

# Interactions d'une restriction calorique avec les effets du Nickel sur la reproduction chez le rat

Najla HFAIEDH<sup>1</sup>, Mohamed Salah ALLAGUI<sup>1</sup>, Françoise CROUTE<sup>2</sup>,  
Jean Pierre SOLEILHAVOUP<sup>2</sup>, Fadhel GUERMAZI<sup>3</sup>, Abdelaziz KAMMOUN<sup>4</sup>,  
Abdelfattah EL FEKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Eco-Physiologie Animale, Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire et Pollution, Faculté de Médecine de Toulouse, France

<sup>3</sup> Laboratoire Biophysique, Faculté de Médecine de Sfax, Service Médecine nucléaire, CHU Habib Bourguiba de Sfax, Tunisie

<sup>4</sup> Laboratoire Physiologie Animale, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie

## RESUME

Des études épidémiologiques chez l'homme ont montré qu'il existait, depuis 1960, des signes de diminution de plusieurs paramètres du spermogramme avec augmentation de certaines pathologies génitales masculines. La contamination croissante de l'environnement par des composés chimiques semble être un facteur de causalité. Par ailleurs, divers auteurs avancent l'hypothèse que la restriction calorique a un effet bénéfique sur la santé ou la longévité.

Ce travail a pour objectif de comparer les effets du nickel sur les processus de reproduction de rats nourris soit tous les jours, soit une jour sur deux, afin d'évaluer les possibles effets bénéfiques, ou non, d'une restriction calorique sur la fécondité des rats.

Dans ce but, nous avons utilisé des rats mâles et femelles de souche *Wistar*, nourris soit tous les jours (N) soit un jour sur deux : jeûne intermittent (J). Après un mois de ce traitement, les rats (N) et (J) ont été répartis en 2 groupes : l'un abreuvé avec de l'eau du robinet (groupes NO et JO), l'autre abreuvé avec la même eau enrichie en chlorure de nickel (100 mg/L, groupes NNi et JNi). Le jeûne intermittent se poursuit parallèlement au traitement par le nickel, et ceci durant 2, 4, 10, 16, 30 et 60 jours. Pour l'exploration du dialdéhyde malonique (MDA), le nickel est administré par injection intra-péritonéale à raison de 4 mg NiCl<sub>2</sub>/kg de poids corporel durant 1, 3, 5 et 10 jours.

Nos résultats montrent que le nickel entraîne une atrophie des tubes séminifères avec une diminution du nombre des spermatozoïdes, et une diminution du taux de la testostérone sérique. Chez les femelles une diminution du nombre de follicules cavitaires a été observée.

Le jeûne intermittent a induit les mêmes types de perturbations avec des diminutions du nombre des spermatozoïdes mobiles et du taux de testostérone plus importantes qu'après exposition au nickel. Avec les deux facteurs associés, jeûne et nickel, les effets déjà observés ne sont pas amplifiés.

L'analyse des croisements intergroupes a montré que le taux de gestation et surtout le nombre moyen d'implantations étaient diminués chez les rats exposés au nickel et/ou soumis au jeûne intermittent. Le taux de gestation le plus faible (55%) a été observé chez des femelles (NNi) croisées avec des mâles témoins (NO). Le nombre d'implantations le plus bas a été observé chez les femelles témoins (NO) croisées avec des mâles (NNi). Le nickel n'a pas entraîné de baisse complémentaire de la fertilité chez les rats soumis au jeûne intermittent.

Le dosage du MDA a montré que le nickel induit une peroxydation lipidique au niveau des tissus utérin et ovarien. Cependant l'augmentation relative du taux de MDA est plus faible chez les rats JNi que NNi, c'est-à-dire dans le cas où le nickel est associé au jeûne intermittent.

Nos résultats suggèrent que le nickel et le jeûne intermittent diminuent la fertilité des rats par deux mécanismes différents dont les effets ne s'additionnent pas. Associé au jeûne intermittent, le nickel devient non toxique, ceci

Correspondance :

Abdelfattah EL FEKI - Laboratoire Eco-Physiologie Animale, Faculté des Sciences de Sfax, BP 802, 3038 Sfax, Tunisie - Tel (216) (74) 276 400 - Fax (216) (74) 274 437 - Email [elfeki.af@gnet.tn](mailto:elfeki.af@gnet.tn)

est confirmé par le suivi des taux du MDA. L'effet hypocalorique du jeûne intermittent pourrait être à l'origine de l'inhibition des effets cytotoxiques du nickel métal classé parmi les stress oxydants.

**Mots clés :** jeûne, nickel, reproduction et restriction calorique

## I. INTRODUCTION

Il a été montré que la qualité du sperme humain (densité, nombre, mobilité, taux de capacitation) a décliné au cours de ces dernières décades [12]. Parmi les facteurs en cause, on cite les polluants environnementaux (métaux lourds, produits chimiques utilisés dans l'agriculture et l'industrie) ainsi que les facteurs nutritionnels [14].

Diverses études suggèrent que la malnutrition, lorsqu'elle induit une déficience en minéraux ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ ), peut amplifier les effets nocifs de polluants environnementaux sur les fonctions reproductrices mâles et femelles. En 1986, Shill [11] rapporte que la malnutrition augmente les effets nocifs des polluants sur la reproduction en perturbant le déroulement normal de la spermatogenèse. Xie et al. [15] ont également montré que l'intoxication par divers métaux lourds (plomb, cadmium, nickel...) chez des rats mal nourris amplifiait le blocage de la spermiogénèse. De plus, l'exposition au nickel de rats adultes souffrant d'une déficience minérale augmente le taux de mortalité des petits pendant la lactation [6].

