

Prostasomes, dérivés actifs de l'oxygène et sperme humain

F. SAEZ, G. GRIZARD, D. BOUCHER

Laboratoire de Biologie de la Reproduction – CECOS, CHU - Hôtel Dieu, 63003 Clermont-Ferrand

RÉSUMÉ

Les prostasomes sont des vésicules lipidiques particulières sécrétées par la prostate humaine et retrouvées dans le sperme. Actuellement, aucune action spécifique ne leur a été attribuée. Cependant, les prostasomes semblent exercer un effet à différents niveaux. Par exemple, les prostasomes sont bénéfiques pour la mobilité des spermatozoïdes *in-vitro* et participent à l'immunomodulation exercée par le liquide séminal.

La production de dérivés actifs de l'oxygène (DAO) dans le sperme humain joue un rôle sur les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes. La production de quantités faibles et contrôlées de DAO par les spermatozoïdes semble nécessaire à l'acquisition de leur capacités fonctionnelles. Par contre, la présence de leucocytes dans le sperme, associée à une forte production de DAO, peut se révéler néfaste pour les spermatozoïdes.

Après avoir abordé, sous forme d'une revue bibliographique, les caractéristiques structurales et fonctionnelles des prostasomes et le rôle des DAO dans le sperme humain, nous rapportons nos résultats concernant les effets des prostasomes sur la production des DAO et les conséquences sur les spermatozoïdes. Nous avons mis en évidence une fonction antioxydante des prostasomes dans le sperme humain. Elle s'exerce à la fois sur les polynucléaires neutrophiles et sur les spermatozoïdes. Le mode d'action des prostasomes est particulier puisqu'ils interviennent sur la production des DAO, en agissant notamment au niveau des membranes des polynucléaires neutrophiles. Ils entraînent une diminution

de l'activité NADPH-oxydase de ces cellules associée à une rigidification de leur membrane plasmique. Au niveau des spermatozoïdes, les prostasomes protègent leurs capacités fonctionnelles lors d'un stress oxydant créé par la présence de NADPH dans le milieu.

Mots clés : prostasomes, dérivés actifs de l'oxygène, NADPH-oxydase, spermatozoïdes humains, chimiluminescence

I. LES PROSTASOMES

1. Introduction

Les prostasomes ont été isolés pour la première fois chez l'homme suite à une ultracentrifugation du liquide séminal [69]. Le culot de cette ultracentrifugation contenait des vésicules semblables à celles que les auteurs avaient préalablement isolées du fluide prostatique et elles furent par conséquent désignées sous le terme de "prostasomes" [70]. Ceux-ci sont présents au pôle apical des cellules sécrétrices de l'épithélium des acini prostatiques [62], où ils sont stockés dans des vésicules avant leur sécrétion dans le fluide prostatique selon deux mécanismes :

Correspondance : F. Saez, Laboratoire de Biologie de la Reproduction – CECOS, CHU - Hôtel Dieu, 63003 Clermont-Ferrand

- une exocytose normale,
- une “diacytose” où la vésicule de stockage est entièrement déplacée de l’intérieur vers l’extérieur de la cellule, avec perforation de la membrane plasmique apicale [21].

Le fait que les prostasomes soient présents dans les cellules et dans le fluide prostatique sous une forme semblable leur a valu la dénomination d’organelles extracellulaires [70]. Ils se présentent sous la forme de vésicules sphériques, entourées d’une membrane pouvant être multilaminaire, et ont une taille moyenne d’environ 250 nm, comprise entre 30 et 500 nm (Figure 1).

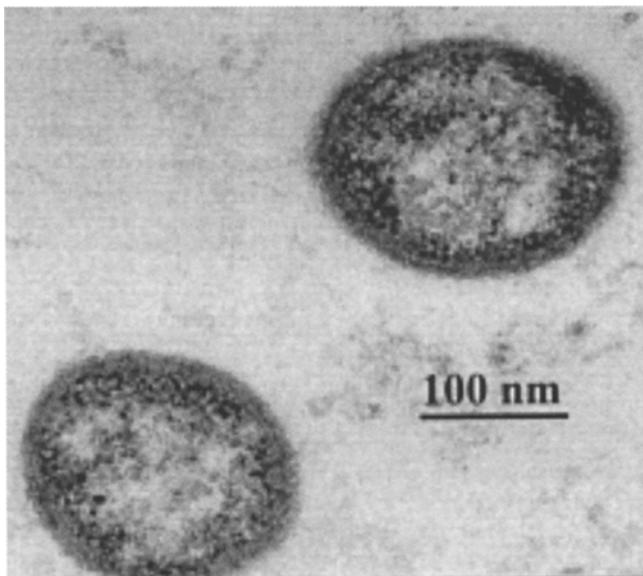


Figure 1 : Photographie en microscopie électronique montrant deux prostasomes marqués à l’argent (fournie par Kemeny J.L. et Guy L.).

Des vésicules semblables aux prostasomes (vésicules *prostasome-like*) ont été retrouvées dans le liquide séminal de plusieurs mammifères comme le lapin [27], le bélier [20], le chien [38] ou l’étalon [14, 61]. Différentes vésicules présentant certaines analogies avec les prostasomes ont aussi été isolées du fluide épидidymaire de rat [37].

2. Composition lipidique et protéique

Les prostasomes ont une composition lipidique très particulière, caractérisée par une forte proportion de cholestérol donnant un rapport molaire cholestérol/phospholipides de l’ordre de deux [17], une valeur très élevée en compa-

raison des valeurs de 0,8 à 1,3 retrouvées pour d’autres membranes comme la membrane érythrocytaire [57]. L’analyse des phospholipides des prostasomes révèle une prédominance de la sphingomyéline qui représente à elle seule 50% des phospholipides totaux [15, 17] (Tableau 1). Les acides gras des phospholipides sont majoritairement de type saturé ou mono-insaturé. Tous ces paramètres sont caractéristiques d’une membrane hautement ordonnée [17]. Par comparaison, la composition lipidique de la membrane des spermatozoïdes est très différente, avec une teneur plus faible en sphingomyéline et en cholestérol, et un rapport molaire cholestérol/phospholipides voisin de 0,5.

L’analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines extraites des prostasomes révèle environ 80 entités protéiques différentes [58, 68]. Parmi les principales protéines mises en évidence, on compte : des marqueurs neuroendocriniens (chromogranine B, neuropeptide Y et *vasoactive intestinal peptide* VIP, [80]) ; le facteur tissulaire, associé à la membrane des prostasomes et qui leur confère une activité de coagulation [35] ; la dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV), une sérine protéase associée à la membrane des prostasomes [13]. Cette enzyme pourrait jouer un rôle dans l’infection par le virus de l’immunodéficience humaine (VIH). La glycoprotéine d’enveloppe gp120 et la protéine “Tat” du virus peuvent interagir avec la DPP-IV, les prostasomes pourraient donc transporter des VIH.

Outre ces différentes molécules, les prostasomes contiennent aussi d’autres enzymes parmi lesquelles on note : une ATPase calcium-magnésium dépendante, avec également une activité ATPase zinc-dépendante, qui sont peut être associées [70, 71] ; une protéine kinase qui aurait comme cible des protéines du spermatozoïde mais dont la fonction est inconnue ; une aminopeptidase participant au processus de liquéfaction du sperme ; une 5’-nucléotidase ayant un rôle possible dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes en produisant de l’adénosine dans son micro-environnement ; une gamma-glutamyltransférase ; une phospholipase A₂ ou bien encore une lactate déshydrogénase.

Tableau 1 : Composition phospholipidique des spermatozoïdes humains et des prostasomes. SM = Sphingomyéline, PE = Phosphatidyl-éthanolamine, PS = Phosphatidyl-sérine, PC = Phosphatidyl-choline, PI = Phosphatidyl-inositol, Chol = Cholestérol, P = Phosphore, PL = Phospholipides. Pour Carlini et al., les phospholipides sont exprimés en pourcentage du phosphore lipidique total (séparation par chromatographie sur couche mince et dosage du phosphore), et représentent la moyenne \pm ESM de trois échantillons. Pour Grizard et al., les phospholipides sont exprimés en nmoles/10⁸ spermatozoïdes et en pourcentage relatif des différentes catégories (séparation et dosage par HPLC, n = 14).

