

L'irradiation des spermatozoïdes au Laser HeNe à faible énergie chez la souris et chez l'homme.

Y. SOFFER ¹, R. LUBART ², H. BREITBART ³

1 Centre d'infertilité masculine, Centre médical Assaf Harofé, Zerifin, Faculté de médecine Sackler, Université de Tel Aviv, 2 Faculté des sciences physiques et 3 Faculté des sciences de la vie, Université Bar Ilan, Ramat Gan, Israël

RÉSUMÉ

L'irradiation de lignées somatiques diverses, de spermatozoïdes et des cellules embryonnaires au laser HeNe de faible énergie (LFE) agirait sur des aspects divers de leur métabolisme cellulaire. Cette action porterait notamment sur l'activité proliférative et respiratoire, ainsi que la synthèse de l'ATP ou l'afflux intracellulaire de Ca^{2+} . Le but de ce travail est d'examiner les effets de l'irradiation au LFE : 1) sur le pouvoir fécondant *in vitro* des spermatozoïdes de souris en fécondation *in vitro* (FIV) et 2) sur le pouvoir fusiogénique des spermatozoïdes humains dans l'épreuve du hamster (Sperm-zona free hamster egg penetration assay, SPA). Dans le système de FIV, des ovocytes de souris ont été incubés pendant 24 heures avec des spermatozoïdes épидидymaires homologues irradiés ou non. L'irradiation a accru le pourcentage des œufs fécondés *in vitro* ainsi que le taux du Ca^{2+} intracellulaire impliquant ainsi l'activation du transport mitochondrial du Ca^{2+} et la génération de molécules d' H_2O_2 . Dans l'épreuve de fusiogénicité, des ovocytes dépellucidés de hamster ont été incubés pendant trois heures avec des spermatozoïdes irradiés ou non de 43 hommes investigués pour infécondité. Dans 16 cas de faible fusiogénicité sans irradiation, l'irradiation a augmenté le pourcentage de fusion des spermatozoïdes avec les ovocytes de hamster. Dans 27 cas de fusiogénicité normale, l'irradiation n'a

eu aucun effet significatif. Ainsi, si cette irradiation est bénéfique chez la souris en FIV, cet effet bénéfique ne se manifeste chez l'homme en SPA que sur les spermatozoïdes déficients.

Mots Clés : Spermatozoïdes humains/de souris ; Laser He-Ne ; FIV murine ; Ca^{2+} intracellulaire ; Epreuve du Hamster ;

I. INTRODUCTION

L'effet des radiations lumineuses et électromagnétiques ont été étudiés sur des éléments cellulaires, des cellules somatiques et des spermatozoïdes. Comme en témoignent plusieurs études faites avec les rayons ultraviolets [34] sur des lymphocytes, avec les rayons gamma [11, 23] ou avec les ondes électromagnétiques de fréquences radio [12] sur des spermatozoïdes de souris, l'irradiation intense et prolongée est dangereuse. L'irradiation de lym-

Correspondance : Dr. Yigal Soffer, Centre d'infertilité masculine, Centre médical Assaf Harofé, IL-70300, Zerifin, ISRAEL.
e-mail: ysoffer@post.tau.ac.il

Soutenu par des subventions du Directeur Scientifique du Ministère de la Santé (Israël).

phocytes et de granulocytes au laser He-Ne est également nocive [29] lorsqu'elle est intense et prolongée. Par contre, l'irradiation laser He-Ne de faible énergie (LFE) a été bénéfique sur diverses lignées de cellules somatiques, de spermatozoïdes et de cellules embryonnaires [25]. Ces effets se sont manifestés dans leur activité proliférative et respiratoire, la synthèse de l'ATP et l'afflux intracellulaire du Ca^{2+} . Ainsi une irradiation brève au laser He-Ne 630 nm de faible énergie accroît le transport du Ca^{2+} mitochondrial et membranaire dans les spermatozoïdes de souris [9, 10] ainsi que la réaction acrosomique des spermatozoïdes de taureaux [27]. Ces effets ne peuvent que potentialiser le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Aussi le but de ce travail est-il double :

1. mettre en évidence les effets de l'irradiation laser sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes dans un système de FIV de souris.
2. tester l'effet de cette irradiation sur les spermatozoïdes humains dans l'épreuve de fusion avec des ovocytes dépellucidés de hamster.

II. MATÉRIEL & MÉTHODES

1. SYSTÈME DE FIV MURIN : ce système a été décrit en détail [13]. En bref, des spermatozoïdes épидидymaires à la concentration de $5 \cdot 10^6/mL$ ont été irradiés pendant une à dix minutes à l'aide d'un système optique comportant une source laser HeNe 630 nm de 13 mW d'intensité lumineuse et une fibre optique plongeant dans la suspension cellulaire et délivrant une intensité de 7-8 mW.

Les effets de l'irradiation sur le métabolisme du Ca^{2+} des spermatozoïdes ont été étudiés par deux méthodes différentes [13].

La mesure des variations temporelles du Ca^{2+} intracellulaire par la microphotographie fluorescente en série des spermatozoïdes épидидymaires marqués au Fluo-3 AM (Figure 1). Une microphotographie de contrôle est prise avant l'irradiation et répétée après irradiation toutes les 30 secondes pendant 10 minutes. Une courbe d'intensité de fluorescence, reflétant fidèlement les fluctuations du Ca^{2+} intracellulaire est établie pour chaque cellule.

