

# Incidences de la restriction calorique et du Nickel sur l'aromatase testiculaire du rat

Najla HFAIEDH<sup>1</sup>, Mohamed Salah ALLAGUI<sup>1</sup>, Françoise CROUTE<sup>3</sup>,  
Fadhel GEURMAZI<sup>4</sup>, Abdelfettah EL FEKI<sup>1</sup>, Serge CARREAU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'écophysiologie Animale, Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie  
Unité de recherche biochimie macromoléculaire et génétique, Faculté des Sciences de Gafsa, Tunisie

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie IBFA, Université de Caen, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire & Pollution, Faculté de Médecine de Toulouse,  
Université Paul Sabatier, 37 allées Jules Guesde, 31073 Toulouse, France.

<sup>4</sup> Laboratoire de biophysique, Faculté de Médecine de Sfax, Service Médecine nucléaire,  
CHU Habib Bourguiba de Sfax, Tunisie

## RESUME

Des études épidémiologiques chez l'homme ont montré qu'il existait, depuis 1960, des signes d'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 reproduction masculine.

Ce travail a pour objectif de comparer les effets du nickel sur les processus de reproduction, entre autres l'étude de l'aromatase, chez des rats mâles nourris soit tous les jours, soit un jour sur deux, afin d'évaluer les possibles effets bénéfiques, ou non, d'une restriction calorique sur la fertilité des rats mâles.

Dans ce but, nous avons utilisé des rats mâles de souche « Wistar » nourris, soit tous les jours (groupe N), soit un jour sur deux (jeûne intermittent) (groupe J). Après un mois de ce traitement, les rats des deux lots (N) et (J) sont répartis chacun en deux groupes : l'un injecté intra-péritonéalement avec du NaCl 9‰ (groupes NO et JO), l'autre injecté intra-péritonéalement avec du NiCl<sub>2</sub> à raison de 4mg/kg (groupes NNi et JNi). Le jeûne intermittent se poursuit parallèlement au traitement par le nickel, et ceci durant 1, 3, 5 et 10 jours.

Nous avons choisi pour notre étude comme biomarqueurs sexuels : dosage sérique des oestrogènes, dosage des ARN totaux et l'exploration moléculaire de l'ARNm de l'aromatase testiculaire.

L'étude de l'aromatase montre que le nickel seul stimule l'activité de l'aromatase testiculaire et provoque la dégradation des ARN totaux durant le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jours de traitement.

Le jeûne intermittent seul n'induit pas de variations significatives. Dans le cas où le nickel est associé au jeûne intermittent, il semble que pour le taux des ARN totaux testiculaires, l'effet du jeûne l'emporte, pas de dégradation des ARN totaux, d'où ses effets bénéfiques en protégeant les ARN totaux des effets délétères du nickel. On note aussi une surexpression de l'ARNm de l'aromatase vers le 10<sup>ème</sup> jours de traitement.

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** : aromatase, testicule, rat, nickel, stress oxydant, restriction calorique

Correspondance :

Dr Serge CARREAU - Biochimie-Université, EA 2608-US  
C2006 INRA, Esplanade de la Paix, 14032 Caen -  
Tel 02 31 56 54 88 - Fax 02 31 56 51 20 -  
Email serge.carreau@unicaen.fr

## I. INTRODUCTION

Il a été rapporté que la qualité du sperme humain (densité, nombre, mobilité, taux de capacitation) a décliné au cours de ces dernières décades [23]. Parmi les facteurs en cause, on cite les facteurs nutritionnels [34]. Diverses études suggèrent que la malnutrition, lorsqu'elle induit une déficience en minéraux, peut amplifier les effets nocifs de polluants environnementaux sur les fonctions reproductrices mâles. De plus, l'exposition au nickel de rats adultes souffrant d'une déficience minérale augmente le taux de mortalité des petits pendant la lactation [25]. Teixeira et al. [28] ont montré que la malnutrition maternelle durant la lactation altère les concentrations sériques d'estradiol et de testostérone, l'expression de l'aromatase, les androgènes testiculaires ainsi que les récepteurs d'estrogènes (ER $\alpha$ ). La malnutrition, d'après de nombreux chercheurs, est connue comme un régime qui affecte le système endocrinien [22, 20]. Xie et al. [35] ont également montré que l'intoxication par divers métaux lourds (plomb, cadmium, nickel,...), chez des rats mal nourris, amplifiait le blocage de la spermatogenèse.

Inversement, divers auteurs ont observé que la restriction calorique augmente la longévité et retarde le vieillissement testiculaire. Des auteurs [18, 32] ont 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. De même, Thorenton [29] a montré que la restriction calorique a tendance à diminuer les maladies cancéreuses provoquées par le stress oxydant et les réactions inflammatoires. Chen et al. [7] ont rapporté que la restriction calorique à long terme protège contre la chute des activités stéroïdogéniques leydigiennes caractéristiques du vieillissement. Il est connu aussi que la restriction calorique peut inhiber l'altération du système reproducteur et augmente sa capacité à synthétiser les stéroïdes [19].