	Spermatozoïdes		Prostasomes
	Grizard et al., 2000 [44] (nmoles/10 ⁸ spzs)	Carlini et al., 1997 [22]	Carlini et al., 1997 [22]
SM	57 \pm 2 (20%)	7 \pm 1%	53 \pm 12 %
PE	88 \pm 6 (31%)	30 \pm 4 %	15 \pm 4 %
PS	23 \pm 2 (8%)	7 \pm 1 %	14 \pm 3 %
PC	102 \pm 8 (36%)	38 \pm 1 %	12 \pm 3 %
PI	12 \pm 1 (4%)	7 \pm 2 %	6 \pm 3 %
Chol.	95 \pm 11	0,2 \pm 0,1 μ mol/mg prot.	0,8 \pm 0,1 μ mol/mg prot.
PL	282 \pm 4	0,3 \pm 0,1 μ mol/mg prot.	0,4 \pm 0,1 μ mol/mg prot.
Chol / PL	0,34	0,67	2,00

3. Propriétés fonctionnelles des prostasomes

Les prostasomes interviennent dans les propriétés d'immunomodulation du liquide séminal [50], par le biais de molécules inhibitrices du complément [74, 75]. Des protéines à ancrage GPI sont responsables des fonctions immunosuppressives du liquide séminal : le CD 55 ou *Decay Accelerating Factor* (DAF) et le CD 46 ou *Membrane Cofactor Protein* (MCP) sont des inhibiteurs de la C3-convertase, ainsi que le CD 59 ou protectine est un inhibiteur du Complexe d'Attaque Membranaire (CAM). Les prostasomes sont porteurs de ces molécules et ont la capacité de les transmettre aux spermatozoïdes, les protégeant ainsi probablement des attaques immunologiques subies dans le tractus féminin.

Les prostasomes ont un effet bénéfique sur la mobilité des spermatozoïdes *in-vitro*, notamment au cours de protocoles de séparation des spermatozoïdes par migration ascendante ou *swim-up* [33, 23]. Cet effet est retrouvé sur la mobilité progressive de spermatozoïdes obtenus après lavage du sperme total [79], ainsi que sur la capacité des spermatozoïdes à retrouver un mouvement, après leur immobilisation par lavages répétés dans du tampon NaCl [34].

Les prostasomes interviennent dans la capacitation des spermatozoïdes. Dans le liquide séminal, le cholestérol est connu comme le principal facteur inhibiteur de la réaction acrosomique (RA) des spermatozoïdes stimulés par la progestérone [24]. L'influence des prostasomes, sur la capacitation a été testée en appréciant leur action sur la RA induite par la progestérone et, dans ces conditions, ils inhibent la capacité des spermatozoïdes à effectuer une RA. Cette inhibition est retrouvée avec le liquide séminal et semble étroitement associée à la concentration en cholestérol. Pour expliquer cette action, les auteurs proposent un transfert du cholestérol des prostasomes vers les spermatozoïdes à travers la phase aqueuse ou par contact [26]. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer le rôle du cholestérol sur l'activité fonctionnelle du spermatozoïde. C'est ainsi que des spermatozoïdes incubés dans un milieu enrichi en cholestérol sont insensibles à la ionomycine, un échangeur de calcium/protons, suggérant que le cholestérol pourrait agir sur une voie de transduction du signal activée par une augmentation du calcium intracellulaire [25]. L'action inhibitrice des prostasomes sur la capacitation via leur contenu en cholestérol pourrait être médiée en partie par une interférence avec ces différents

événements cellulaires.

Les prostasomes se lient rapidement aux polynucléaires et aux monocytes sanguins, puis sont internalisés, entraînant ainsi une baisse de production d'O₂^{°-} [78]. Ces résultats sont confirmés par Arienti *et al.* [16] qui montrent une adhésion pH-dépendante des prostasomes aux polynucléaires, plus importante à pH légèrement acide. Un contact semble nécessaire pour expliquer l'action des prostasomes sur les leucocytes, mais pour ces auteurs, l'internalisation des prostasomes dans les cellules n'est pas clairement établie.

Les prostasomes interagissent de manière forte, par le biais d'une interaction de nature hydrophobe, avec les spermatozoïdes humains [73]. Actuellement, aucun site spécifique d'adhésion aux spermatozoïdes n'a été identifié dans les prostasomes, mais l'activité antigénique pourrait être portée par des enzymes. Une fusion des prostasomes avec les spermatozoïdes a été mise en évidence à un pH compris entre 4 et 5 [12]. Elle nécessite l'intégrité de protéines présentes sur les spermatozoïdes et/ou sur les prostasomes. La quantité de lipides transférée est dépendante du rapport quantitatif prostasomes/spermatozoïdes. Ce processus de fusion entraîne une baisse de fluidité de la membrane plasmique des spermatozoïdes mesurée par polarisation de fluorescence [22]. Ces auteurs observent aussi à pH 8 une légère baisse de la fluidité, sans processus de fusion, ces données sont en accord avec l'adhérence des prostasomes aux spermatozoïdes [72] et avec le transfert possible de cholestérol des prostasomes vers les spermatozoïdes [24]. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium est une autre conséquence de la fusion des prostasomes avec les spermatozoïdes, mais son impact physiologique n'est actuellement pas connu [66].

Les prostasomes n'ont pas de fonction réellement spécifique dans le sperme humain. Cependant, d'après toutes les propriétés décrites, il semble que ces organelles extracellulaires favorisent la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin, ils pourraient ainsi aider les spermatozoïdes à atteindre l'ovocyte dans un état favorable au processus de fécondation.

II. LES SPERMATOZOÏDES ET LES DERIVES ACTIFS DE L'OXYGENE (DAO)

1. Le stress oxydant et les DAO :

L'oxygène moléculaire (O₂) est une molécule vitale mais qui peut s'avérer nocive suite à sa transformation en molécules beaucoup plus réactives rassemblées sous le nom de dérivés actifs de l'oxygène (DAO) ou radicaux libres oxygénés. Dans un milieu ou un organe, il existe un équilibre entre les systèmes produisant les DAO et les systèmes limitant leur production. Un stress oxydant a lieu lorsque cet équilibre est rompu en faveur des systèmes producteurs de DAO. Au sein d'une cellule, il existe également un équilibre qui est contrôlé par les couples Rédox tels que le glutathion oxydé/glutathion réduit (GSH/GSSG). Le rapport des concentrations des formes oxydées et réduites va déterminer les conditions Rédox au sein du système considéré. Cette notion de couple Rédox s'apparente à celle de couples acido-basiques, associée au pH intracellulaire.

2. Les DAO dans le sperme

D'un point de vue chimique, les DAO sont des espèces atomiques ou moléculaires qui possèdent au moins un électron non apparié sur leur orbitale externe. Ils sont instables, ce qui leur confère une très grande réactivité puisqu'ils tendent à stabiliser leur structure en s'appariant avec la plupart des composés organiques cellulaires.

Le premier radical, formé suite à l'acceptation d'un électron par O₂, est l'anion superoxyde (O₂^{°-}). Concernant les spermatozoïdes humains, O₂^{°-} est produit par l'action d'une diaphorase mitochondriale ou d'une Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-Phosphate-Hydrogène (NADPH)-oxydase membranaire [1]. La diaphorase est une oxydoréductase NADH-dépendante de la membrane interne des mitochondries [39]. L'anion superoxyde a un faible pouvoir oxydant et une durée de vie courte (< 10⁻³ sec). Il n'est pas très toxique, mais peut réagir avec certaines molécules se trouvant à proximité de son lieu de formation. L'anion superoxyde engendre la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par dismutation spontanée ou sous l'action d'une superoxyde dismutase (SOD). Le peroxyde

d'hydrogène possède une grande stabilité ainsi qu'un fort pouvoir oxydant [45]. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un DAO si l'on s'en réfère strictement à la définition chimique, mais il est classé comme tel car en présence de métaux de transition, comme le fer, il peut engendrer d'autres DAO. Le principal DAO formé par cette réaction (réaction de Fenton) est le radical hydroxyle, OH^\bullet . C'est le DAO le plus réactif, mais il possède une durée de vie très courte, de l'ordre de 10^{-12} secondes, son action s'exerce donc directement sur les lieux de sa production.