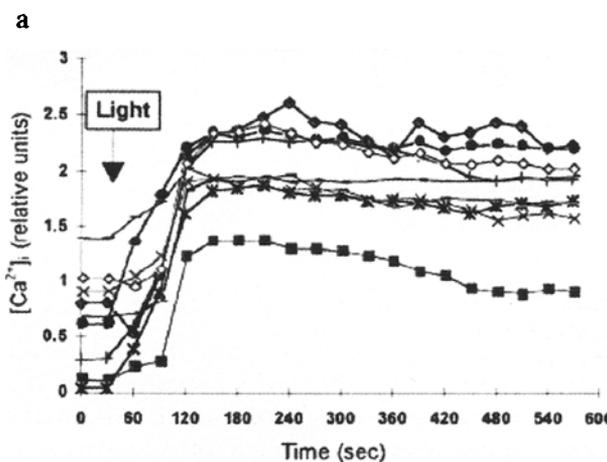
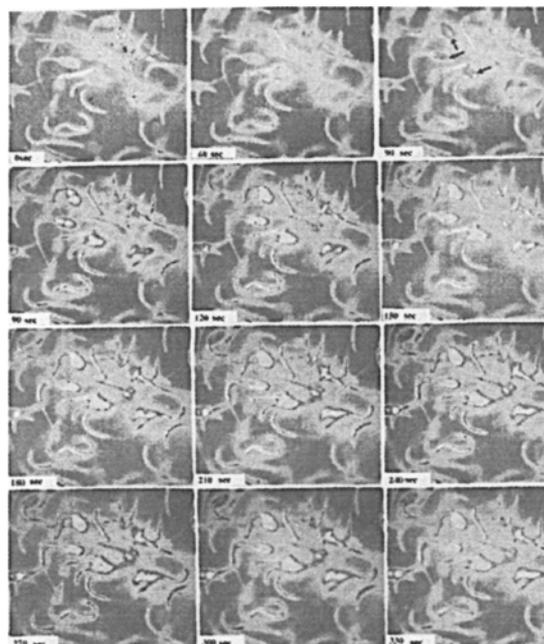
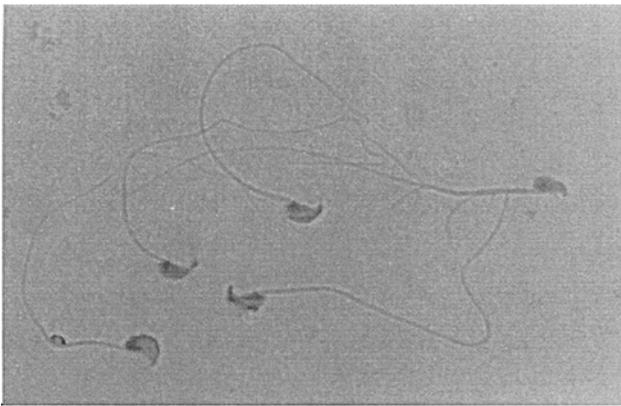


Figure 1 : *Elévation rapide du taux de Ca^{2+} intracellulaire des spermatozoïdes consécutive à une irradiation d'une minute au laser HeNe 630 de faible énergie. L'élévation du Ca^{2+} a été mesurée par la méthode de fluorescence au Fluo-3 (a) qui met en évidence le premier bond rapide et par la méthode de scintillation qui témoigne du second bond lent et plus prolongé.*

La mesure du calcium intracellulaire par la méthode de scintillation au $^{45}Ca^{2+}$. Cette mesure est effectuée sur des spermatozoïdes épидидymaires préalablement irradiés ou non et incubés avec ou sans calcium.

Après une irradiation de durée variable, le pourcentage de spermatozoïdes épидидymaires montrant une réaction acrosomique, a été évalué après incubation en milieu de capacitation [13] et coloration [24] au pisum lié à la biotine (Figure 2a). Parallèlement, des



a

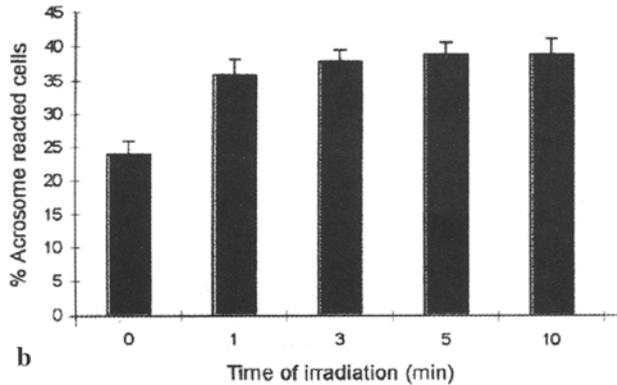
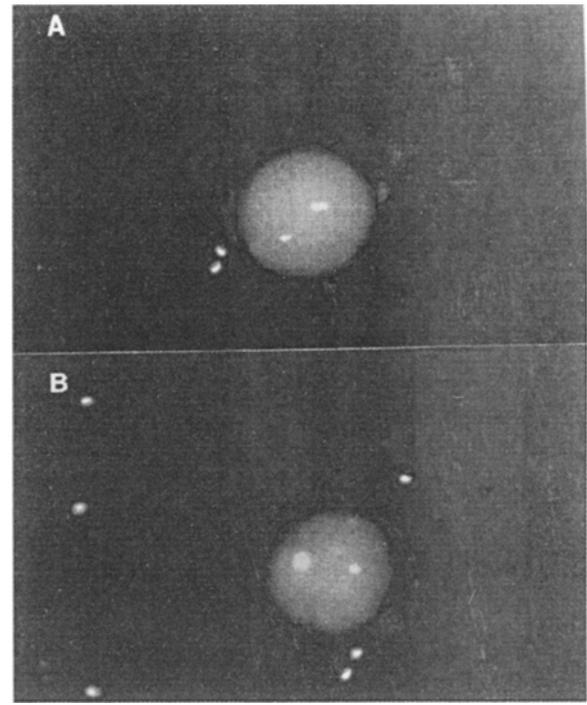