Inversement, divers auteurs ont observé que la restriction calorique augmente la longévité et retarde la vieillesse. Lebourg [8] a montré que des rats sous alimentés avaient des longévités moyennes et maximales supérieures à celles des animaux nourris à volonté, à condition de prendre la précaution de ne pas induire de déficience en sels minéraux. Lane [7] a montré aussi en 2001 que le régime hypocalorique constitue un régime de longévité.

Le nickel est un cancérigène, responsable de cancers du poumon en milieu professionnel. Chez l'animal, il s'accumule au niveau des reins où il induit des lésions au niveau des glomérules et une protéinurie [13]. Il produit aussi des perturbations sexuelles [3, 4]. Des études ont montré qu'il entraîne une peroxydation lipidique, qui serait en relation avec la production de radicaux hydroxyles [2]. Il peut ainsi altérer le statut antioxydant de la cellule.

Notre travail a pour but d'explorer l'impact du nickel sur la reproduction de rats de souche *Wistar* et d'évaluer les effets d'un jeûne intermittent associé, afin de d'établir si cette restriction calorique augmente ou diminue les effets du Nickel.

Dans ce cadre, des rats nourris pendant un mois, soit tous les jours, soit un jour sur deux (jeûne intermittent) ont été ensuite abreuvés avec de l'eau contenant, ou non, du chlorure de nickel. Les critères étudiés ont été déterminés par

l'étude du taux de testostérone sérique, du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes, du taux de gestation, du nombre d'implantations et de l'histologie testiculaire et ovarienne.

Le stress oxydatif a été évalué par le dosage du dialdéhyde malonique (MDA) qui est un produit de scission des hydroperoxydes lipidiques.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. Animaux

Notre étude a été réalisée sur 96 rats mâles et 160 rats femelles de souche *Wistar*, de poids corporel moyen voisin de 180 g pour les mâles et 130 g pour les femelles. Ces animaux ont été élevés dans une animalerie où la température ambiante était voisine de 23°C, avec des alternances de 10 h d'obscurité et 14 h de lumière. Les animaux étaient nourris de granulés énergiquement équilibrés (SICO-Sfax, Tunisie).

### 2. Traitement

Les rats mâles ou femelles âgés de 3 mois ont été répartis en 2 lots de 48 rats pour chaque sexe. L'un recevant chaque jour 20 g de nourriture/rat (groupe N) et l'autre recevant la même quantité de nourriture un jour sur deux (groupe J) et ceci pendant un mois. Ensuite, chaque lot a été divisé en deux groupes de 24 chacun, l'un recevant une eau de boisson normale à base d'eau de robinet (groupes NO et JO) et l'autre recevant de l'eau de boisson enrichie en nickel (100 mg  $\text{NiCl}_2/\text{L}$ ) (groupes NNi et JNi). Ce traitement a été poursuivi pendant 2, 4, 10, 16, 30 et 60 jours. Sachant que les rats boivent environ 10 ml par jour et par rat, on peut estimer qu'ils ont absorbé 1 mg/jour/ rat de  $\text{NiCl}_2$ .

Pour le dosage du MDA pour lequel nous avons utilisé 64 rats femelles complémentaires, le Ni a été injecté par voie intra-péritonéale à raison de 4 mg  $\text{NiCl}_2/\text{par Kg}$  de poids corporel par jour, et ceci pendant 1, 3, 5 et 10 jours. Le nickel a été administré par injection et non pas à travers l'eau de boisson, car les effets de la dernière voie sont plus lents et risquent d'être masqués par un phénomène d'adaptation et de réparation, alors que l'injection donne un effet rapide nécessaire pour l'exploration de l'effet " stress oxydant " du nickel.

### 3. Sacrifice et prélèvement d'échantillons

Le sacrifice des animaux a toujours été effectué dans la matinée afin d'éviter les variations dues au rythme circadien. Les prélèvements sanguins ont été faits après décapitation rapide, le sang artério-veineux a été recueilli sans anticoagulant puis centrifugé. Le sérum a été stocké à -20°C pour le dosage ultérieur de la testostérone sérique.

Chez les rats femelles, les frottis vaginaux sont réalisés et interprétés sous microscope. La dominance des cellules épithéliales indique le proœstrus, celle des cellules kératinisées indique l'œstrus et celle des leucocytes montre le diœstrus. Le postœstrus est caractérisé par la présence de deux types de cellules : kératinisées et leucocytes.

### III. RESULTATS

Les organes génitaux mâles (testicules, épидидymes, vésicules séminales, prostate) ou femelles (ovaires, utérus) ont été prélevés et débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés.

#### 4. Examens réalisés

##### a) Comptage des spermatozoïdes épидидymaires.

La queue de l'épididyme et la partie initiale du canal déférent ont été prélevées et dilacérées dans 1 ml de tampon Earles à 35°C, à l'aide de pinces Bruxelles. Après 10 à 15 min, la dispersion spontanée des spermatozoïdes est suffisante pour qu'ils puissent être comptés à l'aide d'une cellule de Malassez.

##### b) Dosage de la testostérone sérique.

La testostérone sérique a été mesurée par un dosage radio-immunologique (RIA) par compétition (Kit Immunotech).

##### c) Etude histologique.

Les testicules et les ovaires ont été fixés dans un liquide de Bouin, puis colorés à l'hématoxyline éosine. Les coupes ont été observées à l'aide d'un microscope optique (Leitz Dia luxe 22) et photographiées à l'aide d'un appareil photo (Leicawild MP 48).