Parmi les autres facteurs qui affectent la fertilité masculine, on cite les polluants environnementaux, les produits chimiques utilisés dans l'agriculture et l'industrie, et les métaux lourds (plomb, cadmium, nickel...).

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 des glomérules et une protéinurie [31]. Il produit aussi des perturbations sexuelles [6]. Des études ont montré qu'il entraîne une peroxydation lipidique, qui serait en relation avec la production de radicaux hydroxyles [6, 11]. Il peut ainsi altérer le statut antioxydant de la cellule.

D'autres études ont montré que certains métaux lourds (plomb, nickel,...) affectent le système endocrinien, entre autres diminuent l'expression des protéines et l'ARNm du cytochrome P450 aromatase [16, 33]. En

effet, l'aromatase est l'enzyme responsable de la conversion irréversible des androgènes en estrogènes. Dans la gonade mâle de différentes espèces de mammifères, l'aromatase a été immuno-localisée non seulement dans les cellules de Leydig, mais aussi dans les cellules de Sertoli des tubes séminifères. La fonction de reproduction chez le mâle est sous le contrôle des hormones gonadotropes hypophysaires [4, 5, 17].

Outre cette régulation endocrine, il existe une régulation locale intragonadique dont dépend le bon déroulement de la spermatogenèse. Cette régulation locale fait notamment intervenir les stéroïdes, les facteurs de croissances et les cytokines [17].

Au cours de ce travail, nous avons étudié la régulation de l'aromatase dans les gonades mâles (testicules) chez des rats traités par le chlorure de nickel et soumis ou non au jeûne intermittent, afin d'évaluer les effets bénéfiques protecteurs de ce régime hypocalorique face à la toxicité du nickel. En particulier, nous avons exploré les effets du nickel et du jeûne intermittent sur les taux des estrogènes sériques, l'activité aromatase, le dosage des ARN totaux et la RT-PCR afin de mettre en évidence l'ARNm de l'aromatase.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. Animaux

Notre étude a été réalisée sur 96 rats mâles de souche « Wistar » et de poids corporel moyen voisin de 180g. Ces animaux sont groupés par groupe de huit par cage, dans une animalerie où la température est maintenue à 23°C avec hygrométrie stable, munie d'un système de ventilation et d'un système réglant les périodes d'obscurité (10h) et de lumière (14h). Les animaux étaient nourris de granulés équilibrés sur le plan énergétique (SICO-Sfax, Tunisie). L'alimentation, qualitativement équilibrée par rapport aux normes internationales, est à base de blé, de son fin, de luzerne, de soja et de composés minéralo-vitaminés à base de phosphate bi-calcique, de carbonate de chaux, d'oligo-éléments et de vitamines.

### 2. Traitement

Les rats mâles, âgés de trois mois, ont été répartis en deux lots, l'un recevant chaque jour 20 g de nourriture par animal (groupe N), et l'autre la même quantité de nourriture un jour sur deux (groupe J), et ceci pendant un mois. Dans les deux cas, la nourriture est donnée à raison de 20 g par rat, ce qui empêche les animaux soumis au jeûne de compenser ce qu'ils n'ont pas mangé le jour de la privation de nourriture.

Après un mois, chaque lot a été divisé en deux groupes, l'un injecté intra-péritonéalement avec du NaCl 9‰ (groupes NO et JO), l'autre injecté intra-péritonéalement avec du NiCl<sub>2</sub> à raison de 4mg/kg du PC (groupes NNI et JNi). Le jeûne intermittent a été poursuivi parallèle-

ment au traitement par le nickel pendant 1, 3, 5, et 10 jours.

La dose de nickel est choisie d'après la bibliographie [13]. Il s'agit d'une dose proche de celles de nos conditions environnementales dans certaines régions polluées. Les animaux sont pesés chaque jour pendant toute la durée de l'expérimentation.

### **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 artérioveineux a été recueilli sans anticoagulant, puis centrifugé. Le sérum a été stocké à -20°C pour le dosage ultérieur des hormones sexuelles. Les testicules sont conservés à -80°C pour l'étude de l'aromatase.