Figure 2 : Réaction acrosomique consécutive à une irradiation d'une minute au laser HeNe 630 de faible énergie et mise en évidence par la méthode de coloration au pisum lié à la biotine. Le graphique (b) montre les variations temporelles du taux de la réaction acrosomique qui s'élève rapidement et reste élevé en plateau pendant près de 10 minutes.

spermatozoïdes épидидymaires ont été incubés avec 15-20 ovocytes de souris de souche BALB/C pendant 24 heures. Les ovocytes marqués au fluorochrome Hoechst 33342 sont observés en fluorescence avant et après incubation pour dénombrer distinctement les ovocytes non fécondés en métaphase II et les ovocytes fécondés présentant un pronucléus rond (Figure 3a).

2. DANS UN GROUPE DE 43 HOMMES INFÉCONDÉS : un bilan andrologique a été mis en œuvre incluant des analyses de sperme avec les critères morphologiques stricts de Kruger [20], la recherche d'auto-anticorps fixés sur la membrane des spermatozoïdes par la technique du MAR-test (SpermMar®) [18] et des épreuves



a

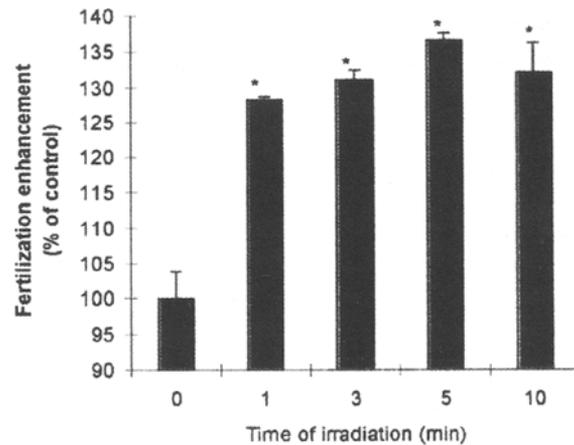


Figure 3 : Fécondation consécutive à une irradiation d'une minute au laser HeNe 630 de faible énergie mise en évidence par la méthode de fluorescence au fluoro-chorme Hoechst 33342 (a). Le graphique (b) présente les variations temporelles du taux de fécondation qui, comme la réaction acrosomique, s'élève rapidement et reste élevé en plateau pendant près de 10 minutes également.

fonctionnelles. Ces épreuves ont inclus le test [40] de l'hémizona (HZA) qui permet de déterminer le taux d'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide et l'épreuve de fusion avec les ovocytes dépellucidés [32] de hamster (SPA) qui permet de déterminer le pourcentage de pénétration des ovocytes. Dans notre

laboratoire, après incubation froide au TEST et jaune d'œuf [32] le sperme est considéré " normal " lorsque le taux de pénétration est supérieur à 30% et " faible " si le taux de pénétration est égale ou inférieure à 30%.

Les effets de l'irradiation ont été examinés sur les échantillons de sperme in vitro. Chaque échantillon a été divisé en deux parts, l'une irradiée pendant 2 minutes et l'autre non irradiée à titre de témoin. Après 3 heures d'incubation pour tous les spermatozoïdes avec les ovocytes dépellucidés, les pourcentages de pénétration des spermatozoïdes irradiés ou non ont été comparés.

III. RÉSULTATS

Effets de l'irradiation laser 630 nm He-Ne à faible énergie (LFE) sur le métabolisme du calcium des spermatozoïdes : Chez la souris, le taux du calcium intracellulaire, mesuré dans dix spermatozoïdes marqués au Fluo-3 AM et choisis au hasard, a augmenté après irradiation au LFE. La figure 1a montre l'effet de l'irradiation d'une minute sur la fluorescence d'un spermatozoïde marqué. Dès la première minute après irradiation, la fluorescence intracellulaire augmente de plus du triple et se maintient à un niveau élevé pendant plus de dix minutes.

La figure 1b montre l'effet de l'irradiation sur le taux de Ca^{2+} des spermatozoïdes épидидymaires, mesuré par la méthode de scintillation. Les spermatozoïdes ont été irradiés pour une période d'une à trente minutes. Après une minute d'irradiation, le taux de Ca^{2+} intracellulaire s'élève à pic de près de 50 %. Si l'irradiation continue, cette augmentation se poursuit plus modérément jusqu'à un maximum de 100 % au bout de 10 minutes, pour retomber à la trentième minute à son taux de base.

Effets de l'irradiation au LFE sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes : L'irradiation au LFE a augmenté d'une manière similaire le taux de réaction acrosomique (Figure 2a) ainsi que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes de souris. L'irradiation a été appliquée pendant une durée variable. La figure 2b montre un accroissement rapide du taux des spermatozoïdes montrant une réaction

acrosomique. Parallèlement, la figure 3b montre qu'après une minute d'irradiation, le taux de fécondation des ovocytes en métaphase II (Figure 3a) s'élève très rapidement, atteint un pic de 37% après 5 minutes pour retomber à 32% au bout de dix minutes.

Résultats du bilan andrologique : Dans le groupe de 43 cas examinés, le nombre total de spermatozoïdes était de $164,6 \pm 192,4$ millions par éjaculat. La mobilité du sperme était de $48,09 \pm 41,7$ % et le taux de morphologie normale, de $5,43 \pm 2,78$ %. Le taux des anticorps IgA et IgG était respectivement de $14,3 \pm 14,9$ % et $9,46 \pm 15,5$ % et le taux d'attachement à la zone pellucide à l'épreuve du HZA était de $47,0 \pm 34,5$ %. Le pourcentage de fusion des spermatozoïdes témoins non irradiés était de $51,0 \pm 34,9$ %.