##### d) Analyse de la fertilité des rats mâles et femelles.

Elle a été réalisée après 60 jours de traitement. Des groupes de rats femelles témoins (NO) ont été croisés, à raison de 4 femelles pour 1 mâle, avec des rats mâles témoins (NO), nourris chaque jour et traités par le nickel (NNi), soumis à un jeûne intermittent (JO) et soumis au jeûne intermittent et traités par le nickel (JNi).

De la même façon, des rats mâles témoins (NO) ont été croisés avec des rates NO, Ni, JO et JNi. Les animaux sont restés ensemble une semaine puis ont été sacrifiés 15 jours plus tard. Les cornes utérines ont été disséquées pour rechercher une éventuelle gestation et déterminer le nombre d'implantations.

##### e) Dosage du MDA.

Le MDA a été dosé selon la technique colorimétrique au TBARS (acide thiobarbiturique) après extraction au TBS/BHT (tampon tris NaCl/ butyle hydroxytoluène). Pour cela 1 g d'organe est homogénéisé dans 2 ml de TBS à l'aide d'un broyeur de type ultra-turax, centrifugé à 9000 t/mn et à froid. Le cytosol est réparti en deux aliquotes, pour le dosage du MDA après extraction au TCA/BHT (acide trichloracétique/butyle hydroxytoluène) et pour le dosage des protéines par la technique de Lowry.

#### 5. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM.

Les comparaisons entre groupes témoins et traités sont réalisées par un test "t" de Student,  $p \leq 0.05$  est considéré comme significatif.

#### 1. Nombre et mobilité des gamètes mâles

Le Tableau 1 montre que chez les rats témoins (NO), le nombre moyen des spermatozoïdes par épидидyme était de  $15 \times 10^6$ , 80% d'entre eux étant mobiles. Chez les rats exposés au Ni pendant 60 jours (NNi), on observe une diminution de l'ordre de 50% du nombre des gamètes, et leur mobilité chute à 30%.

Chez les rats soumis au jeûne intermittent seul (JO), le nombre total de spermatozoïdes est diminué aussi de 70%.

Toutefois, chez les animaux soumis à un jeûne intermittent, on note une faible amélioration ( $p < 0,05$ ) du nombre des spermatozoïdes épидидymaires chez ceux traités au Ni (JNi) par rapport à ceux non traités (JO). Ainsi, alors que le Ni provoque une diminution des spermatozoïdes chez les rats nourris, il n'apparaît pas avoir cet effet chez les rats soumis au jeûne intermittent. La détermination du pourcentage des spermatozoïdes mobiles montre les mêmes variations que pour les spermatozoïdes totaux.

#### 2. Histologie testiculaire

Comme le montrent les coupes histologiques, les tubes séminifères des rats NO (Figure 1 A), sont serrés avec des espaces interstitiels étroits alors que ceux des rats traités au nickel (Figure 1 B) sont de diamètres plus réduits avec des espaces interstitiels plus larges.

On observe, dans la paroi des tubes séminifères des rats NO les différents stades des cellules germinales avec les spermatogonies de petite taille en périphérie, puis les spermatocytes plus volumineux avec des noyaux parfois en division, les spermatides et enfin les spermatozoïdes mûrs dont les flagelles remplissent la presque totalité de la lumière centrale.

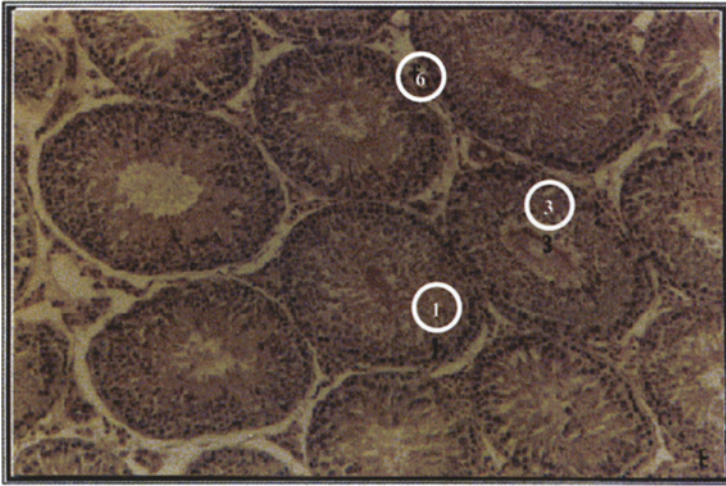
Chez les rats traités par le chlorure de nickel (NNi), un certain nombre de tubes séminifères apparaissent dépourvus de spermatozoïdes mûrs (absence de flagelles ou absence totale de spermatozoïdes) avec des travées acellulaires entre les cellules germinales. Le Tableau 2 montre que le pourcentage des tubes séminifères dépourvus des spermatozoïdes varie de 8% (2ème jour) à 30% (60ème jour) chez les rats NNi alors qu'il est seulement de 2 à 5% en moyenne chez les témoins. De plus, certains tubes séminifères sont atrophiés.

Chez les rats soumis au jeûne intermittent (JO), le pourcentage de tubes séminifères vides reste relativement stable aux environs de 10-12% et le traitement par le Ni (JNi) n'a pas modifié ces valeurs. Ainsi, associé au jeûne intermittent, le Ni n'augmente pas le nombre de tubes séminifères vides comme il le fait chez les rats nourris.