### **4. Dosage des estrogènes sériques**

Le dosage est basé sur la compétition entre un stéroïde marqué et son homologue froid vis à vis des sites de liaison à l'anticorps. Les stéroïdes présents dans les sérums sont extraits par cinq volumes de diéthyléther. Un traceur (1000 cpm de stéroïde radioactif) est ajouté à l'échantillon à raison de 100µl avant l'extraction afin de connaître le pourcentage de récupération. Après 3 min de vortex pour chaque échantillon, la phase éther est séparée de la phase aqueuse par congélation à -80°C. La phase organique récupérée est évaporée à sec, puis reprise dans 300µl de tampon phosphate. On détermine ensuite le pourcentage de récupération. Tous les tubes reçoivent ensuite 100 µl de stéroïde radioactif (6000 cpm) et 100 µl d'anticorps. Après une 2<sup>ème</sup> nuit d'incubation à 4°C, 500µl d'une solution de charbon-dextran sont ajoutés à chaque tube.

Les tubes sont incubés 10 min à 4°C puis centrifugés 10 min à 2700g à 4°C. Le surnageant est récupéré, mélangé à du scintillant et mis à compter.

### **5. Mesure de l'expression du gène de l'aromatase**

#### **a) Extraction des microsomes testiculaires**

Les échantillons sont potterisés dans un tampon phosphate. Le lysat est alors centrifugé 5 minutes à 2000 rpm à 4°C. Le surnageant est prélevé et ultracentrifugé. On prépare par la suite une solution radioactive d'androsténédione à partir de la solution mère radioactive.

#### **b) Dosage des protéines**

Les protéines sont dosées selon la technique de Bradford [2] en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard.

#### **c) Mesure de l'activité enzymatique de l'aromatase**

Une quantité connue de protéines (1mg) est incubée 3

heures à 37°C en présence de tampon phosphate et de NADPH. Le volume total doit être égal à 500 µl. La réaction est stoppée avec l'ajout de 1 ml de chloroforme. Une centrifugation de 5 min à 4000 rpm à 4°C est réalisée pour séparer la phase aqueuse de la phase chloroforme.

La phase aqueuse est récupérée. 500 µl d'une solution de charbon (5% de charbon et 0,05% de tween 20) sont alors ajoutés à chaque tube. Les tubes sont incubés 10 min à 4°C puis centrifugés 10 min à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré, mélangé à du scintillant et mis à compter.

### **6. Dosage des ARN totaux testiculaires**

Cette technique dérive de la technique de Chomzynski et Sacch [8]. Le culot de cellules est dissous dans une solution de lyse permettant une dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. L'homogénat est placé dans un bain-marie glacé. Toute l'extraction se déroule à 4°C. Un volume d'acétate de sodium (pH = 4) ; 10 volumes de phénol ; 2 volumes d'un mélange d'alcool isoamylique et de chloroforme (v/v : 1/49) sont ajoutés à la préparation. Après centrifugation, la phase aqueuse est reprise avec de l'isopropanol ; les ARN sont ensuite précipités deux fois par congélation à -80°C. Après décongélation et centrifugation, le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol à 75%, séché à 65°C dans un bain marie pendant 15 min et dissous dans de l'eau DEPC. Les ARN aliquotés sont placés à -80°C jusqu'à utilisation.

L'évaluation quantitative et qualitative des ARN est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm d'une aliquot de la solution mère diluée. Une unité de DO correspond à une concentration de 40µg/ml. Une préparation est considérée comme pure si le rapport DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> est proche de 1,8-2.

### **7. Exploration moléculaire de l'ARN de l'aromatase testiculaire par transcription inverse – polymérisation en chaîne**

La RT-PCR a été choisie pour mettre en évidence le messager du cytochrome P450 aromatase. Elle permet une amplification du messager un grand nombre de fois et donc de travailler sur une petite quantité de matériel.

#### **a) La transcription inverse (RT)**

Par tube : 200 UI de M-MLV RT, 500 µM de dNTPs, 0,2 µg d'oligo dT (12-18 bases) ; 24 UI de RNasin dans un tampon de RT (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 ; KCl 375 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM ; DTT 50 mM). Une quantité d'ARN total connue est ajoutée et complétée à 40 µl avec de l'eau ultra pure. Ce mélange réactionnel est incubé une heure à 37°C, permettant la synthèse de l'ADNc, puis 5 min à 95°C afin de dénaturer la reverse transcriptase. Des contrôles sont réalisés en remplaçant l'ARN par de l'eau stérile, afin de vérifier une éventuelle contamination. Les

ADNc sont conservés à 4°C ou directement utilisés pour l'amplification en chaîne.

### b) La polymérisation en chaîne (PCR)

Plusieurs types de messagers vont être recherchés : le messager du gène d'intérêt, l'aromatase, et celui de l'actine, permettant de vérifier la présence d'ARN dans les échantillons traités. En effet, le gène de l'actine est un gène de « ménage », son expression est donc constitutive, et il est exprimé dans tous les types cellulaires (contrôle de la présence d'ARN dans nos échantillons).