Effets de l'irradiation au LFE sur le pouvoir fusiogénique des spermatozoïdes humains : Dans nos épreuves préliminaires, la durée d'irradiation optimale des spermatozoïdes humains pour l'épreuve de hamster était de deux minutes. C'est cette durée qui a été appliquée à notre groupe. Si l'on considère ce groupe dans son ensemble, il semblerait que l'irradiation ne produise aucun effet. Ainsi le pourcentage de fusiogénicité de tous les spermatozoïdes, irradiés ou non, était similaire : $49,8 \pm 39,9$ et $51,0 \pm 34,9$ % respectivement, avec une distribution symétrique des résultats après irradiation ; la fusiogénicité a augmenté dans 25 % des cas, n'a pas été modifiée dans 50%, et a diminué dans 25 % des échantillons.

Néanmoins, si l'on divise le groupe examiné selon le pourcentage de fusiogénicité des spermatozoïdes témoins, non irradiés, en deux catégories, "normale" ($SPA \geq 30$ %) et "faible" ($SPA < 30$ %), l'irradiation au LFE donne des résultats différents (Figure 4).

Les caractéristiques du sperme du groupe " faible " (16 cas) étaient les suivantes : nombre total de spermatozoïdes $154,7 \pm 266,9$ millions par éjaculat, mobilité $55,56 \pm 61,4$ %, morphologie normale $5,41 \pm 2,62$ % et taux d'anticorps IgA et IgG $13,2 \pm 15,3$ % et $7,31 \pm 9,29$ % respectivement. Le taux moyen d'attachement à la zone pellucide à l'épreuve du HZA était de

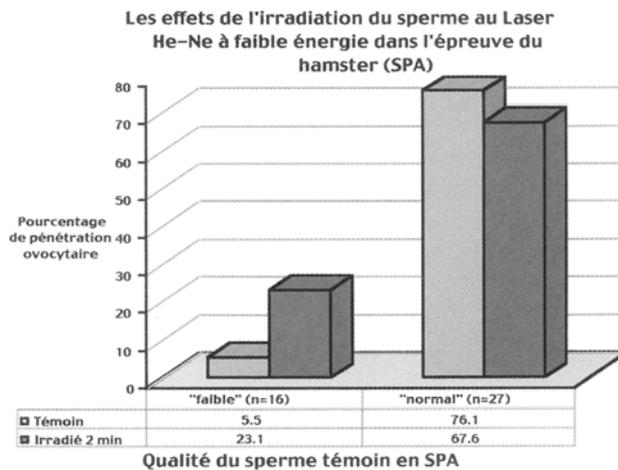


Figure 4 : Effets de l'irradiation au laser He-Ne à faible énergie pendant deux minutes sur le pouvoir fusio-génique des spermatozoïdes humains dans l'épreuve du hamster. Aucun effet significatif n'a été observé dans le groupe "normal". Par contre, dans le groupe "faible", une augmentation significative ($p < 0.0001$) du pouvoir fusio-génique a été observée après irradiation.

43,0 ± 35,4 %. Dans ce groupe, l'irradiation a augmenté la fusio-génicité de 5,5 ± 8,9 à 23,1 ± 25,2 % ($p < 0.0001$). Cette élévation a été observée dans 50 % des cas.

Dans les échantillons à fusio-génicité "normale" (27 cas), aucun effet n'a été observé après irradiation, si ce n'est une baisse non significative du taux de fusio-génicité de 76,1 ± 24,4 à 67,6 ± 28 %. Les caractéristiques de ce groupe étaient similaires au groupe précédent (p non significatif pour toutes les variables) avec un nombre total de spermatozoïdes de 171,7 ± 119,1 millions par éjaculat, une mobilité de 42,72 ± 17,2 % et une morphologie normale de 5,44 ± 2,93 %. Les taux d'anticorps IgA et IgG étaient de 15,3 ± 15,0 % et 11,3 ± 18,0 % respectivement et le taux d'attachement de 49.67 ± 34.47 %.

En conclusion, l'irradiation au LFE a eu un effet sélectif sur l'activité fusio-génique des spermatozoïdes dans les épreuves du hamster. L'irradiation a été bénéfique pour les spermatozoïdes à faible fusio-génicité, renforçant leur pouvoir de fusion dans la moitié des cas. Par contre, cette irradiation a été sans effet, ou peut être même nocive, pour les spermatozoïdes à pouvoir de

fusion normal.

IV. DISCUSSION

L'irradiation au LFE affecte la prolifération, la respiration, la synthèse de l'ATP et l'absorption du Ca^{2+} des cellules somatiques [17]. L'irradiation au laser augmente la concentration intracellulaire du Ca^{2+} des macrophages, des fibroblastes, des spermatozoïdes de bœuf [9] et de taureau [22] et provoque la bio-stimulation de gamètes et de cellules embryonnaires *in vitro* [6, 26].

Rôle du Ca^{2+} ambiant et des canaux membranaires électro-dépendants du Ca^{2+} sur le transport du Ca^{2+} dans les spermatozoïdes irradiés : L'afflux du Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule est un élément clé des cascades biochimiques sous-tendant les phénomènes de la fécondation. En effet, les fluctuations du Ca^{2+} intracellulaire jouent un rôle charnière dans le contrôle de la mobilité, de la capacitation et de la réaction acrosomique des spermatozoïdes, phénomènes indispensables de la fécondation [38]. L'élévation du Ca^{2+} consécutive à la stimulation lumineuse et l'augmentation concomitante du taux de fécondation suggèrent que la stimulation lumineuse agirait sur la fécondation par un mécanisme impliquant une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire [16]. Pour être efficace, la stimulation lumineuse requiert la présence du Ca^{2+} dans le milieu ambiant.