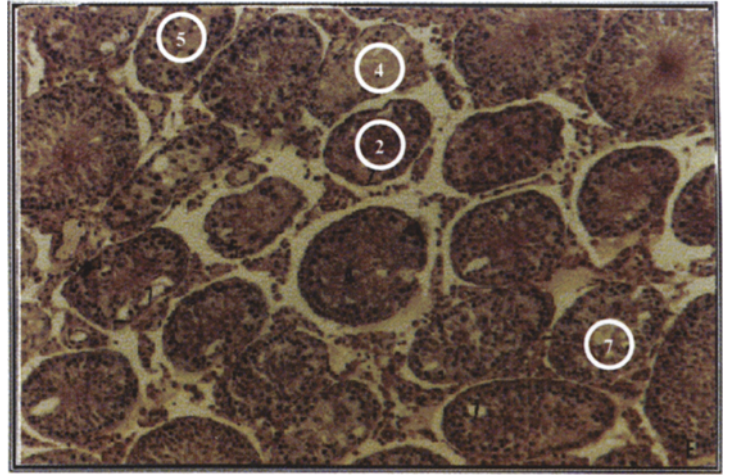
#### 3. Taux de testostérone sérique

Le Tableau 3 montre que le nickel induit une diminution du taux de testostérone aux 30<sup>ème</sup> et 60<sup>ème</sup> jour d'exposition chez les rats nourris.

A

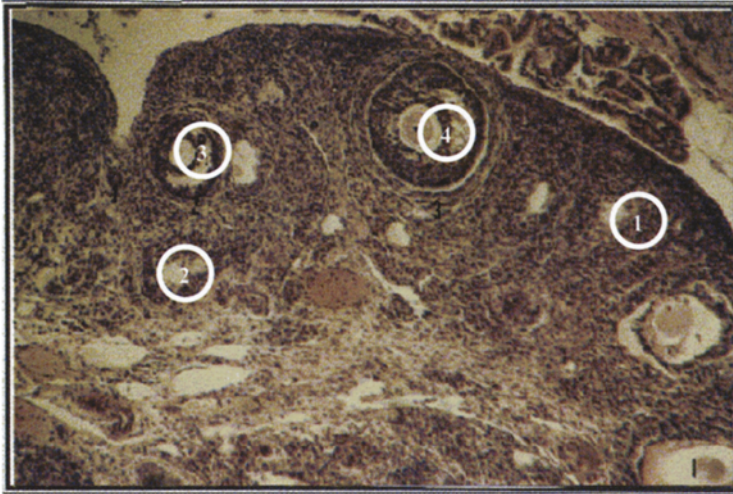


B

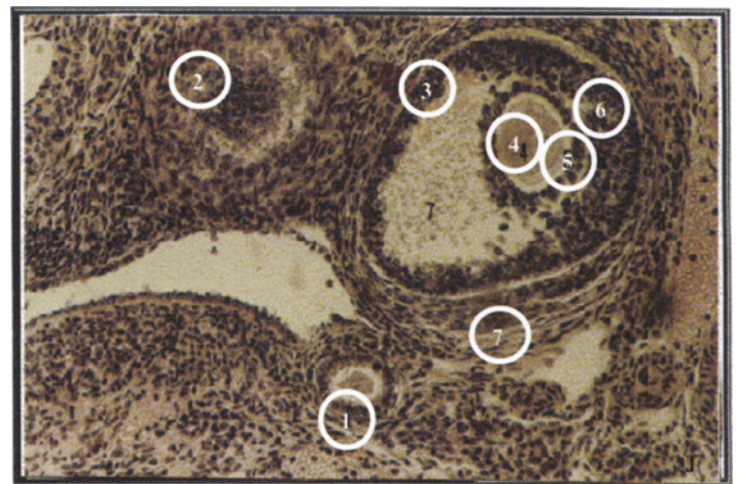


**Figure 1 : Observation de tubes séminifères normaux (A), réalisée sur une coupe de testicule d'un rat témoin (NO), et de tubes séminifères altérés (B), réalisée sur une coupe de testicule d'un rat traité au nickel durant 16 jours (NNi). Coloration à l'hématoxyline-éosine ; grossissement x 200. (1) tube séminifère non atrophié ; (2) tube séminifère atrophié ; (3) tube séminifère dont la lumière est remplie de spermatozoïdes mûrs ; (4) tube séminifère dont la lumière est dépourvue de spermatozoïdes ; (5) présence de spermatozoïdes sans flagelles ; (6) cellules interstitielles de Leydig ; (7) présence de travées.**

A



B



**Figure 2 : Observation des différents stades de l'ovogenèse chez (A) une rate témoin (NO) au grossissement x 100, et chez (B) une rate traitée au nickel durant 30 jours (NNi) au grossissement x 200. (1) follicule primordial ; (2) follicule secondaire ; (3) follicule tertiaire ; (4) ovocyte ; (5) zone pellucide ; (6) cumulus oophorus ; (7) thèque folliculaire (interne et externe).**

**Tableau 1 : Evolution par rapport aux témoins, du nombre et du pourcentage des spermatozoïdes épидидymaires chez des rats soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel pendant 60 jours.**

	NO		NNi		JO		JNi	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
<b>Spermatozoïdes totaux</b>	14,8 ± 1,2	100 ± 8,5	8,0 ± 0,6 **	54,0 ± 4,3	4,8 ± 0,3 **	32,0 ± 1,8	5,4 ± 0,3 ** (*)	36,0 ± 2,1
<b>Spermatozoïdes mobiles</b>	11,7 ± 0,03	79,0 ± 0,2	2,3 ± 0,02 **	15,7 ± 0,14	1,3 ± 0,02 **	8,7 ± 0,14	1,5 ± 0,02 ** (*)	10,1 ± 0,14

Nb : nombre en  $10^6$ /épididyme. % : pourcentage par rapport aux témoins (NO). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Nombre d'échantillons par groupe : 12 (3 échantillons x 4 rats sacrifiés/groupe). \*\* :  $p = 0,01$  par comparaison avec les rats témoins (NO). (\*) :  $p < 0,05$  par comparaison avec les rats traités (JO).