Comme pour l'étape de RT, la solution est préparée pour l'ensemble des échantillons puis distribuée à raison de 45 µl par tube. La concentration finale par tube est de 200 µM de dNTPs ; 50 pmoles d'amorces ; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1,5 UI de Taq polymérase dans un tampon de PCR (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 ; NaCl 100 mM ; EDTA 0,1 mM ; DTT 1 mM ; glycérol 50% ; Triton®X-100 1%). On ajoute ensuite 5µl de la solution de RT et l'amplification est lancée par une étape de 5 min à 94°C, puis s'ensuit les cycles d'amplification aux conditions de températures définies pour chaque couple d'amorces. La PCR se termine par une incubation de 10 minutes à 72°C pour permettre la fin de l'élongation.

Les différents couples d'amorces utilisés dans cette étude ainsi que leur position sur le messager et la taille attendue du produit de PCR sont listés dans le **Tableau 1**. La spécificité de chacun des couples d'amorces utilisés a d'abord été contrôlée à l'aide du logiciel Blast. Nous avons ainsi vérifié que chaque amorce ne s'hybride pas à un autre endroit du gène où elle a été définie ou sur un autre gène de séquence connue et répertoriée.

### c) Visualisation du produit amplifié

Elle s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TAE. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisables sous UV (grâce au BET) à 254 nm.

### 8. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. Les comparaisons entre groupes témoins et traités sont réalisées par un test « t » de Student ; p ≤ 0,05 est considéré comme significatif.

## III. RESULTATS

### 1. Taux des estrogènes sériques

Les concentrations en œstradiol sérique que nous avons mesurées chez les rats mâles témoins sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature.

Aucune variation statistiquement significative entre les groupes traités ou non au chlorure de nickel et soumis ou non au jeûne intermittent n'a été observée. Ceci pourrait s'expliquer soit par des variations inter individus, c'est à dire intra groupe, pouvant ainsi masquer les différences entre les groupes, soit par une augmentation de l'activité aromatase qui maintient un taux stable d'œstradiol chez les rats traités par le nickel par rapport aux témoins (**Figure 1**).

### 2. Mesure de l'activité enzymatique de l'aromatase testiculaire

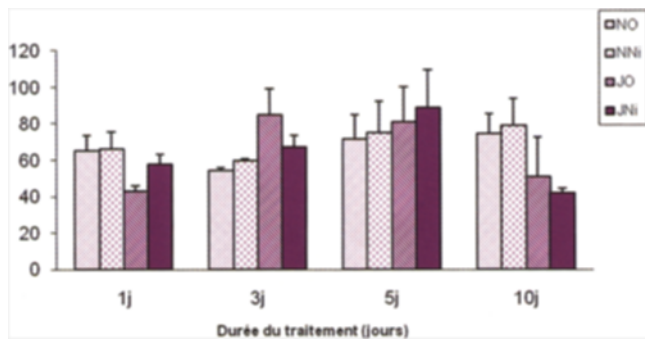
Nos résultats montrent que le nickel induit au niveau des testicules une augmentation significative de cette activité enzymatique chez les rats traités par rapport aux témoins durant le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour de traitement. Chez les rats soumis à un jeûne intermittent (JO), l'activité aromatase ne varie pas par rapport aux témoins (NO). Dans le cas où le jeûne intermittent est associé au nickel (JNi), on note une augmentation de cette activité aromatase qui demeure toutefois faible par rapport à celle mesurée dans le cas où le nickel est administré seul (**Figure 2**).

### 3. Impacts sur le taux des ARN totaux testiculaires

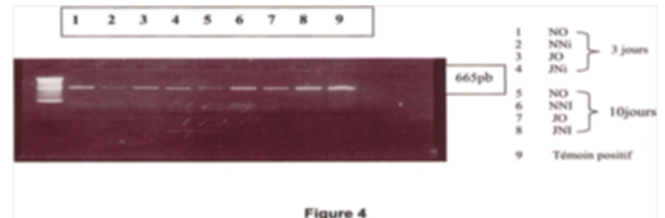
Lors de l'extraction des ARN totaux au niveau des testicules, les DO étaient avec des rapports (DO260/DO280) largement acceptables (voisin de 1,8), ce qui montre que notre technique d'extraction est bien menée. Les quantités de ces ARN montrent une diminution significative chez les rats traités par le chlorure de nickel durant le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour de traitement, témoignant ainsi d'effets génotoxiques. Toutefois, chez les groupes soumis au jeûne intermittent traités (JNi) ou non (JO) par le chlorure de nickel, les variations des taux des ARN ne sont pas significatives par rapport aux témoins, surtout vers la fin du traitement (**Figure 3**). Chez les rats (JNi) et (Nni), les variations des taux d'ARN totaux ne sont significatives que vers le 10<sup>ème</sup> jour de traitement.