L'irradiation agirait en deux bonds successifs sur l'afflux du Ca^{2+} dans la cellule, le premier, immédiat et mesuré par le Fluo-3, résulterait de l'effet de la lumière sur les radicaux thiols membranaires qui aboutiraient à l'ouverture de canaux électro-indépendants [15, 16]. Le second bond, mesuré par scintillographie du Ca^{2+} marqué, impliquerait les canaux membranaires électro-dépendants du Ca^{2+} [15] comme le confirment les expériences faites en l'absence de Ca^{2+} dans le milieu ambiant, durant l'irradiation en présence de nifédipine, un inhibiteur des canaux électro-dépendants, qui abolit tout effet de la lumière sur le Ca^{2+} . Il est bien établi que les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la régulation du Ca^{2+}

intracellulaire [8, 42] et que l'énergie lumineuse du spectre visible et invisible peut être absorbée par les enzymes mitochondriales [19, 35]. La stimulation du transport du Ca^{2+} est ainsi totalement bloquée par le FCCP, un disjoncteur mitochondrial ainsi que par l'antimycine A, un inhibiteur de la respiration mitochondriale [13]. L'irradiation au laser agirait donc essentiellement sur les mécanismes de transport du Ca^{2+} mitochondrial.

Rôle des radicaux actifs d'oxygène et de leurs agents protecteurs sur le pouvoir fécondant et l'absorption du Ca^{2+} des spermatozoïdes irradiés : Chez les mammifères, le métabolisme de l'oxygène des spermatozoïdes libèrent des radicaux d'oxygène actifs et de l' H_2O_2 [1, 2, 5]. Le rôle des radicaux actifs de l'oxygène dans la stimulation lumineuse des spermatozoïdes a été analysé. Dans ce but, la dismutase (SOD) et la catalase qui sont des agents protecteurs des radicaux actifs ont été utilisés. La dismutase (SOD) convertit l'anion hyperoxyde en H_2O_2 et la catalase décompose l' H_2O_2 en eau et en oxygène le premier augmente donc la production d' H_2O_2 et la

seconde la décompose. À l'aide de ces produits, une relation de cause à effet a été démontrée entre l' H_2O_2 et les fonctions du sperme [13]. L'addition de SOD à des suspensions de sperme non irradiés stimule l'entrée du Ca^{2+} dans ces cellules (x 2.7 à la scintillographie) et augmente leur pouvoir fécondant de 30%. Par contre, l'addition de catalase, inhibe de 20 % l'entrée du Ca^{2+} dans les cellules non irradiées et diminue de 24 % leur pouvoir fécondant. Plus encore, la catalase ajoutée aux suspensions de spermatozoïdes irradiés, inhibe de 80 % l'effet stimulant de la lumière sur le métabolisme du Ca^{2+} de ces cellules et inhibe totalement la stimulation de la fécondation [13]. Analysées dans leur ensemble, ces données impliquent la participation de l' H_2O_2 dans les effets de l'irradiation [13]. Un diagramme récapitulatif (Figure 5) résume les cascades biochimiques sous-tendant les phénomènes biologiques de la fécondation. La stimulation lumineuse générerait des radicaux actifs d'oxygène qui seraient captés par la SOD endogène qui à son tour générerait de l' H_2O_2 . L'augmentation transitoire d' H_2O_2 ouvrirait les canaux membranaires de Ca^{2+} indépendants du voltage