**Tableau 2 : Pourcentages de tubes séminifères dépourvus de spermatozoïdes par rapport au nombre total des tubes chez des rats soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 2, 4, 10, 16, 30 et 60 jours.**

	2j	4j	10j	16j	30j	60j
NO	5,6 ± 0,0	2,1 ± 1,0	3,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,6
NNi	8,0 ± 0,2 **	7,4 ± 0,3 *	15,6 ± 0,4 **	17,3 ± 0,6 **	26,0 ± 5,0 *	30,8 ± 0,5 **
JO	13,1 ± 0,8 *	9,7 ± 0,0 *	12,1 ± 1,3 **	10,3 ± 0,7 **	9,7 ± 0,3 **	12,0 ± 0,3 **
JNi	11,3 ± 0,4 **	10,3 ± 0,2 *	10,0 ± 0,4 **	10,2 ± 0,4 **	10,8 ± 0,2 **	10,2 ± 0,1 **

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. Nombre d'échantillons par groupe : 12 (3 échantillons x 4 rats sacrifiés/groupe).

\* :  $p < 0,05$  par comparaison avec les rats témoins (NO). \*\* :  $p = 0,01$  par comparaison avec les rats témoins (NO).

**Tableau 3 : Taux de testostérone sérique (ng/ml) chez des rats soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 2, 4, 10, 16, 30 et 60 jours.**

	2j	4j	10j	16j	30j	60j
NO	0,84 ± 0,17	0,52 ± 0,11	0,43 ± 0,31	2,10 ± 0,37	1,89 ± 0,16	1,03 ± 0,12
NNi	1,26 ± 0,09	0,83 ± 0,77	0,79 ± 0,39	1,92 ± 0,05	1,02 ± 0,27 *	0,21 ± 0,09 **
JO	0,01 ± 0,00 **	0,07 ± 0,06 *	0,01 ± 0,00 **	0,13 ± 0,06 **	0,49 ± 0,07 **	0,16 ± 0,10 **
JNi	2,40 ± 0,57 *	0,10 ± 0,04 *	0,02 ± 0,01	0,94 ± 0,47 *	0,33 ± 0,10 **	1,90 ± 1,03
	--	-	-	-		--

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. Nombre d'échantillons par groupe : 12 ; (3 échantillons x 4 rats sacrifiés/groupe).

\* :  $p < 0,05$  par comparaison avec les rats témoins (NO). \*\* :  $p = 0,01$  par comparaison avec les rats témoins (NO).

- :  $p \leq 0,05$  par comparaison avec les rats témoins (JO). -- :  $p \leq 0,01$  par comparaison avec les rats témoins (JO).

Chez les rats soumis au jeûne intermittent le taux de testostérone est très faible (< à 25% de celui des témoins). Il faut rappeler qu'au jour 0, ces rats ont déjà subi ce régime hypocalorique depuis un mois.

L'addition de Ni dans l'eau de boisson au jour 0 chez les rats soumis au jeûne intermittent (groupe JNi), induit une augmentation de la testostérone avec un pic du taux de testostérone (285%) dès le 2ème jour de traitement.

#### 4. Histologie ovarienne

L'examen histologique de la région corticale externe des ovaires des rats témoins (NO) montre (Figure 2 A) la présence de follicules tertiaires et de follicules de De Graaf. Le nombre moyen de follicules cavitaires a varié de 4,6 à 9,6 selon les lots de rates (NO) examinées (Tableau 4).

Chez les rates traitées au nickel (NNi) (Figure 2B), on observe une diminution significative du nombre des follicules cavitaires par rapport aux rates NO (Tableau 4).

Les rates soumises au jeûne intermittent présentent également un nombre de follicules cavitaires réduit par rapport à celui des témoins, mais le traitement additionnel par le Ni n'a pas induit de réduction supplémentaire de leur nombre.

Le stade oestrus est présent de la même façon chez les rates témoins et traitées (données non rapportées). Il semble donc que la synchronisation des phases du cycle oestral soit la même dans les deux groupes.

#### 5. Effet du nickel sur le taux de gestation et le nombre d'implantations

Le Tableau 5 montre que le taux de gestation et surtout le nombre moyen d'implantations est diminué chez les rats exposés au Ni et/ou subissant un jeûne intermittent.

Le taux de gestation le plus faible (55%) a été observé chez des femelles (NNi) croisées avec des mâles témoins (NO). Le nombre d'implantation le plus bas a été observé chez les femelles témoins (NO) croisées avec des mâles (NNi).

#### 6. Variation du taux de MDA au niveau des tissus utérin et ovarien

Le Tableau 6 montre que les quantités de MDA sont comparables au niveau des tissus utérin et ovarien chez les rats nourris tous les jours (NO) ou un jour sur deux (JO). Le nickel induit une augmentation de 50 à 100% du taux du MDA chez les rats (NNi). On peut remarquer que le MDA est augmenté dès le 1er jour et que le niveau d'augmentation est indépendant du temps de traitement par le Ni.