**Tableau 1 : Couples d'amorces utilisés ainsi que leur position sur le messager et la taille attendue du produit de PCR.**

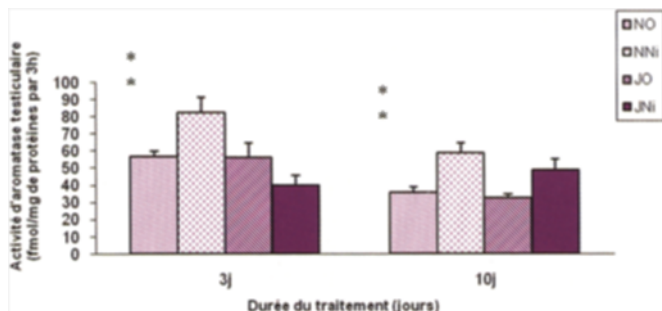
Amorces	Séquences	Taille du produit de PCR
5' AROM	5'-GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG-3' (exon 8: 1555-1577)	289 pb
3' AROM	5'-CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG-3' (exon 9: 1821-1844)	
5' actin	5'-ACAGACTACCTCATGAAGAT-3'	665 pb
3' actin	5'-AGCCATGCCAAATGTCTCAT-3'	



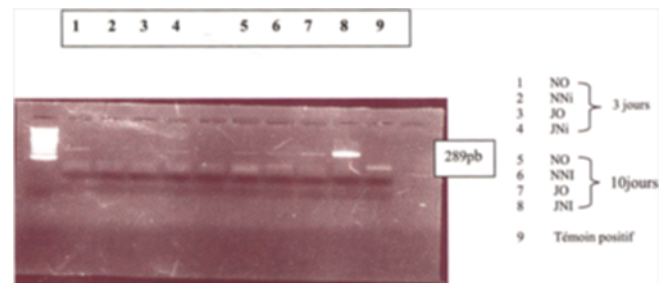
**Figure 1 :** Taux d'estradiol sériques (pg/ml) chez des rats mâles soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 1, 3, 5 et 10 jours. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (n=8). Pas de différence significative entre les différents groupes.



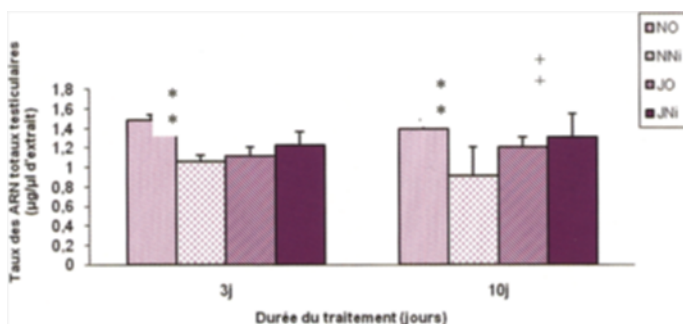
**Figure 4 :** Visualisation du gène de l'actine pour certains échantillons testiculaires des rats soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 3 et 10 jours.



**Figure 2 :** Dosage de l'activité aromatase testiculaire (fmol/mg de protéines par 3h) chez des rats soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel à partir de 3<sup>ème</sup> jour. \*\* :  $p < 0.01$  par comparaison avec les rats témoins (NO). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (n=8).



**Figure 5 :** Amplification du gène de l'aromatase par RT-PCR pour certains échantillons testiculaires des rats soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 3 et 10 jours.



**Figure 3 :** Variation du taux des ARN totaux testiculaires ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  d'extrait) chez des rats soumis (J) ou non (N) à un jeûne intermittent et traités (Ni) ou non (O) au chlorure de nickel durant 3 et 10 jours (les extraits sont ajustés à  $2\mu\text{g}$  de protéines  $\mu\text{l}$  d'extrait). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (n=8).\*\* :  $p < 0.01$  par comparaison avec les rats témoins (NO). ++ :  $p < 0.01$  par comparaison avec les rats traités (NNi).

#### 4. Transcription inverse-Polymérisation en chaîne

Les ARN sont ensuite rétro-transcrits afin d'amplifier les ARNm de l'actine et de l'aromatase. Pour le gène de contrôle de l'actine, nos résultats montrent des bandes bien nettes ce qui prouve que notre technique RT-PCR a été bien réalisée (**Figure 4**).

Chez les groupes traités au nickel et soumis au jeûne intermittent durant 10 jours de traitement, cette technique RT-PCR montre par rapport aux témoins une sur-expression de l'ARNm d'aromatase testiculaire (**Figure 5**).

#### IV. DISCUSSION

L'étude de la reproduction des rats mâles a montré, suite à des travaux de recherche préliminaires, que le nickel entraînait une diminution du nombre de spermatozoïdes par épидидyme et une augmentation des formes immobiles et immatures avec une diminution du taux de testos-

térone sérique. Cette étude a été confirmée par un examen histologique. En effet, après 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 [35, 10].