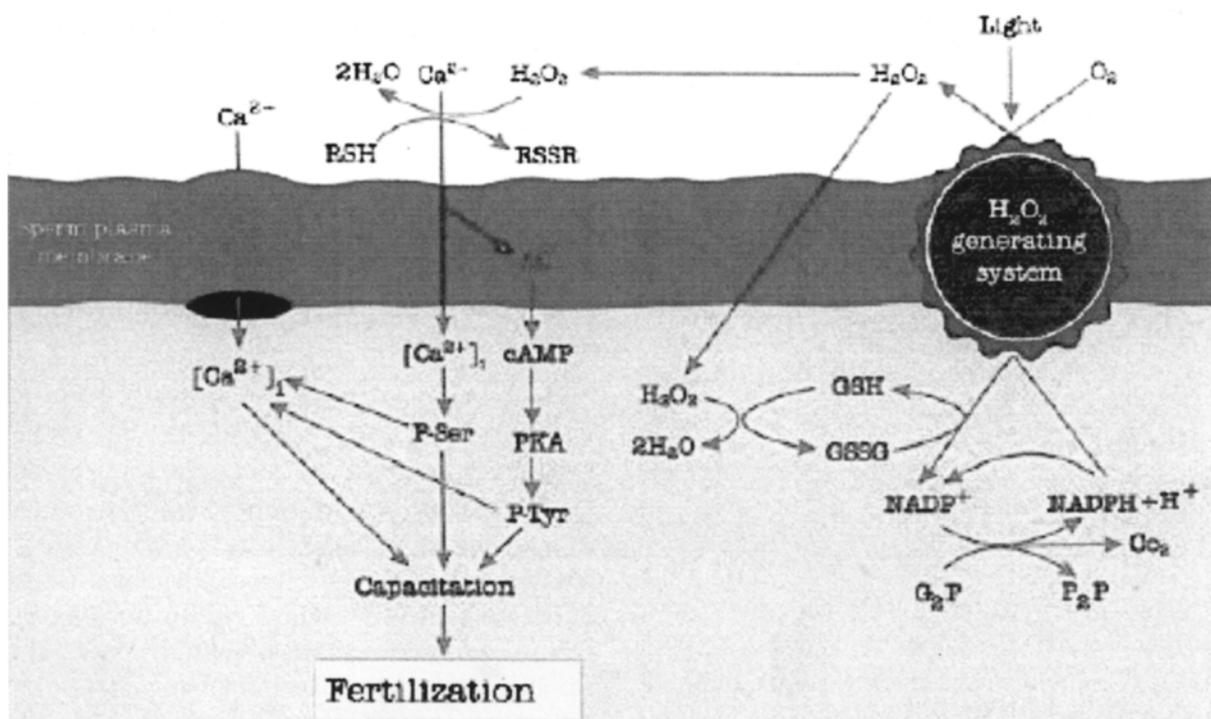


Figure 5 : Diagramme récapitulatif des cascades biochimiques reliées entre elles (cf. Discussion) et sous-tendant les phénomènes biologiques, capacitation, réaction acrosomique et fécondation qui assurent le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

électrique et serait à l'origine de l'afflux primaire immédiat de Ca^{2+} . Les modifications de l'équilibre d'oxydo-réduction des spermatozoïdes aboutiraient à l'accroissement de la phosphorylation tyrosique des protéines [4]. L' H_2O_2 , inhibiteur efficace des phosphatases tyrosiques, interfère dans les phénomènes de phosphorylation qui aboutissent à l'ouverture des canaux de Ca^{2+} électro-dépendants. L'ouverture de ces canaux est responsable de l'afflux secondaire prolongé de Ca^{2+} dans les spermatozoïdes, processus indispensable à la fécondation [31, 36, 37]. Pour conclure, l'irradiation au LFE active les réactions d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire, accroît la production d' H_2O_2 qui, à son tour, augmente l'afflux primaire et secondaire du Ca^{2+} dans les spermatozoïdes et stimule leur pouvoir fécondant, comme nous l'avons observé [13].

L'irradiation au LFE des spermatozoïdes humains : Pour des raisons évidentes, la stimulation au laser 630nm He-Ne dont l'innocuité chez l'homme n'a pas encore été vérifiée, n'a pas été pratiquée sur des spermatozoïdes humains en FIV. Nous avons choisi de pratiquer la stimulation lumineuse dans l'épreuve hétérologue du hamster, purement expérimentale, qui teste le pouvoir fusiogénique des spermatozoïdes humains avec les ovocytes dépellucidés de hamster. Le groupe de 43 sujets examinés pour infécondité nous a permis de faire une analyse des variables appariées dans le test du hamster avec des spermatozoïdes irradiés ou non. Cette analyse a montré qu'une exposition de deux minutes au LFE pouvait améliorer le pouvoir fusiogénique des spermatozoïdes "faibles". Dans la comparaison de nos deux sous-groupes nous n'avons décelé aucune différence significative dans les variables du sperme aux examens de routine, peut-être à cause du nombre insuffisant de cas. Des études antérieures chez l'homme [32] portant sur un nombre plus considérable de cas ont démontré une corrélation significative entre la qualité du sperme et son pouvoir fusiogénique. Le pouvoir fusiogénique du sperme corrèle aussi avec les autres fonctions du sperme telle que la réaction acrosomique [3, 25] dont le taux a été trouvé généralement bas [39]. Dans le présent travail, nous avons tenté d'évaluer le taux de réaction acrosomique par la méthode de colo-

ration à la biotine liée au pisum [24]. Cette méthode a bien fonctionné avec les spermatozoïdes de souris mais non avec les frottis de spermatozoïdes humains de notre groupe sur lesquels les résultats étaient aléatoires. Était-ce à cause des cas fréquents d'oligozoospermie avec très peu de spermatozoïdes mobiles après sélection, ou à cause de la persistance après lavage, de jaune d'œuf fixé à la tête des spermatozoïdes ? Quoiqu'il en soit, l'incubation des spermatozoïdes au TEST et jaune d'œuf agit sur leur pouvoir fusiogénique [25] ainsi que sur leur attachement à la zone pellucide [21], sans toutefois augmenter le taux de réaction acrosomique évalué par la méthode de triple coloration [25]. Il semblerait que l'examen de la réaction acrosomique en clinique humaine soit problématique. Plachot et coll. [28] n'ont pas trouvé de corrélation entre elle et les résultats de la FIV. De fait, la réaction acrosomique n'est pas entrée en usage de routine en clinique humaine. Quant au pouvoir fusiogénique du sperme, nous avons montré, avec d'autres, qu'il corrélait également avec le test de l'hémizona et la FIV [32, 33], mais que cette corrélation n'était que partielle, sans doute en raison du caractère multifactoriel du pouvoir fécondant du sperme [33]. Ces spermatozoïdes "faibles" auraient-ils besoin d'une surcharge d' H_2O_2 pour améliorer leur fonction, contrairement aux "bons" spermatozoïdes pour qui cette surcharge serait superflue et peut-être même nuisible ? La poursuite de nos travaux pourrait donner la réponse. Les effets bénéfiques des rayons laser He-Ne nM 630 de faible énergie sur les spermatozoïdes se limiteraient-ils au système de FIV murin, ou pourraient-ils aussi s'étendre aux procréations médicalement assistées humaines, améliorant les performances reproductives des spermatozoïdes. Mais il faudrait d'abord s'assurer chez l'homme de l'innocuité à petite dose de cette irradiation que l'on sait être délétère à dose élevée [29].