**Tableau 4 : Pourcentages de follicules cavitaires/follicules totaux sur les coupes histologiques d'ovaires des rates soumises (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traitées (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 2, 4, 10, 16, 30 et 60 jours.**

	2j	4j	10j	16j	30j	60j
NO	6,5 ± 0,5	4,7 ± 0,3	7,7 ± 0,3	7,3 ± 0,3	9,7 ± 0,3	7,3 ± 0,3
NNi	5,5 ± 0,5 **	3,3 ± 0,3	6,3 ± 0,3 *	3,3 ± 0,7 **	5,3 ± 0,3 **	5,7 ± 0,3 **
JO	5,3 ± 0,3 *	4,7 ± 0,3	4,7 ± 0,3 **	6,3 ± 0,3	5,7 ± 0,3 **	6,7 ± 0,3
JNi	4,7 ± 0,3 *	5,3 ± 0,3 *	5,3 ± 0,1 *	6,3 ± 0,3	6,7 ± 0,3 **	7,0 ± 0,6 -

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. Nombre d'échantillons par groupe : 12.

\* :  $p < 0,05$  par comparaison avec les rats témoins (NO). \*\* :  $p = 0,01$  par comparaison avec les rats témoins (NO).

- :  $p < 0,05$  par comparaison avec les rats traités (JO).

**Tableau 5 : Résultats des croisements entre mâles "M" et femelles "F" soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 60 jours.**

(A)

	Nombre de femelles gestantes	% de femelles gestantes	% de follicules cavitaires	Nombre d'implantations/femelle gestante	% d'implantation par rapport aux témoins
M(NO) × F(NO)	12	100	7,3	8,3 ± 0,9	100
M(NNi) × F(NO)	9	75	7,3	4,5 ± 1,7	54
M(JO) × F(NO)	7	60	7,3	5,6 ± 2,4	67
M(JNi) × F(NO)	10	80	7,3	5,8 ± 1,6	70

(B)

	Nombre de femelles gestantes	% de femelles gestantes	% de follicules cavitaires	Nombre d'implantations/femelle gestante	% d'implantation par rapport aux témoins
M(NO) × F(NO)	12	100	7,3	8,3 ± 0,9	100
M(NO) × F(NNi)	6	55	5,6	4,9 ± 1,6	58
M(NO) × F(JO)	7	60	6,6	6,0 ± 2,5	72
M(NO) × F(JNi)	9	72	7	5,5 ± 1,2	65

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. Nombre d'échantillons par groupe : 12.

A : femelles témoins ; B : mâles témoins.

**Tableau 6 : Evolution des taux de MDA (nmol/mg de protéines) dans l'ovaire (A) et dans l'utérus (B) de rates soumises (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traitées (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 60 jours.**

(A)	1j	3j	5j	10j
NO	0,29 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,31 ± 0,06	0,26 ± 0,04
NNi	0,66 ± 0,07 **	0,61 ± 0,03 **	0,82 ± 0,09 **	0,67 ± 0,07 **
JO	0,35 ± 0,01	0,29 ± 0,06	0,36 ± 0,04	0,35 ± 0,03
JNi	0,37 ± 0,03 ++	0,39 ± 0,03 ++	0,41 ± 0,04 ++	0,39 ± 0,06 ++

(B)	1j	3j	5j	10j
NO	0,55 ± 0,13	0,59 ± 0,11	0,71 ± 0,2	0,47 ± 0,07
NNi	1,05 ± 0,15 **	1,09 ± 0,20 **	1,28 ± 0,20 **	0,97 ± 0,11 **
JO	0,57 ± 0,09	0,64 ± 0,10	0,78 ± 0,14	0,52 ± 0,09
JNi	0,70 ± 0,13 ++	0,73 ± 0,08 ++	0,83 ± 0,15 ++	0,62 ± 0,11 ++

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. Nombre d'échantillons par groupe : 12.

\*\* :  $p = 0,01$  par comparaison avec les rats témoins (NO). ++ :  $p < 0,05$  par comparaison avec les rats traités (NNi).

L'augmentation du taux du MDA est significativement moindre chez les rats (JNi) que chez les rats (NNi). Le nickel seul pourrait ainsi provoquer des réactions de peroxydation signalées par l'augmentation du taux du MDA.

#### IV. DISCUSSION

La première partie de ce travail a été réalisée dans le but d'explorer l'impact d'une exposition chronique à travers l'eau de boisson (60 jours) au nickel sur les fonctions reproductrices de rats de souche *Wistar* et d'évaluer les effets d'un jeûne intermittent associé, afin de d'établir si cette restriction calorique module les effets du nickel.

L'étude de la reproduction des rats mâles a montré que le nickel entraînait une diminution du nombre de spermatozoïdes par épидидyme et une augmentation des formes immobiles et immatures. L'étude histologique des testicules a confirmé ces résultats. En effet, au cours des 60 jours d'exposition chronique au nickel, nous avons observé une atrophie des tubes séminifères et une augmentation de 8% à 30% du nombre de tubes séminifères dépourvus de spermatozoïdes. En accord avec nos résultats, Horak et Sunderman [5] ont observé que le nickel diminue le nombre, la quantité et la mobilité des spermatozoïdes et augmente le taux des déformations morphologiques. Des perturbations au niveau de la spermatogenèse, une diminution du potentiel, du nombre des spermatogonies basales et une rétraction des tubes séminifères ont également été rapportées [10].

Nous avons par ailleurs observé, dans la paroi des tubes

séminifères, la présence de travées vides entre les cellules germinales, apparemment sans cellules de Sertoli. Leur disparition pourrait expliquer, du moins pour une part, l'arrêt de la spermatogenèse. En effet, les cellules de Sertoli, sous l'action de la testostérone, libèrent diverses protéines nécessaires à la différenciation des spermatozoïdes, et nous avons observé une chute importante de la concentration sérique de la testostérone après 30 jours de contamination par le nickel.