Un effet toxique de l'oxygène sur les spermatozoïdes a été suggéré dès 1943 par MacLeod [59] qui a observé une baisse de la mobilité des spermatozoïdes incubés sous une atmosphère riche en O_2 . Le type cellulaire responsable de la production des DAO dans le sperme a longtemps été un sujet de débat. Initialement, les résultats obtenus à partir des cellules isolées par centrifugations successives, par migration sur gradient de densité (Percoll), ou par *swim-up*, laissaient penser que les spermatozoïdes étaient la source principale de DAO dans le sperme humain [1, 10]. Par la suite, il s'est avéré que les polynucléaires neutrophiles (PN) présents dans le sperme avaient une capacité à produire des DAO très supérieure à celle des spermatozoïdes. Ces résultats ont été obtenus suite à des travaux réalisés sur différentes populations de spermatozoïdes isolées par migration sur gradient de Percoll à partir de spermatozoïdes contenant plus de 1.10^6 PN.ml⁻¹. Dans la fraction de faible densité de Percoll, la concentration de PN est élevée et elle est associée à une forte production de DAO [3]. D'après ces auteurs, dans le sperme, les PN seraient sous une forme spontanément activée, puisque les DAO sont produits sans aucune stimulation. De nombreuses études vont ensuite corroborer ces résultats [4, 36, 51, 81, 86-89]. Actuellement, il est admis que les PN sont la source principale des DAO retrouvés dans le sperme humain. Toutefois, les spermatozoïdes sont aussi capables d'en produire, notamment dans certaines situations pathologiques. Une production de DAO a été retrouvée dans 40% [48] et 72% [36] des spermatozoïdes de patients infertiles alors qu'aucune production significative n'a été mise en évidence avec des spermatozoïdes

patients fertiles. Les spermatozoïdes de patients oligozoospermiques produisent aussi une quantité élevée de DAO [4]. De manière générale, cet excès de production provient des spermatozoïdes morphologiquement anormaux, porteurs en particulier d'anomalies de la pièce intermédiaire [48, 63, 67]. Toutefois, il existe une controverse quant à savoir si la forte production des DAO est la cause ou la conséquence de ces anomalies morphologiques [83, 89].

3. Les effets délétères des DAO :

Les DAO ont pour cibles les principales molécules des cellules (lipides, glucides, acides nucléiques et protéines). Les attaques sur les lipides et les acides nucléiques sont les mieux caractérisées dans le cas des spermatozoïdes humains. La principale conséquence du stress oxydant sur les spermatozoïdes est la lipoperoxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la membrane plasmique, qui contient une proportion élevée d'AGPI par rapport aux acides gras totaux (environ 35%). Les AGPI les plus sensibles aux DAO sont l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque, alors que l'acide linoléique est plus résistant [41]. Dans les spermatozoïdes présentant une leucocytospermie, le stress oxydant induit par les PN a des effets néfastes sur les AGPI des spermatozoïdes, se traduisant par un plus faible pourcentage d'acide docosahexaénoïque, comparé à celui de spermatozoïdes de spermatozoïdes sans PN [90]. Une forte lipoperoxydation a des conséquences sur l'activité fonctionnelle des spermatozoïdes du fait, en partie, que la membrane plasmique exposée à un fort stress oxydant perd sa fonctionnalité. Cela se traduit par une baisse de mobilité des spermatozoïdes [5] et par une diminution de leur capacité fusiogène avec la membrane de l'ovocyte, objectivée *in vitro* par une baisse de la capacité de fusion des spermatozoïdes avec des ovocytes dépellucidés de hamster [2]. Une peroxydation limitée des AGPI membranaires pourrait toutefois s'avérer nécessaire à l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes humains [54]. Elle entraînerait notamment de discrètes modifications membranaires post-éjaculatoires bénéfiques pour la fusion avec l'ovocyte.

Les DAO peuvent provoquer des cassures des brins d'ADN et des dommages oxydatifs des

bases [46, 54, 84]. Les mécanismes par lesquels les DAO occasionnent ces altérations sont encore mal connus. Par contre, cet effet délétère des DAO prend toute son importance au cours de la préparation des spermatozoïdes en vue d'assistance médicale à la procréation (AMP). Le pourcentage de spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté est d'ailleurs corrélé négativement avec les taux de réussite de fécondation *in-vitro* [82] ainsi qu'avec la qualité du sperme estimée par le mouvement des spermatozoïdes [47]. Une hypothèse formulée par Aitken [9] propose que, dans les conditions normales de fécondation *in-vivo*, les dégâts peroxydatifs de la membrane plasmique font qu'un spermatozoïde avec de l'ADN endommagé ne pourra pas féconder l'ovocyte. Or, avec l'ICSI (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*) ou fécondation *in-vitro* avec micro-injection, les étapes impliquant la membrane plasmique sont totalement court-circuitées, ce qui peut poser un problème pour la qualité et le développement de l'embryon.

4. Les moyens de défense

Ils sont principalement de deux ordres : des moyens non enzymatiques et des enzymes. Les moyens non enzymatiques sont des molécules antioxydantes qui piègent les DAO en excès dans le milieu. Les principaux piègeurs intracellulaires sont l'acide ascorbique (vitamine C) qui capte directement $O_2^{\circ-}$, et le glutathion réduit (GSH) qui peut réagir avec la majorité des DAO. Dans le liquide séminal, de nombreuses molécules antioxydantes sont présentes : la taurine, l'hypotaurine, l'acide ascorbique, le GSH, l'acide urique, l'albumine, le bêta-carotène ou encore l'ubiquinone. Certaines molécules ont la capacité d'arrêter les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique membranaire : l'alpha-tocophérol (Vitamine E) est l'antioxydant le plus abondant dans la membrane plasmique des spermatozoïdes humains et surtout le plus efficace.

Les moyens de défense enzymatiques des spermatozoïdes sont constitués de trois enzymes antioxydantes majeures que sont la superoxyde dismutase [10, 52, 91], la catalase [49] et la glutathion peroxydase [11] qui permettent de transformer $O_2^{\circ-}$, H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques, respectivement. Ces enzymes sont

présentes à la fois dans les spermatozoïdes et dans le liquide séminal.

5. Les implications physiologiques des DAO

a) La capacitation :

La capacitation, étape préalable nécessaire pour que les spermatozoïdes puissent effectuer leur réaction acrosomique et féconder l'ovocyte, est toujours mal définie d'un point de vue des mécanismes moléculaires. De plus, elle ne peut être évaluée que de manière indirecte par la propriété qu'ont les spermatozoïdes capités de déclencher leur réaction acrosomique lorsqu'ils sont traités par une glycoprotéine recombinante humaine de la zone pellucide [6, 18], un ionophore calcique A23187 [19], de la lysophosphatidyl-choline [28, 29] ou de la progestérone [60]. Au cours de la capacitation, les spermatozoïdes acquièrent également un type particulier de mobilité, ils sont "hyperactivés".

L'action des DAO sur la capacitation des spermatozoïdes dépend de leur nature, de leur concentration et les mécanismes mis en jeu sont probablement complexes. Les DAO en faibles quantités contrôlées sont impliqués dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes humains. L'ajout d'anion superoxyde à une suspension de spermatozoïdes via le système xanthine / xanthine oxydase induit une hyperactivation et une capacitation de ces cellules ; ces effets sont supprimés ou une réversion est possible en présence de SOD [28-29]. La synthèse d' $O_2^{\circ-}$ par les spermatozoïdes eux-mêmes serait une des premières étapes de l'induction et du développement de la capacitation [31]. La production d' $O_2^{\circ-}$ par les spermatozoïdes placés en conditions capacitantes (présence de 7,5% d'un ultrafiltrat de sérum de cordon fœtal) commence dès le début de l'incubation et se maintient pendant quatre heures. Cette synthèse est associée au développement progressif de l'hyperactivation et de la capacitation ; celle-ci apparaît donc comme un processus oxydatif [29].

Le peroxyde d'hydrogène est aussi impliqué dans la capacitation, puisque l'ajout de catalase au début de la capacitation réduit le processus alors que l'ajout d' H_2O_2 exogène l'accélère

[40]. Le pourcentage de spermatozoïdes avec une mobilité hyperactivée est aussi augmenté par une supplémentation du milieu en H_2O_2 et cet effet est supprimé par la catalase, l'action de H_2O_2 semble donc spécifique. L'effet capacitant de H_2O_2 est fonction de sa concentration et de la durée d'incubation. Les spermatozoïdes produisent eux mêmes du H_2O_2 [10].

