semen. *Klinische Wochenschrift*, 61, 63-65.
54. OHYASHIKI T., TSUKA T., MOHRI T. (1988) : Increase of the molecular rigidity of the protein conformation in the intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Acta*, 939, 383-392.
55. ROSEN G. M., BARBER M. J., RAUCKMAN E. J. (1983) : Disruption of erythrocyte membranal organization by superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 258, 4, 2225-2228.
56. SALO D. C., PACIFICI R. E., LIN S. W., GIULIVI C., DAVIES K. J. (1990) : A superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 11919-11927.
57. SELLEY M. L., MC GUINNESS J. A., JENJIN L. A., BARTLETT M. R., ARDLIE N. G. (1988) : Effect of 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal on platelet function. *Thrombose Haemostase*, 59, 143-146.
58. SELLEY M. L., LACEY M. J., BARTLETT M. R., COPELAND C. M., ARDLIE N. G. (1991) : Content of significant amounts of a cytotoxic end-product of lipid peroxidation in human semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92, 291-298.
59. SEVANIAN A., WRATTEN M., MC LEOD L. L., KIM E. (1988) : Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids : a structural basis for enzymes activation. *Biochemical Biophysical Acta*, 961, 316-327.
60. VALENTINE J. S., CURTIS A. B. (1975) : A convenient preparation of solution of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with copper (II) complex. *Journal of the American Chemical Society*, 97, 224-226.

## ABSTRACT

### **Free Radicals and Human Spermatozoa : Physiology and Physiopathology**

**J. F. GRIVEAU, D. LE LANNOU**

**The role of reactive oxygen species in the physiopathology of human sperm function has been emphasized in recent years. Their production in semen has been associated with loss of motility, decreased capacity for sperm-oocyte fusion and loss of fertility. In semen preparations, there are two major sources of reactive oxygen species : leucocytes and spermatozoa themselves. It has been proposed that reactive oxygen species production by human spermatozoa was dependent upon a membrane-bound NADPH oxidase or a mitochondrial diaphorase. Hydrogen peroxide produced by the dismutation of superoxide anion has been recognized as the most toxic oxidizing species for human spermatozoa. Owing to their high content of polyunsaturated fatty acids, it has been proposed that lipid peroxidation of the sperm plasma membrane is largely responsible for defective sperm function. Reactive oxygen species also affect the sperm axoneme as a result of ATP depletion, inhibit mitochondrial functions, and synthesis of DNA, RNA and proteins, produce cytoskeletal modifications and inhibit sperm-oocyte fusion. Human spermatozoa possess enzymatic defence systems such as superoxide dismutase, glutathion peroxidase / reductase and catalase to counteract the toxic effects induced by reactive oxygen species. Correlations have been reported between their effectiveness and the duration of sperm motility. If the excessive production of reactive oxygen species is detrimental for human spermatozoa, they could also participate in the phy-**

siological function of the spermatozoa when present at low concentrations. Indeed, reactive oxygen species have been shown to be involved in the activation of several enzymes. Furthermore, sperm capacitation, acrosome reac-

tion and sperm-zona interaction would be enhanced by reactive oxygen species.

*Key words* : free radicals - reactive oxygen species - lipid peroxidation - spermatozoa