Le jeûne intermittent a induit une baisse du taux de la testostérone circulante et une diminution du nombre de gamètes mâles [10].

Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé d'amplification d'effet sexuel cytotoxique dans le cas où le jeûne intermittent est associé au nickel, ceci nous permet de confirmer les hypothèses selon lesquelles les effets bénéfiques de la restriction calorique résulteraient d'une diminution des dommages oxydatifs. Il semble que le nickel et le jeûne intermittent provoquent chacun une diminution de la fertilité, mais leurs effets ne s'additionnent pas. Si le jeûne intermittent intervient par ses effets hypocaloriques, le nickel intervient par ses effets oxydatifs cytotoxiques [10].

Afin de confirmer cette hypothèse originale, nous avons proposé des études plus approfondies telles que l'étude de l'aromatase. L'aromatase est en fait un complexe enzymatique qui catalyse la transformation des androgènes en œstrogènes, localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique et constituée de deux entités ; une réductase ubiquitaire : la NADPH cytochrome P450 réductase, responsable du transfert des électrons du NADPH vers le cytochrome P450 aromatase, et le cytochrome P450 aromatase : catalyseur des séries de réactions menant à la formation du cycle A phénolique, caractéristique des œstrogènes [21].

Selon nos résultats, le chlorure de nickel n'a pas modifié les concentrations sériques des œstrogènes entre les groupes, et les concentrations trouvées sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature [14]. Nos résultats montrent que les taux d'œstrogènes testiculaires se stabilisent malgré la chute de testostérone, ceci ne pourrait s'expliquer que par une stimulation de l'activité enzymatique de l'aromatase suite à l'exposition au chlorure de nickel. En effet, notre étude montre bien que le nickel stimule l'activité aromatase testiculaire malgré la chute de la testostérone sérique chez les rats traités par rapport aux témoins durant le 3<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jours de traitement. De nombreuses études confirment que les polluants environnementaux agissent sur le phénomène d'aromatation en activant sous cette réaction la conversion des androgènes en œstrogènes [1, 25, 30, 33].

Taupeau et al. [26] ont montré inversement que le plomb affecte la fertilité féminine en diminuant la transcription des gènes de P450 aromatase ainsi que l'expression des récepteurs des estrogènes (ER $\beta$ ) au niveau des ovaires. Le plomb affecte aussi le système endocrinien,

en altérant les cellules de Leydig, et chez la femelle il diminue l'activité stéroïdogénique des ovaires [3, 16, 27].

En présence du jeûne intermittent, le taux d'œstradiol sérique ne varie pas chez les (JO) par rapport aux témoins ; même pour la mesure de l'activité aromatase, les variations ne sont pas significatives chez ce groupe malgré la baisse du taux de la testostérone sérique.

Dans le cas où le jeûne intermittent est associé au nickel, le taux des œstrogènes reste encore constant et ne montre pas de variations significatives par rapport aux témoins. Toutefois, pour l'activité aromatase, nos résultats montrent une augmentation par rapport aux témoins essentiellement au bout du 10<sup>ème</sup> jour de traitement, mais qui demeure faible par rapport à celle observée chez les rats (NNi).

Nos résultats relatifs aux ARN totaux dans les testicules montrent que les DO étaient correctes avec des rapports (260/280) largement acceptables (autour 1,8), et que les quantités des ARN totaux diminuent significativement sous l'effet du chlorure de nickel administré durant 3 et 10 jours. On peut donc dire que le nickel, en tant que stress oxydant par la formation des radicaux libres oxygénés, dégrade les ARN testiculaires, ce qui est confirmé par les travaux de Snow et Costa [24] qui ont montré chez le rat que le nickel, par ses effets cytotoxiques, altère les protéines, l'ADN et l'ARN au niveau du foie, des reins, de la rate et des testicules. Kaur et Dani [15] ont rapporté aussi que le nickel se fixe à l'ARN mais pas à l'ADN ni aux protéines, et induit une carcinogénicité. D'autres études ont montré que le stress oxydant induit par le nickel au niveau des testicules, à différentes concentrations, est associé à des dommages d'ADN et d'ARN ainsi qu'à une apoptose [9].

Chez les groupes soumis au jeûne intermittent, les quantités des ARN totaux ne montrent pas de variations par rapport aux témoins. Associé au jeûne intermittent, le nickel n'intensifie pas l'altération des ARN, ce qui prouve encore que le jeûne intermittent en tant que restriction calorique n'intensifie pas les effets génotoxiques du nickel.

Après RT-PCR, l'association du nickel avec le jeûne intermittent durant 10 jours induit une surexpression de l'ARNm d'aromatase testiculaire. C'est l'effet du jeûne intermittent qui l'emporte dans ces conditions, étant donné que le nickel seul manifeste ses effets génotoxiques, en association avec le jeûne intermittent ces effets seront réduits.