Le mécanisme d'action des DAO dans le processus de capacitation n'est pas précisément connu mais les résultats accumulés jusqu'à présent suggèrent fortement une implication au niveau de la transduction du signal. La cascade de transduction du signal au cours de la capacitation serait initiée par une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire qui provoquerait à son tour une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire. La protéine kinase A (PKA) serait alors activée et activerait d'autres kinases conduisant à la phosphorylation des résidus tyrosine de protéines spécifiques du spermatozoïde. Dans cette cascade transductionnelle, $O_2^{\circ-}$ interviendrait dans l'activation de la PKA consécutive à l'augmentation de l'AMPc [56]. La synthèse d' $O_2^{\circ-}$ pourrait être aussi l'étape initiatrice de la cascade de transduction en provoquant une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc [8]. Une perte de cholestérol membranaire provoque l'activation d'une voie de transduction conduisant à la phosphorylation des tyrosines des protéines du spermatozoïde [65]. L'interaction entre ce phénomène et la production de l'anion superoxyde n'a pas été recherchée à notre connaissance. Il est toutefois possible que la fluidité membranaire, modifiée par la perte du cholestérol, entraîne une augmentation de la perméabilité au calcium et/ou active une NADPH-oxydase potentielle, initiant ainsi les cascades transductionnelles proposées.

La capacitation est probablement initiée par plusieurs voies de transduction. Une production limitée d' $O_2^{\circ-}$ est un événement de la cascade de transduction du signal. Elle pourrait contrôler l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc, ou médier ses effets. Le peroxyde d'hydrogène, à certaines doses, déclenche aussi la capacitation. Quel que soit

le mécanisme, les DAO sont impliqués dans la régulation Rédox de la capacitation du spermatozoïde humain.

b) La réaction acrosomique :

La liaison du spermatozoïde à une glycoprotéine de la zone pellucide (ZP3) provoque sa réaction acrosomique (RA). Les DAO sont impliqués dans la régulation de la RA puisqu'une relation linéaire inverse entre l'activité SOD-like de fluides déclenchant la RA (ultrafiltrats de fluide folliculaire ou de sérum de cordon fœtal) et le pourcentage de RA a été montré [30]. Pour Griveau *et al.* [42], l'anion superoxyde produit par les spermatozoïdes serait impliqué dans la RA mais pas dans le processus de capacitation. Cet $O_2^{\circ-}$ serait synthétisé suite à un influx calcique intracellulaire, par une voie dépendante de la PKC et permettrait une dé-estérification des phospholipides membranaires, probablement après activation de la PLA₂. Les changements de fluidité membranaire permettraient alors la fusion entre la membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome. De faibles concentrations d' H_2O_2 favorisent aussi la RA déclenchée par l'ionophore calcique A23187 et la pénétration des spermatozoïdes dans des ovocytes dépellucidés de hamster. A l'inverse, la catalase inhibe ces phénomènes [6].

6. Les polynucléaires neutrophiles :

Les globules blancs sont présents dans quasiment tous les échantillons de sperme humain, à des concentrations très variables. Parmi ces globules blancs, les PN sont les plus représentés (50 à 60%) et proviendraient en majorité de la prostate et des vésicules séminales [64, 88]. Les autres globules blancs sont des macrophages (20 à 30%) et des lymphocytes T (2 à 5%). Les PN sont des cellules phagocytaires qui utilisent les DAO pour éliminer les bactéries phagocytées. L'enzyme responsable de la synthèse des DAO est la NADPH-oxydase qui produit du $O_2^{\circ-}$ par réduction de l'oxygène moléculaire en utilisant le NADPH comme donneur d'électron. Dans les cellules au repos, cette enzyme est dans une conformation inactive, avec des composantes cytoplasmiques et membranaires ; elle est assemblée sous sa forme active dans la membrane plasmique et la membrane des phagosomes sous l'effet de

stimuli tels que l'interleukine 8, la fraction C5a du complément, la liaison de peptides formylés ou bien encore le lipopolysaccharide bactérien. La NADPH-oxydase, après stimulation, est d'abord assemblée sous sa forme active dans des vésicules ou granules intracellulaires à l'intérieur desquels $O_2^\circ-$ est sécrété, puis ces granules subissent un processus d'exocytose, libérant $O_2^\circ-$ dans le milieu extracellulaire [53, 85]. De nombreux événements de fusion ont donc lieu à proximité de la membrane plasmique, puisque les granules fusionnent entre eux et avec la membrane plasmique.

Dans le sperme, les DAO proviennent essentiellement des PN. La signification physiopathologique de la présence de ces cellules dans le sperme est très controversée notamment en ce qui concerne leur influence sur la fertilité masculine.

La capacité des PN à produire de fortes quantités de DAO dépend de leur état d'activation immunologique. En effet, selon leur origine, les PN ont été en contact avec des environnements cellulaires et moléculaires différents, notamment des cytokines, connues pour réguler les fonctions des PN (IL-8 favorise la synthèse des DAO, effet de *priming*).

Compte tenu de leur capacité de synthèse des DAO, il apparaît que les PN séminaux possèdent une NADPH-oxydase fonctionnelle. Lorsque les spermatozoïdes et les autres cellules sont séparées du liquide séminal au cours de protocoles d'AMP, la présence de PN peut alors se révéler très nocive puisque les spermatozoïdes ne sont plus entourés de leur milieu protecteur et ne possèdent eux-mêmes que de faibles défenses cytoplasmiques. Pour certains auteurs, la présence de leucocytes contaminant les préparations de spermatozoïdes lavés est un facteur déterminant quant au résultat d'une fécondation *in-vitro* [55, 81].

La présence de DAO dans le sperme humain est une question d'équilibre : une production faible et contrôlée par les spermatozoïdes est nécessaire à leur fonction alors qu'une production élevée par les PN est néfaste. La régulation quantitative et chronologique de la production des DAO par les spermatozoïdes semble être un élément fondamental de leur physiologie.

III. FONCTION ANTIOXYDANTE DES PROSTASOMES : UNE NOUVELLE FONCTION PHYSIOLOGIQUE.

Les travaux de Skibinski *et al.* [78] montraient une capacité des prostasomes à inhiber la production d' $O_2^\circ-$ par des PN et des monocytes sanguins stimulés par un ester de phorbol (le PMA) ou par un tripeptide formylé (le fMLP). Cependant, les auteurs n'ont pas effectué de mesures sur les PN du sperme et n'ont pas non plus précisé les mécanismes d'action susceptibles d'être mis en jeu. Ce travail nous a toutefois servi de base pour initier une recherche sur la capacité antioxydante des prostasomes et les conséquences éventuelles sur les spermatozoïdes, selon deux axes principaux :

- rechercher une activité antioxydante des prostasomes sur les PN séminaux et préciser leur niveau d'action. Ces études nous ont conduit à développer des modèles sur des PN sanguins pour préciser les interactions entre les PN et les prostasomes ;
- préciser un rôle possible des prostasomes sur la capacitation des spermatozoïdes, qui nécessite des conditions oxydatives particulières, puisque selon leur niveau de production, les DAO peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères.

1. Les prostasomes et les PN

La première étape de notre travail a consisté à évaluer la capacité des prostasomes à inhiber la production de DAO des PN séminaux. Pour cela, la production radicalaire totale de suspensions cellulaires obtenues à partir de spermatozoïdes contenant des quantités variables de PN a été appréciée par chimiluminescence au luminol [76]. La quantité de DAO produits est en relation avec la concentration en PN. La présence d'une concentration physiologique de prostasomes dans le milieu réactionnel inhibe la production des DAO par les cellules, aussi bien à l'état basal qu'après stimulation par le PMA. Nos résultats ont clairement montré, en accord avec les données de la littérature, que les PN sont la source majeure des DAO dans le sperme. De plus, l'inhibition par les prostasomes de la production totale de DAO par des PN non stimulés permet d'envisager un effet

antioxydant des prostasomes *in-vivo*. La capacité antioxydante des prostasomes met en jeu un mécanisme original puisque nous avons vérifié qu'il ne s'agissait pas d'une activité de type piègeur de DAO. En effet, les prostasomes ne captent pas les DAO produits à flux constant en milieu aqueux par une molécule particulière, l'ABAP (2-2'-azobis-2-amidinopropane dihydrochloride).