RÉFÉRENCES

- 1 ALVAREZ J.G., STOREY B.T. : Role of glutathion peroxydase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxydation. *Gamete Res.*, 1989, 23 : 77-90.
- 2 AITKEN R.J., CLARKSON J., FISHEL S. : Generation of reactive species, lipid peroxydation

- and human sperm function. *Biol. Reprod.*, 1989, 40 : 183-197.
3. AITKEN R.J., BUCKINGHAM D.W., FANG H.G. : Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J. Androl.* 1993, 14 : 132-141.
 4. AITKEN R.J. : Mechanisms and prevention of lipid peroxydation in human spermatozoa. Human sperm acrosome reaction. In : *Colloque de l'INSERM.* 1995, 236 : 339-353.
 5. AITKEN R.J., GORDON E., HARKISS D. *et al.* : Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1998, 59 : 1037-1046.
 6. BIELANSKY A., HARE W.C.D. : Development in vitro of bovine embryos after exposure to continuous helium-neon laser light. *Theriogenology*, 1992, 37:192.
 7. BOLOGNANI L., COSTATO M., DELMONTE L. *et al.* : Effect of laser on enzymatic systems: inactivation of muscle lactate dehydrogenate by CO₂ and its reactivation by laser irradiation. *Lasers Technol.* 1991, 1 : 103-107.
 8. BREITBART H., WEHBIE R.S., LARDY H.A. : Regulation of calcium transport in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, 1027 : 72-78.
 9. BREITBART H., LEVINSHAL T., COHEN N. *et al.* : Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *J Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 1996; 34 : 117-121.
 10. BREITBART H., RUBINSTEIN S., GRUBERGER M. : Calcium efflux mechanism in sperm mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 1996, 1312 : 79-84.
 11. BURRUEL V.R., RAABE O.G., WILEY L.M. : In vitro fertilization rate of mouse oocytes with spermatozoa from the F1 offspring of males irradiated with 1.0 Gy 137Cs gamma-rays. *Mutat. Res.*, 1997, 381: 59-66.
 12. CLEARY S.F., LIU L.M., GRAHAM R. *et al.* : In vitro fertilization of mouse ova by spermatozoa exposed isothermally to radio-frequency radiation. *Bioelectromagnetics*, 1989, 10 : 361-369.
 13. COHEN N., LUBART R., RUBINSTEIN S *et al.* : Light irradiation of mouse spermatozoa : Stimulation of in-vitro Fertilization and calcium signals. *Photochem. Photobiol.*, 1998, 68 : 407-413.
 14. DE LAMIRANDE E., JIANG H., ZINI H.A. *et al.* : Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.*, 1997, 2 : 48-54.
 15. FLORMAN H.M., CARRON M.E., KIM T.D.H. *et al.* : Activation of voltage dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida induced acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.*, 1992, 152 : 304-314.
 16. FLORMAN H.M. : Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.*, 1994, 165 : 152-164.
 17. GRECO M., GUIDA G., PERLINO E. *et al.* : Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, 1989, 29 : 1428-1434
 18. HINTING A., VERMEULEN L., COMHAIRE F. : The indirect mixed antiglobulin reaction test using a commercially available kit for the detection of anti-sperm antibodies in serum. *Fertil. Steril.* 1988, 49 : 1039-1044.
 19. KARU T. : Molecular mechanisms of therapeutic effect of low intensity laser irradiation. *Lasers Life Sci.*, 1988, 2 : 53-74.
 20. KRUGER T.F., MENKVELD R., STANDER F.S. *et al.* : Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 1986, 46 : 1118-1123.
 21. LANZENDORF S.E., HOLMGREN W.J., JEYENDRAN R.S. : The effect of egg yolk medium on human sperm binding in the hemizona assay. *Fertil. Steril.*, 1992, 58 : 547-550.
 22. LUBART R., FRIEDMANN H., LEVINSHAL R. *et al.* : Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 1992; 15 : 337-341
 23. MATSUDA Y, YAMADA T, TOBARI I. : Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation. I. Chromosome aberrations induced in sperm after X-irradiation. *Mutat. Res.*, 1985, 148 : 113-117.
 24. MENDOZA C., CARRERAS A., MOOS J., *et al.* : Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.*, 1992, 95 : 755-763.
 25. MORENO R.D., BARROS C. : Effect of Test-yolk upon human sperm acrosome reaction. *Microsc. Electron. Biol. Cellular.*, 1991, 15 : 107-117.
 26. OCANA-QUERO J.M., GOMEZ-VILLAMANDOS R., MORENO-MILLAN M., *et al.* : The effects of He-Ne laser irradiation on in vitro maturation and fertilization of immature bovine oocytes. *Lasers Med. Sci.*, 1995; 10 : 113-119
 27. OCANA-QUERO J.M., GOMEZ-VILLAMANDOS R., MORENO-MILLAN M., *et al.* : Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. *J. Photochem. Photobiol.*, B 1997, 40 : 294-298.
 28. PLACHOT M., MANDELBAUM J., JUNCA A.M. : Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 1984, 42: 418-423.
 29. RICEVUTI G., MAZZONE A., MONAIA C. *et al.* : In vivo and in vitro HeNe laser effects on phagocyte

functions. *Inflammation*, 1989, 13 : 507-527.