L'analyse des croisements intergroupes a montré que le taux de gestation le plus faible (55%) était observé chez des femelles (NNi) croisées avec des mâles témoins (NO), ce qui suggérerait un effet du nickel au niveau des gamètes femelles. L'examen histologique des ovaires a en effet mis en évidence une diminution du pourcentage des follicules cavitaires chez les femelles traitées par le nickel par rapport aux témoins. Il semble donc que le nickel ne touche pas la fonction ovarienne endocrine étant donné que le cycle vaginal, premier effecteur du cycle ovarien est normal. Au contraire, le nickel semble toucher l'histologie ovarienne et peut être utérine, ce qui pourrait expliquer la baisse du taux de gestation chez les rates (NNi). Ces effets pourraient témoigner des effets cytotoxiques du nickel.

En effet, divers travaux ont démontré qu'il existait une corrélation positive entre la toxicité du nickel et le taux de peroxydation lipidique des tissus [2]. Le nickel agit en diminuant le taux de Glutathion réduit (GSH) intracellulaire qui est un piègeur de radicaux libres. De plus, par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, il génère des radicaux  $\text{OH}^\circ$  [2], qui sont très réactifs avec les acides gras poly insaturés des membranes cellulaires.

Nous nous sommes intéressés à la corrélation nickel – MDA pour explorer l'effet cytotoxique et peroxydatif du nickel. Pour cela nous avons administré le nickel par injection, ce qui donne un effet rapide nécessaire pour l'exploration de l'effet « stress oxydant » du nickel, et non pas par l'eau de boisson donnant les effets plus lents, risquant d'être masqués par un phénomène d'adaptation et de réparation. Nous avons mis en évidence une augmentation du dialdéhyde malonique (MDA), produit de scission des peroxydes lipidiques, au niveau des tissus, ovarien et utérin, de rats injectés par voie intra péritonéale avec du Ni Cl<sub>2</sub> pendant 1 à 10 jours. Cet aldéhyde peut par ailleurs, en se fixant sur le GSH, diminuer ce système de défense antioxydant et augmenter les probabilités de dommages dus aux radicaux libres [2].

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est un processus physiologique normal de l'organisme, mais il a été observé qu'un déséquilibre entre le taux de génération des ROS et les systèmes de défense antioxydants est souvent associé à une oligospermie ou une infertilité [9]. La peroxydation des acides gras insaturés de la membrane plasmique des spermatozoïdes est un facteur qui diminue la probabilité de fusion spermatozoïde – ovocytes. On peut donc faire l'hypothèse que, dans nos conditions expérimentales, la diminution de fertilité des rats mâles ou femelles exposés au nickel est en relation avec le stress oxydant généré par ce métal et plus particulièrement avec la peroxydation des lipides membranaires des gamètes mâles et femelles.

Le jeûne intermittent a induit une baisse du taux de la testostérone circulante et une diminution du nombre des gamètes mâles et femelles et a induit une diminution du taux de gestation et du nombre d'implantations de 30% environ. Cet effet n'est pas dû à une malnutrition. En effet des études préliminaires dans notre laboratoire, ont permis de conclure que dans nos conditions expérimentales, le jeûne intermittent n'entraînait pas de déficience minérale, mais seulement une restriction calorique. Celle ci pourrait être à l'origine de la baisse de la fertilité. Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de modification du taux de MDA, ce qui nous permet de confirmer les hypothèses selon lesquelles les effets bénéfiques de la restriction calorique résulteraient d'une diminution des dommages oxydatifs.

Agarwal et Saleh [1] ont observé que la baisse de fertilité était associée à une augmentation du nombre des spermatozoïdes anormaux chez des rats ayant une ration alimentaire diminuée de 35% par rapport à celle des témoins, et ceci bien que l'apport en protéines et vitamines soit rééquilibré. Cet auteur suggère que la restriction alimentaire pourrait induire des dommages génotoxiques au niveau des cellules germinales.

Il semble que le nickel et le jeûne intermittent appliqués d'une façon séparée provoquent chacun une diminution de la fertilité. Toutefois, leurs mécanismes d'action ne sont pas les mêmes. Si le jeûne intermittent intervient par ses effets hypocaloriques, le nickel intervient par ses effets oxydatifs cytotoxiques. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des résultats du MDA dont les taux utérin et ovarien ont augmenté avec le nickel et non pas avec le jeûne.

L'association d'une contamination au nickel chez des rats soumis à une restriction calorique n'a pas entraîné une baisse supplémentaire de la fertilité des rats mâles ou femelles. Il semble donc que les effets dégénératifs du nickel sur la reproduction soient inhibés lorsque le nickel est associé à une restriction calorique. Ceci est confirmé par divers travaux ; Lebourg [8] a montré que des rats sous alimentés avaient des longévités moyennes et maximales supérieures à celles des animaux nourris à volonté, à condition de prendre la précaution de ne pas induire de déficience en sels minéraux. Lane [7] a lui aussi rapporté que le régime hypocalorique constituait un régime de longévité.