L'inhibition de la production de DAO par les PN est accompagnée d'un effet sur la dynamique membranaire de ces cellules. Au contact des prostasomes, la membrane plasmique des PN sanguins subit une rigidification, mise en évidence par résonance paramagnétique électronique ([76], Figure 2). Les PN sanguins ont été utilisés ici car cette mesure nécessite l'emploi de cellules pures, et il n'a pas été possible d'obtenir des suspensions de PN séminaux répondant à ce critère, des spermatozoïdes contaminant toujours ces suspensions. La rigidification observée est probablement due à un transfert de lipides à caractère rigidifiant des prostasomes vers les PN.

Dans le but de préciser le site d'action des prostasomes, nous avons recherché si la diminution de production globale de DAO provenait d'une diminution de l'activité de la principale enzyme productrice des DAO, la NADPH-oxydase. L'action des prostasomes sur l'activité de la NADPH-oxydase a été testée sur des PN sanguins stimulés au PMA, et mesurée par chimiluminescence au MCLA ([77], Figure 3). Dans ces conditions, la Lag-phase ainsi que l'activité totale de l'enzyme sont inhibées. La Lag-phase est le paramètre caractéristique de l'activation de l'enzyme, elle correspond à l'assemblage de l'enzyme active dans les vésicules sécrétrices et à l'exocytose de ces vésicules. Dans des conditions normales, la Lag-phase de la NADPH-oxydase des PN est d'environ 30 secondes. La présence des prostasomes provoque une augmentation de la Lag-phase qui est d'autant plus importante que la dose de prostasomes est élevée. L'activité totale de l'enzyme est également significativement diminuée, selon la concentration de prostasomes utilisée. La capacité d'inhibition des prostasomes est conservée après un traitement de 5 min à 100°C, ce qui signifie que l'effet inhibiteur n'est pas d'origine protéique.

Les expériences réalisées sur les PN sanguins ont servi à mettre au point les différents protocoles à partir d'un modèle enzymatique connu. L'application de ces méthodes aux PN séminaux a contribué à mieux les caractériser. L'activité NADPH-oxydase de suspensions cellulaires isolées de spermatozoïdes contenant des PN et stimulées au PMA est comparable à celle des PN sanguins, ce qui signifie que la NADPH-oxydase des PN séminaux est fonctionnelle. Les caractéristiques cinétiques et d'activation de l'enzyme sont comparables à celles de la NADPH-oxydase des PN sanguins, avec par exemple une Lag-phase de 31 ± 7 secondes (séminaux) versus 32 ± 2 secondes (sanguins). Par contre, l'activité totale de l'enzyme est légèrement inférieure pour les PN séminaux, ce qui pourrait traduire une différence dans la régulation de l'activité enzymatique entre ces deux types cellulaires après stimulation par le PMA.

Lorsque les PN sanguins sont activés par le fMLP, l'activité de la NADPH-oxydase est également inhibée de façon significative par les prostasomes. Par contre, pour les PN séminaux, la présence des prostasomes n'entraîne pas une inhibition significative de l'activité NADPH-oxydase, pour laquelle il existe des différences inter-individuelles très importantes. Celles-ci peuvent être liées à la qualité membranaire très variable de ces cellules en relation avec leur origine, ou à cause d'un contact préalable avec les prostasomes puisque nous avons travaillé sur du sperme éjaculé, ayant subi une période de liquéfaction de 30 minutes.

L'effet inhibiteur des prostasomes sur la production de DAO par les PN sanguins s'explique donc par une diminution de l'activité NADPH-oxydase. L'inhibition est vérifiée pour les deux stimuli utilisés, le PMA et le fMLP. Ce dernier est un activateur d'une voie de transduction physiologique pouvant être activée dans le liquide séminal au cours d'une leucocytospermie, ce qui est en faveur d'un rôle physiologique des prostasomes. Indirectement, ils interviennent dans la protection des spermatozoïdes humains vis à vis du stress oxydant. Cette propriété des prostasomes explique probablement pour une part la forte capacité anti-

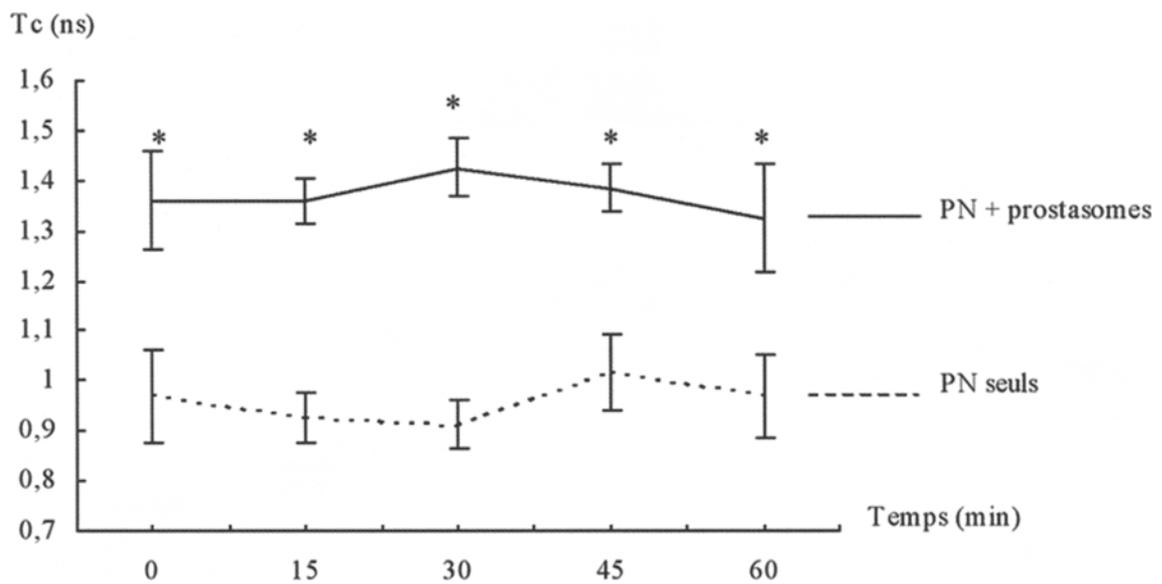


Figure 2 : Evolution de la dynamique membranaire évaluée par le temps de corrélation-relaxation (T_c), au cours du temps, de PN sanguins mis en présence ou non de prostasomes ($130\mu\text{M}$ d'équivalent cholestérol). T_c a été mesuré par résonance paramagnétique électronique avec la sonde 16NS (acide 16-doxy-stéarique). Chaque valeur est la moyenne \pm ESM de quatre mesures indépendantes. $p < 0.05$ comparé à la valeur de référence correspondante. Saez et al., 1998.