ABSTRACT

- 30 SALET C., PASSARELLA S., QUAGLIARIELLO E.: Effects of selective irradiation on mammalian mitochondria. *Photochem. Photobiol.*, 1987, 45 : 433-438
- 31 SIEGELBAUM S.A. : Ion channel control by tyrosine phosphorylation., *Current Biol.* 1994, 4 : 242-245.
- 32 SOFFER Y., GOLAN A., HERMAN A. *et al.* : Prediction of in vitro fertilization (IVF) outcome by the sperm penetration assay (SPA) with TEST Yolk buffer preincubation. *Fertil. Steril.*, 1992, 58 : 556-562.
- 33 SOFFER Y., RAZIEL A., FRIEDLER S. *et al.* : Place des tests d'interaction sperme-mucus DANS LE BILAN MASCULIN DE L'INFECONDITE. *ANDROLOGIE*, 1998, 8 : 36-46.
- 34 SPIELBERG H., JUNE C.H., BLAIR O.C. *et al.* : UV irradiation of lymphocytes triggers an increase in intracellular Ca²⁺ and prevents lectin-stimulated Ca²⁺ mobilization: evidence for UV and nifedipine-sensitive Ca²⁺ channels. *Exp. Hematol.*, 1991, 19 : 742-748.
- 35 TAMURA M. : Non-invasive monitoring of the redox state of cytochrome oxidase in living tissue using near infrared laser lights. *Jpn. Circ., J.* 1993, 57 : 817-824.
- 36 TESARIK J., CERRERAS A., MENDOZA C. : Single cell analysis of tyrosine kinase dependent independent Ca²⁺ fluxes in progesterone induces acrosome reaction. *Mol. Human Reprod.*, 1996, 2: 225-232.
- 37 WILSON G.F., KACZMAREK L.K. : Mode-switching of a voltage-gated cation channel is mediated by a protein kinase A-regulated tyrosine phosphatase. *Nature*, 1993, 366: 433-438
- 38 YANAGIMASHI R. : Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neil J.D. eds. *The Physiology of Reproduction*. New-York , Raven Press, 1994 : 189-317.
- 39 YANG Y.S., ROJAS F.J., STONE S.C. : Acrosome reaction of human spermatozoa in zona-free hamster egg penetration test. *Fertil. Steril.*, 1988, 50 : 954-959.
- 40 YOGEV L., HOMONNAI Z.T., GAMZU R. *et al.* : The use of hemizona assay in the evaluation of the optimal sperm preparation technique. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 851-854.
- 41 YOUNG S.R. DYSON M., BOLTON P. : Effect of light on Calcium uptake by macrophages. *Laser Ther.*, 1990, 2 : 53-57.
- 42 ZARCA A., RUBINSTEIN S., BREITBART H. : Transport mechanism for calcium and phosphate in ram spermatozoa . *Biochem. Biophys. Acta*, 1988; 944: 351-8.

Low energy He-Ne 630 laser (LEL) irradiation on mouse and human spermatozoa.

Y. SOFFER, R. LUBART, H. BREITBART

INTRODUCTION. The effects of low energy He-Ne 630 laser (LEL) irradiation on various aspects of cell metabolism, including proliferation, respiration, ATP synthesis and Ca²⁺ uptake, have been recently recognized in somatic cells, animal spermatozoa and embryonic cells.

OBJECTIVES. 1- To analyze the *in vitro* effects of LEL irradiation on the mouse IVF model. 2- To assess the effects of experimental LEL irradiation on human spermatozoa in the sperm-zona free hamster egg penetration (SPA) model.

MATERIAL & METHODS. 1- In a mouse IVF model, pooled oocytes were incubated for 24 h. with LEL-irradiated and non-irradiated epididymal mouse spermatozoa. The percentage of fertilized eggs, intracellular Ca²⁺ and Ca²⁺ uptake as well as the effects of reactive oxygen scavengers were compared in the two groups. 2- In the enhanced SPA model, with overnight TEST-Yolk preincubation, LEL-irradiated and non-irradiated ejaculated spermatozoa from 43 infertile men were incubated for 3 h with fresh zona-free hamster eggs. The percentage of eggs penetrated (SPA%) by irradiated or control sperm was compared. Acrosome reaction (AR) and Hemizona Assay (HZA) were also performed on the same ejaculates.

RESULTS. 1- In mice, brief LEL irradiation enhanced intracellular Ca²⁺ influx and increased the *in vitro* fertilization capacity of spermatozoa. Mitochondrial Ca²⁺ transport mechanisms and H₂O₂ appeared to be involved in these LEL effects. 2- In the 43 male patients, AR and SPA were correlated, while SPA and HZA were poorly correlated. In the whole group, the mean SPA% of LEL-irradiated and control sperm were not significantly different: 49.8 ± 39.9 and 51.0 ± 34.9, respectively. No significant change was observed in 50 % of cases. Following irradiation, SPA%

increased in 25% of cases and decreased in 25% of cases. However, classifying all cases according to the SPA cut-off point of 30% as poor and good sperm in this enhanced SPA model, showed that LEL irradiation significantly increased SPA% only in the poor sperm subgroup (n=16) from 5.5 ± 8.9 to 23.1 ± 25.2 ($p < 0.0001$). This increase was observed in 50% of these patients. In the good sperm category (n=27), no improvement of SPA% was observed. On the contrary, LEL irradiation decreased SPA% from 76.1 ± 24.4 to 67.6 ± 28 .

CONCLUSION. In a mouse IVF model, LEL irradiation of spermatozoa improved intracellular Ca^{2+} influx and egg fertilization. H_2O_2 seems to participate in the biochemical cascade transforming light signals into a biological response. In man, using the SPA model, LEL sperm irradiation might improve the penetration capacity only in the case of poor quality sperm, by increasing sperm egg penetration in one half of cases, otherwise LEL is ineffective. Further studies are required to confirm these results, but LEL should not be considered for clinical use until its safety has been proven. (Supported by grants from the Chief Scientist Office, Ministry of Health)

Key words : Spermatozoa, Laser He-Ne, murine IVF, intracellular Ca^{2+} , Hamster test