## V. CONCLUSION

**Nos résultats montrent que le nickel et le jeûne intermittent diminuent la fertilité des rats par deux mécanismes différents dont les effets ne s'additionnent pas. La toxicité du nickel ne s'exprime pas chez les rats soumis au jeûne intermittent, en accord avec le suivi des taux du MDA. L'effet hypocalorique du jeûne intermittent pourrait être à l'origine de l'inhibition des effets cytotoxiques du nickel métal classé parmi les stress oxydants.**

## REFERENCES

1. AGARWAL A., SALEH R. A. : Role of oxidants in male infertility : rationale, significance and treatment. Urol. Clin. North Am., 2002, 29: 817-827.
2. CHAKRABARTI S. K., CHENGJIANG B. : Role of oxidative stress in nickel chloride induced cell injury in rat renal cortical slices. Bioch. Pharmacol., 1999, 58 : 1501-1510.
3. CHAKROUN H., HFAIEDH N., MAKNI AYADI F., GUERMAZI F., KAMMOUN A., ELFEKI A. : Nickel et fertilité chez le rat. Rev. Eur. Sexol., 2003, XII : 28-34.
4. CHAKROUN H., HFAIEDH N., MAKNI AYADI F., GUERMAZI F., KAMMOUN A., ELFEKI A. : Nickel and fertility in the rat. Eur. J. Sexol., 2003, XII : 35-38.
5. HORAK E., SUNDERMAN F.W. Jr : Nephrotoxicity of nickel carbonyl in rats. Ann. Clin. Lab. Sci., 1980, 10 : 425-431.
6. KAKELA R., KAKELA A., HYVARINEN H. : Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. Endocrinol., 1999, 123 : 27-37.
7. LANE M.A. : La restriction calorique, un régime de longévité. Biofutur, 2001, Octobre, Hors Série : 40-42.
8. LEBOURG E. : Le bestiaire de la gérontologie expérimentale. La Recherche, 1999, 322 : 39-43.
9. RAJESHKUMAR T., DORESWAMY K., SHRILATHA B.M. : Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice : induction of abnormal sperms and effects on fertility. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Mutation Research, 2002, 513 : 103-111.
10. SALTMAN T. : Trace elements and blood pressure. Ann. Intern. Med., 1983, 98 : 823-827.
11. SHILL W.B. : Effect of environmental pollutants on the spermogram. Toxicol. Lett., 1986, 37 : 301-313.
12. SINAWAT S. : The environmental impact on male fertility. J. Med. Ass. Thai., 2000, 83 : 880-885.



13. SUNDERMAN F.W. : A review of the metabolism and toxicology of nickel. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1977, 5 : 377-398.
14. WONG W.Y., THOMAS C.M., MERKUS J.M., ZIELHUIS G.A., STEEGERS R.P. : Male factor sub fertility : possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil. Steril.*, 2000, 73 : 435-442.
15. XIE. J., SUNAKOSHI T., SHIMADA H., KOJIMA S. : Effects of chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel. *Toxicology*, 1995, 103 : 147-155.

*Manuscrit reçu : juin 2003 ; révisé janvier 2004 ; accepté août 2004.*

## ABSTRACT

### Interactions of caloric restriction with the effects of nickel on reproduction in rats

Najla HFAIEDH, Mohamed Salah ALLAGUI,  
Françoise CROUTE, Jean Pierre SOLEILHAVOUP,  
Fadhel GUERMAZI, Abdelaziz KAMMOUN,  
Abdelfattah EL FEKI

Human epidemiological studies have demonstrated signs of a reduction, since 1960, of several parameters of the sperm count with an increase of certain male genital tract diseases. The increasing contamination of the environment by chemical compounds appears to be an aetiological factor. Various authors have also proposed the hypothesis that caloric restriction has a beneficial effect on health or longevity.

This study was designed to compare the effects of nickel on the reproductive functions of rats fed either daily or every second day, in order to evaluate the possible beneficial effects of caloric restriction on rat fertility.

This study was conducted with male and female Wistar rats, fed either daily (N), or every second day: intermittent fasting (F). After one month of this treatment, (N) and (F) rats were divided into 2 groups: one group received tap water (NO and FO groups), and the other received the same water enriched with nickel chloride (100 mg/L, NNi and FNi groups). Intermittent fasting was continued in parallel with nickel treatment with for 2, 4, 10, 16, 30 and 60 days. To study malonic dialdehyde (MDA) levels, nickel was administered by intraperitoneal injection at the dosage of 4 mg NiCl<sub>2</sub>/kg of body weight for 1, 3, 5 and 10 days.

Our results show that nickel induces atrophy of the seminiferous tubules with a reduction of the sperm count and a reduction of serum testosterone levels. A reduction of the number of ovarian follicles was observed in females.

Intermittent fasting induced the same types of disturbances with more marked reductions of the number of mobile spermatozoa and serum testosterone levels than those observed after exposure to nickel. The combination of the two factors, fasting and nickel, did not amplify these effects.

Analysis of intergroup crosses showed that the pregnancy rate and especially the mean number of implantations were decreased in rats exposed to nickel and/or submitted to intermittent fasting. The lowest pregnancy rate (55%) was observed in (NNi) females crossed with (NO) control males. The smallest number of implantations was observed in (NO) control females crossed with (NNi) males. Nickel did not induce any additional reduction of fertility in rats submitted to intermittent fasting.

MDA assays showed that nickel induces lipid peroxidation in ovarian and uterine tissues. However, the relative increase of the MDA level was lower in FNi than NNi rats, i.e. when nickel was associated with intermittent fasting.

Our results suggest that nickel and intermittent fasting decrease fertility in rats via two different mechanisms whose effects are not additive. When associated with intermittent fasting, nickel becomes non-toxic, as confirmed by monitoring of MDA levels. The low-calorie effect of intermittent fasting could be responsible for inhibition of the cytotoxic effects of metallic nickel classified as an oxidative stress.

*Keys words : fast, nickel, reproduction and caloric restriction*