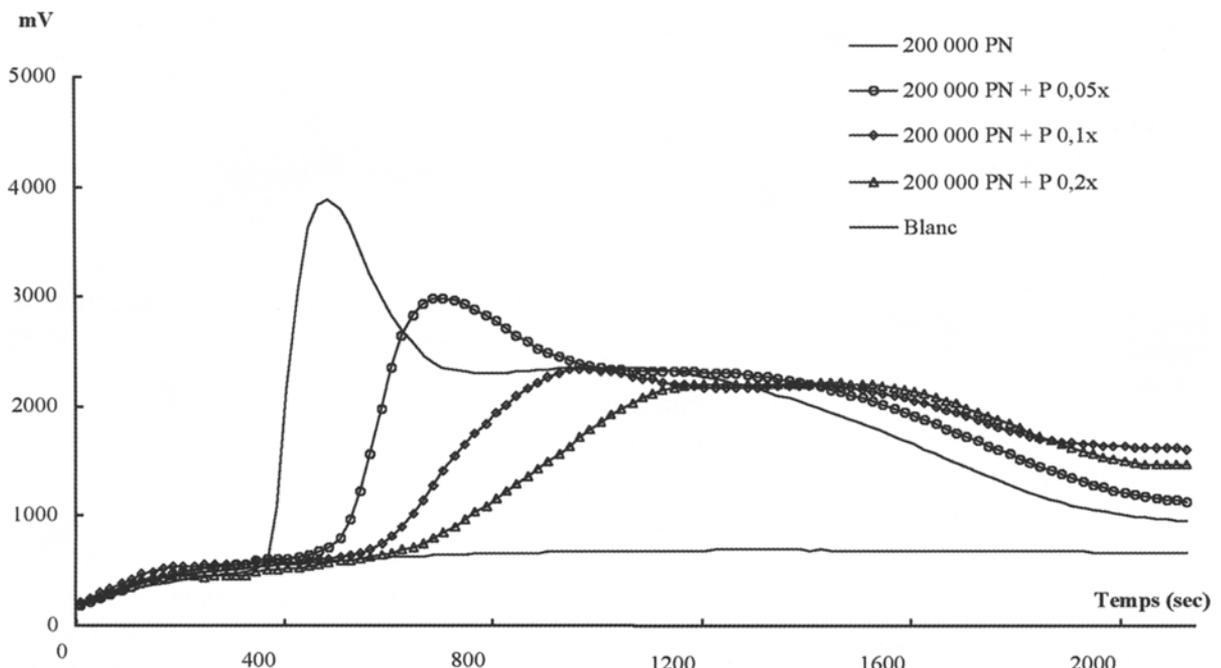


Figure 3 : Chimiluminescence au MCLA de PN sanguins stimulés par 80nM de PMA, effet de différentes concentrations de prostasomes. La durée de la Lag-phase est mentionnée pour la courbe obtenue avec 200000 PN et la concentration $P0,02x$ de prostasomes (soit $0,02$ fois la concentration physiologique normale). Un profil similaire a été obtenu en chimiluminescence au luminol après stimulation par le PMA. Les courbes obtenues pour les PN séminaux ont le même profil que pour les PN sanguins. Les courbes sont représentatives de six et dix mesures différentes pour les PN sanguins et séminaux, respectivement. Saez et al., 2000.

oxydante du liquide séminal et elle pourrait trouver une application lors de la préparation des spermatozoïdes au cours de protocoles d'AMP.

2. Les prostasomes et les spermatozoïdes :

La production contrôlée de DAO est nécessaire à la capacitation et à la réaction acrosomique des spermatozoïdes, deux événements importants pour leur fonction. Par contre, une production trop élevée de DAO est toxique pour les spermatozoïdes. Compte tenu des résultats obtenus avec les PN, un rôle des prostasomes sur la capacitation, via le niveau de stress oxydant, pouvait logiquement s'envisager.

Nous avons utilisé le NADPH pour stimuler la synthèse d'O₂^{°-} de deux populations de spermatozoïdes isolées par migration sur gradients de Percoll, pour rechercher une influence potentielle des prostasomes sur cette synthèse. Des spermatozoïdes de la fraction 95% et de l'interface 95-65% d'un gradient discontinu de Percoll ont été mis en présence de 2,5mM de NADPH et la production d'O₂^{°-} a été mesurée par chimiluminescence en utilisant la lucigénine. La capacitation des spermatozoïdes a aussi été estimée dans ces conditions, en évaluant la

réaction acrosomique induite par l'ionophore calcique A23187. Dans la littérature, les études concernant l'effet du NADPH sur la capacitation et la production d'O₂^{°-} des spermatozoïdes ont conduit à des résultats discordants. Griveau et Le Lannou [43] ont montré une stimulation de la production d'O₂^{°-} par le NADPH exogène avec une inhibition de la capacitation, en fonction des doses de NADPH et de la pression partielle en oxygène. Pour Aitken *et al.* [7], l'ajout de NADPH exogène déclenche une synthèse d'O₂^{°-} par les spermatozoïdes mais n'a aucun effet positif sur la capacitation. Finalement, de Lamirande *et al.* [32] ont des résultats opposés puisque le NADPH stimule la capacitation sans provoquer d'accroissement de la synthèse d'O₂^{°-}.

D'après nos premiers résultats, il existerait une corrélation négative entre la production d'anion superoxyde NADPH-dépendante des spermatozoïdes et leur capacité à effectuer la réaction acrosomique stimulée (Figure 4). Dans ces conditions de stress oxydant, les prostasomes inhibent la production d'anion superoxyde et favorisent la réaction acrosomique. Ils exerceraient ainsi un effet protecteur sur les spermatozoïdes.

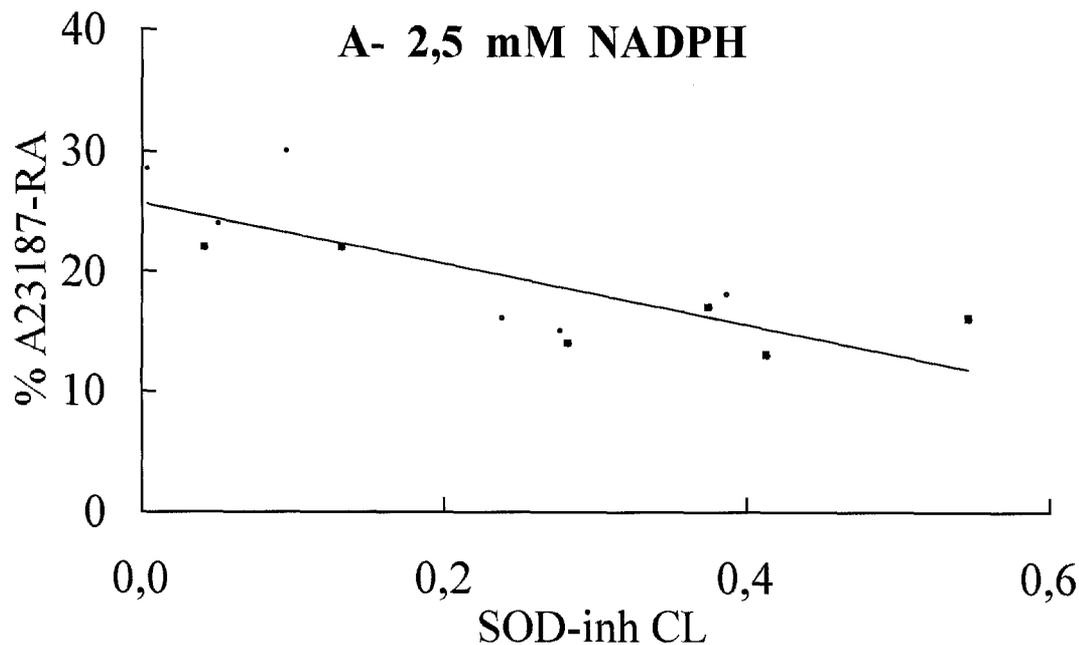


Figure 4 : Corrélation entre la chimiluminescence inhibable par la SOD (SOD-inh CL) et la réaction acrosomique stimulée par l'ionophore calcique A-23187 (% A23187-RA) des spermatozoïdes obtenus après migration sur gradient de Percoll et traités par 2,5mM de NADPH.

• spermatozoïdes de la fraction 95% du Percoll

■ spermatozoïdes de l'interface 65%-95% du gradient de Percoll.

La capacité antioxydante des prostasomes observée sur les PN est retrouvée sur les spermatozoïdes et apparaît bénéfique pour ces cellules. Les prostasomes limiteraient l'effet délétère des DAO sur les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes humains soumis à un stress oxydant. La base moléculaire de ce phénomène reste à déterminer.

IV. CONCLUSION

Les prostasomes présents dans le liquide séminal humain ne sont pas encore totalement caractérisés d'un point de vue fonctionnel. Les travaux que nous avons développés avaient pour but de rechercher un rôle éventuel des prostasomes dans le stress oxydant, connu pour être néfaste à l'activité fonctionnelle des spermatozoïdes. Nos résultats ont permis de caractériser la capacité antioxydante des prostasomes sur les PN sanguins (utilisés comme modèle) et sur les PN séminaux. Ils ont apporté des éléments de réponse importants quant à leur mode d'action : les prostasomes agissent au niveau de la production et non au niveau de l'élimination des DAO. La composition lipidique des prostasomes s'avère comme un élément clé, responsable de leur capacité antioxydante, et probablement d'autres fonctions biologiques (mobilité des spermatozoïdes, fusion avec les spermatozoïdes et interaction avec les PN).