Il semble donc que la stimulation de l'activité enzymatique de l'aromatase par le nickel constitue un moyen de défense de l'organisme pour faire face à la chute du taux de la testostérone et empêcher l'infertilité. Ce moyen de défense est exprimé même en présence du jeûne intermittent en tant que restriction calorique et non plus mal-

nutrition. Higashimoto et al. [12] ont montré que la restriction calorique réduit les effets cytotoxiques et génotoxiques du nickel. De même Chen et al. [7] ont rapporté que la restriction calorique protège contre l'infertilité par l'activation des récepteurs des androgènes et des œstrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ). Inversement d'autres études ont rapportés que la malnutrition affecte l'aromatase et les récepteurs des androgènes et des estrogènes. En effet, Zqwade et al. [36] ont montré que la malnutrition induit des modifications au niveau du comportement sexuel des femelles en réduisant le nombre des récepteurs d'œstrogènes hypothalamiques. Ce qui confirme bien nos résultats, à savoir que le jeûne intermittent n'est pas une malnutrition qui intensifie les effets du nickel sur la reproduction et l'étude de l'aromatase, mais en tant que restriction calorique bénéfique.

## V. CONCLUSION

**On peut dire 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 n'est pas amplifiée chez les rats soumis au jeûne intermittent, en accord avec le suivi de l'aromatase. La restriction calorique pourrait être à l'origine de l'inhibition des effets cytotoxiques du nickel, métal classé parmi les stress oxydants.**

## REFERENCES

- ADAMO S.A., CHASE R. : Dissociation of sexual arousal and sexual proclivity in the garden snail, *Helix aspersa*. *Bahav. Neural. Biol.*, 1990, 54 : 115-130.
- BRADFORD M. : A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Ann. Biochem.*, 1976, 72 : 248-254.
- BRANDENBERGER A.W., TEE M.G., JAFFE R.B. : Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines : down-regulation of ER? in neoplastic tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83 : 1025-1028.
- CARREAU S. : Estrogens-male hormones? *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2003, 41 : 107-111.
- CARREAU S., BOURGUIBA S., LAMBARD S., GALERAD D.I., GENISSEL C., LEVALLET J. : Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2002, 193 : 137-143.
- CHAKROUN H., HFAIEDH N., MAKNI AYADI F., GUERMAZI F., KAMMOUN A., ELFEKI A. : Nickel et fertilité chez le rat. *Rev. Eur. J. Sexocol.*, 2003, 12 : 28-34.
- CHEN H., LUO L., LIU J., BROWN T., ZIKIN B.R. : Aging and caloric restriction : effects on Leydig cell steroidogenesis. *Exper. Geront.*, 2005, 40 : 489-505.
- CHOMZYNSKI P., SACCHI N. : Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, 162 : 156-159.
- GREDILLA R., LOPPEZ-TORRES M., BORJA G. : Effect of time of restriction on the decreases in mitochondrial free radical generation at complex-I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.*, 2001, 15 : 1589-1591.
- HFAIEDH N., ALLAGUI M.S., CROUTE F., et al. : Interactions d'une restriction calorique avec les effets du nickel sur la reproduction. *Andrologie*, 2004, 14 : 443-451.
- HFAIEDH N., ALLAGUI M.S., ELFEKI A., SOLEILHAVOUP J.P., CROUTE F. : Effects of nickel poisoning on expression pattern of the 72/73 and 94 kda stress proteins in rat organs and in the COS-7, HepG2, A549, cell lines. *J. Biochem. Molec. Toxicol.*, 2005, 19 : 1-7.
- HIGASHIMOTO M., SANO M., KONDOH M., SATO M. : Different responses of metallothionein and leptin induced in the mouse by fasting stress. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2002, 1 : 75-84.
- KAKELA R., KAKELA A., HYVARIEN H. : Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Endocrinol.*, 1999, 123 : 27-37.
- KAMTCHOVIN P., HOCHEREAU de REVIERS M.T., PERREAU C., BOUJRAD N., CARREAU S. : Strain differences in testicular/hormonal parameters in adult rats. *Mol. Androl.*, 1995, 7 : 192-197.
- KAUR P., DANI H.M. : Carcinogenicity of nickel is the result of its binding to RNA and not to DNA. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2003, 22 : 29-39.
- LAI H.Y., LIU M.Y. : Concentration dependency in lead-inhibited steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2002, 65 : 557-567.
- LAMBARD S., CARREAU S. : Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *Int. J. Androl.*, 2005, 28 : 254-259.
- LEBOURG E. : Le bestiaire de la gérontologie expérimentale. *La Recherche*, 1999, 322 : 39-43.
- RAMOS C.F., SILVA A.M., COSTA W.S., SAMPAIO F.J.B. : Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. *Urol. Intern.*, 2006, 76 : 63-66.
- RAMOS C.F., TEIXEIRA C.V., PASSOS M.C.F. et al. : Low protein diet changes thyroid function in lactating rats. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 2000, 224 : 256-263.
- RAMOS C.F., LIM A.P.S., TEIXEIRA C.V., BRITO P.D., MOURA E.G. : Thyroid function in post-weaning rats, which dams were fed a low protein diet during suckling. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1997, 30 : 133-137.
- ROCHA M.P., GUEDES R.C.A. : Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1997, 30 : 663-669.
- SINAWAT S. : The environmental impact on male fertility. *J. Med. Ass. Thai.*, 2000, 83 : 880-885.
- SNOW E.T., COSTA M. : Nickel toxicity and carcinogenesis. In : Rom W.N. eds. *Environmental and occupational medicine*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1998 : 1057-1064.
- STOHS S.J., BAGGHI D., HASSOUN E., BAGCHI M. : Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2001, 20 : 77-88.

26. TAUPEAU C., POUPON J., NOME F., LEFEVRE B. : Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reprod. Toxicol.*, 2001, 15 : 385-391.
27. TAUPEAU C., POUPON J., TRETON D., BROSSE A., RICHARD Y., MACHELON V. : Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor beta in human ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 2003, 68 : 1982-1988.
28. TEIXEIRA C.V., SILANDRE D., MARCELLI A. et al. : Effects of maternal undernutrition during lactation on estrogen (a and b) and androgen receptors, and aromatase gene expressions in rat testis at weaning. *J. Endocrinol.*, 2007, 192 : 301-311.
29. THORENTON R. : Caloric restriction: can we extrapolate from animals to humans ? *Food Chem. Toxicol.*, 2002, 40 : 743-746.
30. TOPPARI J., LARSEN J.C, CHRISTIANSEN P. et al. : Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104: 741-803.
31. VYSKOSIL A., VIAU C., CISKOVA M. : Chronic nephrotoxicity of soluble nickel in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1994, 13 : 689-693.
32. WEINDRUCH R., SOHAL R.S. : Caloric intake and aging. *N. Engl. J. Med.*, 1997, 337 : 986-994.
33. WIEBE J.P., BARR K.J., BUCHINGHAM K.D. : Effects of prenatal and neonatal exposure to lead on gonadotropin receptors and steroidogenesis in rat ovaries. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1998, 24 : 461-476.
34. WONG W.Y, THOMAS C.M., MERKUS J.M., ZEILHUS G.A., STEEGERS R.P. : Male factor sub fertility : possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil. Steril.*, 2000, 73 : 435-442.
35. XIE J., SUNAKOSHI T., SHIMADA H., KOJIMA S. : Effects of chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel. *Toxicol.*, 1995, 103 : 147-155.
36. ZQWADE G.N., LEMPICKI R.L., PANICKER A.K., FRISBEE R.M., BLAUSTEIN J.D. : Leplin facilitates and inhibits sexual behavior in female hamsters. *Am. Physiol. Soc.*, 1997, 272 : 1354-1358.

**Remerciements :**

*N.H. a bénéficié d'une aide de l'AUF au cours de son stage dans le laboratoire, et les Dr S. LAMBARD et S. BOURGUIBA sont chaleureusement remerciés pour leur précieux conseils.*

---

*Manuscrit reçu : juillet 2007 ; accepté septembre 2007.*

**Impact of caloric and nickel restriction on testicular aromatase in the rat**

**Najla HFAIEDH, Mohamed Salah ALLAGUI,  
Françoise CROUTE,**

**Fadhel GEURMAZI, Abdelfettah EL FEKI,  
Serge CARREAU**

**This study was designed to determine whether intermittent fasting induces malnutrition that, according to many authors, accentuates the cytotoxic effects of environmental pollutants, or caloric restriction that reduces these effects.**

**Ninety six male Wistar rats (180g) were divided into two groups: one group was fed daily (N) and the other group was fed every second day (J) for one month. At the end of one month, each group was then divided into two subgroups, one subgroup received an injection of 0.9% NaCl (groups NO and JO), the other subgroup received an injection of 4 mg/kg NiCl<sub>2</sub> (groups NNi and JNi).**

**Intermittent fasting was continued in parallel to treatment for 1, 3, 5 and 10 days.**

**Under these experimental conditions, nickel increased testicular aromatase activity and altered total RNA, while no alteration of these biomarkers was observed with intermittent fasting.**

**The combination of these two factors, nickel and intermittent fasting, did not amplify these effects. In contrast, protection of RNA by intermittent fasting was observed, especially overexpression of aromatase mRNA.**

**Keywords:** *aromatase, caloric restriction, fertility, nickel, oxidative stress*