Dans des conditions pathologiques (anomalies morphologiques et oligozoospermie), les spermatozoïdes produisent des quantités anormalement élevées de DAO, qui sont à l'origine d'une perte de la capacité fonctionnelle de ces cellules. Des résultats préliminaires semblent montrer, à partir de spermatozoïdes isolés par migration sur gradient de Percoll et dont la production de DAO est stimulée par le NADPH, que les prostasomes exercent une action directe sur les spermatozoïdes. Ils protégeraient certaines capacités fonctionnelles des spermatozoïdes face à un stress oxydant.

L'ensemble de ces travaux montre que les prostasomes, de par leur propriété antioxydante, jouent un rôle physiologique dans le sperme humain.

1. AITKEN, R.J., CLARKSON, J.S.: Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1987, 81: 459-69.
2. AITKEN, R.J., CLARKSON, J.S., FISHEL, S.: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod*, 1989, 41: 183-97.
3. AITKEN, R.J., WEST, K.M.: Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl*, 1990, 13: 433-51.
4. AITKEN, R.J., BUCKINGHAM, D.W., WEST, K.M.: Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol*, 1992, 151: 466-77.
5. AITKEN, R.J., HARKISS, D., BUCKINGHAM, D.: Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil*, 1993, 98: 257-65.
6. AITKEN, R.J., PATERSON, M., FISHER, H., BUCKINGHAM, D.W., VAN DUIN, M.: Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*, 1995, 108: 2017-25.
7. AITKEN, R.J., FISHER, H.M., FULTON, N., GOMEZ, E., KNOX, W., LEWIS, B., IRVINE, S.: Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47: 468-82.
8. AITKEN, R.J., HARKISS, D., KNOX, W., PATERSON, M., IRVINE, D.S.: A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*, 1998, 111: 645-56.
9. AITKEN, R.J.: The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J Reprod Fertil*, 1999, 115: 1-7.
10. ALVAREZ, J.G., TOUCHSTONE, J.C., BLASCO, L., STOREY, B.T.: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*, 1987, 8: 338-48.
11. ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T.: Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res*, 1989, 23: 77-90.

12. ARIENTI, G., CARLINI, E., PALMERINI, C.A.: Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *J Membr Biol*, 1997, 155: 89-94.
13. ARIENTI, G., POLCI, A., CARLINI, E., PALMERINI, C.A.: Transfer of CD26/dipeptidyl peptidase IV (E.C. 3.5.4.4) from prostasomes to sperm. *FEBS Lett*, 1997, 410: 343-6.
14. ARIENTI, G., CARLINI, E., DE COSMO, A.M., DI PROFIO, P., PALMERINI, C.A.: Prostate-like particles in stallion semen. *Biol Reprod*, 1998, 59: 309-13.
15. ARIENTI, G., CARLINI, E., POLCI, A., COSMI, E.V., PALMERINI, C.A.: Fatty acid pattern of human prostate lipid. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 358: 391-5.
16. ARIENTI, G., CARLINI, E., SACCARDI, C., PALMERINI, C.A.: Interactions between prostasomes and leukocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1425: 36-40.
17. ARVIDSON, G., RONQUIST, G., WIKANDER, G., OJTEG, A.C.: Human prostate membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 984: 167-73.
18. BARRAT, C.L.R., HORNBY, D.A. Induction of the human acrosome reaction by rhu-ZP3. In *Human sperm acrosome reaction*, Volume Colloque INSERM n° 236 (P. Fénichel and J. Parinaud, eds), John Libbey Eurotext Ltd., 1995: 105-112.
19. BIELFELD, P., JEYENDRAN, R.S., ZANEVELD, L.J.: Human spermatozoa do not undergo the acrosome reaction during storage in the cervix. *Int J Fertil*, 1991, 36: 302-6.
20. BREITBART, H., RUBINSTEIN, S.: Characterization of Mg²⁺- and Ca²⁺-ATPase activity in membrane vesicles from ejaculated ram seminal plasma. *Arch Androl*, 1982, 9: 147-57.
21. BRODY, I., RONQUIST, G., GOTTFRIES, A.: Ultrastructural localization of the prostate - an organelle in human seminal plasma. *Ups J Med Sci*, 1983, 88: 63-80.
22. CARLINI, E., PALMERINI, C.A., COSMI, E.V., ARIENTI, G.: Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys* 1997, 343: 6-12.
23. CARLSSON, L., RONQUIST, G., STRIDSBERG, M., JOHANSSON, L.: Motility stimulant effects of prostate inclusion in swim-up medium on cryopreserved human spermatozoa. *Arch Androl*, 1997, 38: 215-21.
24. CROSS, N.L.: Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod*, 1996, 54: 138-45.
25. CROSS, N.L.: Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness. *Mol Reprod Dev*, 1996, 45: 212-7.
26. CROSS, N.L., MAHASRESHTI, P.: Prostate fraction of human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone. *Arch Androl*, 1997, 39: 39-44.
27. DAVIS, B.K.: Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. In *The pharmacological Effects of lipids* (K. JK, ed) JAOCS, Champaign, 1978: 145-157.
28. DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C.: A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl*, 1993, 16: 21-5.
29. DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C.: Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*, 1993, 14: 157-66.
30. DE LAMIRANDE, E., EILEY, D., GAGNON, C.: Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl*, 1993, 16: 258-66.
31. DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C.: Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18: 487-95.
32. DE LAMIRANDE, E., HARAKAT, A., GAGNON, C.: Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J Androl*, 1998, 19: 215-25.
33. FABIANI, R., JOHANSSON, L., LUNDKVIST, O., RONQUIST, G.: Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostate inclusion in swim-up medium. *Hum Reprod*, 1994, 9: 1485-9.
34. FABIANI, R., JOHANSSON, L., LUNDKVIST, O., ULMSTEN, U., RONQUIST, G.: Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1994, 57: 181-8.
35. FERNANDEZ, J.A., HEEB, M.J., RADTKE, K.P., GRIFFIN, J.H.: Potent blood coagulant activity of human semen due to prostate-bound tissue factor. *Biol Reprod*, 1997: 56: 757-63.
36. FORD, W.C., WHITTINGTON, K., WILLIAMS, A.C.: Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int J Androl*, 1997, 20: 44-9.
37. FORNES, M.W., DE ROSAS, J.C.: Interactions between rat epididymal epithelium and spermatozoa. *Anat Rec*, 1991, 231: 193-200.
38. FRENETTE, G., DUBE, J.Y., TREMBLAY, R.R.: Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 838: 270-6.
39. GOMEZ, E., BUCKINGHAM, D.W., BRINDLE, J., LANZAFAME, F., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J.:

- Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*, 1996, 17: 276-87.
40. GRIVEAU, J.F., RENARD, P., LE LANNOU, D.: An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl*, 1994, 17: 300-7.
 41. GRIVEAU, J.F., DUMONT, E., RENARD, P., LE LANNOU, D.: Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1995, 103: 17-26.
 42. GRIVEAU, J.F., RENARD, P., LE LANNOU, D.: Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *Int J Androl*, 1995, 18: 67-74.
 43. GRIVEAU, J.F., LE LANNOU, D.: Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. *Int J Androl*, 1997, 20: 195-200.
 44. GRIZARD, G., SION, B., BAUCHART, D., BOUCHER, D.: Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chrom B*, 2000, 740: 101-107.
 45. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989.
 46. HUGHES, C.M., LEWIS, S.E., MCKELVEY-MARTIN, V.J., THOMPSON, W.: A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2: 613-9.
 47. IRVINE, D.S., TWIGG, J.P., GORDON, E.L., FULTON, N., MILNE, P.A., AITKEN, R.J.: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, 2000, 21: 33-44.
 48. IWASAKI, A., GAGNON, C.: Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*, 1992, 57: 409-16.
 49. JEULIN, C., SOUFIR, J.C., WEBER, P., LAVAL-MARTIN, D., CALVAYRAC, R.: Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res*, 1989, 24: 185-96.
 50. KELLY, R.W.: Immunomodulators in human seminal plasma: a vital protection for spermatozoa in the presence of infection? *Int J Androl*, 1999, 22: 2-12.
 51. KESSOPOULOU, E., TOMLINSON, M.J., BARRATT, C.L., BOLTON, A.E., COOKE, I.D.: Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fertil*, 1992, 94: 463-70.
 52. KOBAYASHI, T., MIYAZAKI, T., NATORI, M., NOZAWA, S.: Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod*, 1991, 6: 987-91.
 53. KOBAYASHI, T., ROBINSON, J.M., SEGUCHI, H.: Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J Cell Sci*, 1998, 111: 81-91.
 54. KODAMA, H., YAMAGUCHI, R., FUKUDA, J., KASAI, H., TANAKA, T.: Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*, 1997, 68: 519-24.
 55. KRAUSZ, C., GERVASI, G., FORTI, G., BALDI, E.: Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum Reprod*, 1994, 9: 471-6.
 56. LECLERC, P., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C.: Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl*, 1998, 19: 434-43.
 57. LETERRIER, F., GARY-BOBO, C. *Biologie Membranaire : Structure et Dynamique des Membranes Biologiques*. Hermann, 1989.
 58. LINDAHL, M., TAGESSON, C., RONQUIST, G.: Phospholipase A2 activity in prostasomes from human seminal plasma. *Urol Int*, 1987, 42: 385-9.
 59. MACLEOD, J.: The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am. J. Physiol*, 1943, 138: 512-518.
 60. MEIZEL, S., PILLAI, M., DIAZ-PEREZ, E., THOMAS, P.: Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In *Fertilization in mammals* (B. D. Bavister, J. Cummins and E. R. S. Roldan, eds), Serono Symposia, Norwell, MA, USA, 1990: 205-202.
 61. MINELLI, A., MORONI, M., MARTINEZ, E., MEZZASOMA, I., RONQUIST, G.: Occurrence of prostatic-like membrane vesicles in equine seminal plasma. *J Reprod Fertil*, 1998, 114: 237-43.
 62. NILSSON, B.O., JIN, M., RONQUIST, G.: Immunolocalization of prostasomes in the human prostate. *Ups J Med Sci*, 1996, 101: 149-57.
 63. OCHSENDORF, F.R., THIELE, J., FUCHS, J., SCHUTTAU, H., FREISLEBEN, H.J., BUSLAU, M., MILBRADT, R.: Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia*, 1994, 26: 289-93.
 64. OCHSENDORF, F.R.: Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 1999, 5: 399-420.
 65. OSHEROFF, J.E., VISCONTI, P.E., VALENZUELA, J.P., TRAVIS, A.J., ALVAREZ, J., KOPF, G.S.: Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5: 1017-26.
 66. PALMERINI, C.A., CARLINI, E., NICOLUCCI, A., ARIENTI, G.: Increase of human spermatozoa intracellular Ca²⁺ concentration after fusion with prostasomes. *Cell Calcium*, 1999, 25: 291-6.

67. PLANTE, M., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C.: Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril*, 1994, 62: 387-93.
68. RENNEBERG, H., KONRAD, L., DAMMSHAUSER, I., SEITZ, J., AUMULLER, G.: Immunohistochemistry of prostasomes from human semen. *Prostate*, 1997, 30: 98-106.
69. RONQUIST, G., BRODY, I., GOTTFRIES, A., STEGMAYR, B.: An Mg²⁺ and Ca²⁺-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part I. *Andrologia*, 1978, 10: 261-72.
70. RONQUIST, G., BRODY, I.: The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 822: 203-18.
71. RONQUIST, G.: Zinc ion stimulation of ATP cleavage by prostasomes from human seminal plasma. *Urol Int*, 1988, 43: 334-40.
72. RONQUIST, G., NILSSON, B.O., HJERTEN, S.: Interaction between prostasomes and spermatozoa from human semen. *Arch Androl*, 1990, 24: 147-57.
73. RONQUIST, G., FABIANI, R., JIN, M., NILSSON, B.O., ELENBRING, K., HJERTEN, S. Adherence of human prostasomes to mouse spermatozoa and their displacement by monoclonal antibodies as revealed by free zone electrophoresis. *Arch Androl*, 1996, 36: 101-7.
74. ROONEY, I.A., ATKINSON, J.P., KRUL, E.S., SCHONFELD, G., POLAKOSKI, K., SAFFITZ, J.E., MORGAN, B.P.: Physiologic relevance of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 in human seminal plasma: CD59 is present on extracellular organelles (prostasomes), binds cell membranes, and inhibits complement-mediated lysis. *J Exp Med*, 1993, 177: 1409-20.
75. ROONEY, I.A., HEUSER, J.E., ATKINSON, J.P.: GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells. *J Clin Invest*, 1996, 97: 1675-86.
76. SAEZ, F., MOTTA, C., BOUCHER, D. AND GRIZARD, G.: Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4: 667-672.
77. SAEZ, F., MOTTA, C., BOUCHER, D. AND GRIZARD, G.: Prostasomes inhibit the NADPH-oxidase activity of human neutrophils. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6: 883-891.
78. SKIBINSKI, G., KELLY, R.W., HARKISS, D., JAMES, K.: Immunosuppression by human seminal plasma—extracellular organelles (prostasomes) modulate activity of phagocytic cells. *Am J Reprod Immunol*, 1992, 28: 97-103.
79. STEGMAYR, B., RONQUIST, G.: Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res*, 1982, 10: 253-7.
80. STRIDSBERG, M., FABIANI, R., LUKINIUS, A., RONQUIST, G.: Prostasomes are neuroendocrine-like vesicles in human semen. *Prostate*, 1996, 29: 287-95.
81. SUKCHAROEN, N., KEITH, J., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J.: Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil Steril*, 1995, 63: 1293-300.
82. SUN, J.G., JURISICOVA, A., CASPER, R.F.: Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 1997, 56: 602-7.
83. THOMAS, J., FISHEL, S.B., HALL, J.A., GREEN, S., NEWTON, T.A., THORNTON, S.J.: Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum Reprod*, 1997, 12: 2418-21.
84. TWIGG, J., FULTON, N., GOMEZ, E., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J.: Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod*, 1998, 13: 1429-36.
85. VAISSIERE, C., LE CABEC, V., MARIDONNEAU-PARINI, I.: NADPH oxidase is functionally assembled in specific granules during activation of human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 1999, 65: 629-34.
86. VICARI, E.: Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Hum Reprod*, 1999, 14: 2025-30.
87. WHITTINGTON, K., FORD, W.C.: Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl*, 1999, 22: 229-35.
88. WOLFF, H.: The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*, 1995, 63: 1143-57.
89. ZALATA, A., HAFEZ, T., COMHAIRE, F.: Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod*, 1995, 10: 1444-51.
90. ZALATA, A.A., CHRISTOPHE, A.B., DEPUYDT, C.E., SCHOONJANS, F., COMHAIRE, F.H.: White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl*, 1998, 21: 154-62.
91. ZINI, A., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C.: Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*, 1993, 16: 183-8.

ABSTRACT

Prostasomes, reactive oxygen species and human semen

F. SAEZ, G. GRIZARD, D. BOUCHER

Prostasomes are particular lipid vesicles secreted by the human prostate and found in the semen. No specific action has yet been attributed to prostasomes, but they appear to act at various levels. For example, prostasomes enhance sperm motility in vitro and participate in the immunomodulation properties of seminal plasma.

Excessive production of reactive oxygen species (ROS) in human semen has a negative influence on the functional capacities of spermatozoa. The presence of leukocytes in semen is associated with increased production of ROS that can be harmful to sperm cells, under certain conditions. Previous results tend to suggest a possible role of prostasomes on ROS production in human semen.

After reviewing the literature concerning the structural and functional characteristics of prostasomes and the role of ROS in human semen, we report our results concerning the influence of prostasomes on ROS production and the consequences on semen. We have demonstrated that prostasomes exert an antioxidant function in human semen. This function is effective both on polymorphonuclear neutrophils and on sperm cells. The mechanism of action of prostasomes is unusual, as they act on ROS production mainly on the plasma membranes of neutrophils. They induce a decrease of NADPH-oxidase activity associated with rigidification of the plasma membrane. Prostasomes protect the functional capacities of spermatozoa during an oxidative stress created by the presence of NADPH in the incubation medium.

***Key Words:* prostasomes; reactive oxygen species; NADPH-oxidase; human spermatozoa; chemiluminescence.**