



Nickel et fertilité chez le rat

H. CHAKROUN* ; N. HFAIEDH* ;
F. MAKNI-AYADI** ;
F. GUERMAZI*** ;
A. KAMMOUN**** ; A. ELFEKI*

RÉSUMÉ : L'objectif de cette étude est de montrer l'impact du nickel sur le taux de la testostérone sérique et sur l'activité sexuelle du rat adulte. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur deux cents rats mâles et femelles adultes dont le poids corporel varie entre 110 et 130 g. Le chlorure de nickel est administré dans l'eau de boisson à deux concentrations différentes : 50 ppm (groupe N1) et 250 ppm (groupe N2), durant 5, 10, 15, 30, 60 ou 90 jours. Des rats recevant l'eau distillée sont utilisés comme témoins (T). L'exploration de la fonction sexuelle est faite par pesée des organes sexuels chez les deux sexes, par réalisation des frottis vaginaux chez les femelles, par dosage de la testostérone sérique et histologie testiculaire chez les mâles, et par des accouplements inter-groupes. La testostérone sérique est dosée par technique "Elisa" et par technique radio-immunologique.

Nos résultats montrent que les poids absolus et relatifs des organes sexuels, autres que l'utérus, ne changent pas d'une façon statistiquement significative chez les mâles et femelles traités par rapport aux témoins. Au contraire, l'utérus, des femelles traitées est hypertrophié (N1 et N2).

L'œstrus détecté par les frottis vaginaux est présent chez les femelles traitées dans les mêmes proportions que chez les témoins. Cependant, le taux de la testostérone sérique montre des variations plus importantes. Son taux baisse significativement au 10^e jour du traitement pour N2, et au 15^e jour pour N1. Cette baisse est suivie d'une augmentation compensatrice au 15^e jour du traitement pour N2 et au 30^e jour pour N1. Après ces dates, le taux de la testostérone retrouve celui des rats-témoins malgré la poursuite du traitement. L'augmentation compensatrice est d'origine éventuellement hypophysaire faisant intervenir le mécanisme de "feed back".

L'histologie testiculaire montre une atrophie des tubes séminifères et une atteinte de la spermatogenèse avec apparition de cellules apoptotiques au niveau de la paroi des tubes séminifères. L'accouplement entre mâles et femelles traités ou non durant 90 jours montre que le taux de gestation n'est fortement endommagé que dans le cas des femelles N2 chez lesquelles ce taux montre une baisse importante. Ceci est dû à une perturbation directe éventuellement, locale utérine, provoquée par le nickel.

En conclusion, l'exposition chronique orale au chlorure de nickel provoque chez le rat adulte une double perturbation sexuelle : la première est fonctionnelle, elle touche la fonction hormonale, mais elle est rapidement corrigée par l'intervention du système régulateur hormonal éventuellement par le mécanisme de "feed back" hypophysaire. La seconde est organique, elle est directe, locale, elle touche la spermatogenèse et, éventuellement, la paroi utérine, étant donné que le taux de gestation des femelles en question baisse, en dépit d'un cycle cestrien vaginal normal. Celle-ci ne peut être corrigée. Il semble que ces perturbations locales sont d'ordre apoptotique, provoquées par le nickel, ce qui confirme les effets cytotoxiques de ce métal classé parmi les stress oxydants.

MOTS-CLEFS :

- Apoptose
- Cytotoxicité
- Fertilité
- Nickel
- Rat
- Testostérone

De nombreuses études indiquent une diminution du nombre et de la qualité des cellules sexuelles mâles humaines au cours de ces dernières années (1). Il semble que les perturbations de l'appareil sexuel humain mâle se multiplient. La pollution de l'environnement est incriminée en grande partie dans cette infertilité faisant partie d'un problème posé : l'impact de l'environnement sur la santé (2). De nombreux auteurs ont signalé l'effet nocif sur la fonction sexuelle, de facteurs toxiques présents dans notre environnement. On peut citer le gaz d'échappement d'origine automobile (3,4); le tabac (5), les pesticides (1); les xénohormones (6); le cadmium (7,8); le mercure (9); le vanadium (10); le manganèse (11); le plomb (12); le nickel (13,14)...

Dans la nature, le nickel se trouve dans l'air, l'eau et les aliments pollués. Il provient des rejets industriels, des poissons contaminés par l'eau de mer, de la circulation urbaine, des végétaux qui se trouvent à proximité des sources d'émissions et des raffineries, du talc, du tabac... Les gens les plus contaminés sont les garagistes, les fumeurs et certains professionnels exposés (15). Il peut provoquer des dermatites chez certains sujets (16). Les particules de nickel sont connues comme cancérigènes chez de nombreux animaux; elles peuvent induire des transformations morphologiques des systèmes cellulaires, des aberrations chromosomiques (17). Les sels de nickel comme les particules de nickel peuvent être allergènes et cancérigènes chez l'homme en formant des radicaux oxygénés (18). Cette cytotoxicité est vérifiée chez certains microorganismes (19). L'effet mutagène et

cytotoxique des sels et des particules de nickel est bien vérifié (20).

Toutefois, les travaux concernant l'impact du nickel sur la fonction hormonale sexuelle et sur la fertilité sont très rares et non déductifs.

L'objectif de cette étude est d'apporter des éclaircissements à ces problèmes. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur le rat adulte.

Matériels et méthodes

■ Animaux

Nous avons utilisé 200 rats mâles et femelles de souche Wistar pubères de poids corporel compris entre 110 et 130 g. Ils sont regroupés par quatre dans une animalerie maintenue entre 22 °C et 24 °C, avec hygrométrie stable, et munie d'un système de ventilation et d'un système réglant les périodes d'obscurité (10 h) et de lumière (14 h). Les animaux ont accès *ad libitum* à la nourriture (bouchons à 14 % de protéines, SICO, Sfax, Tunisie), et à l'eau.

■ Protocole expérimental

Les animaux sont répartis par chaque sexe, en trois groupes. L'un, servant de témoin (T), reçoit de l'eau distillée comme eau de boisson. Les deux autres, servant de "traités", reçoivent du chlorure de nickel dans leur eau de boisson à raison de 50 ppm (groupe N1), ou de 250 ppm (groupe N2). Ce traitement est poursuivi pour tous les groupes durant 5, 10, 15, 30, 60 ou 90 jours.

Les animaux témoins et traités sont pesés chaque matin.

■ Prélèvement des échantillons

Le sacrifice des animaux a lieu toujours le matin par décapitation pour éviter l'effet du stress. Le sang de la plaie est récupéré, placé à froid, puis centrifugé. Le sérum est stocké à -20 °C. Il servira pour le dosage de la testostérone sérique. Le corps de l'animal est pesé puis ouvert. Le testicule et l'épididyme droits, les vésicules séminales, la prostate, l'ovaire droit et l'utérus sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux s'il y

en a puis pesés. Les stades du cycle sexuel sont déterminés par frottis vaginaux chez les femelles.

Les cornes utérines des rattes traitées durant 90 jours, puis soumises aux mâles, sont disséquées 15 jours après l'accouplement, pour rechercher une éventuelle gestation, et dans le cas où celle-ci est positive, le nombre d'implantations est déterminé.

■ Dosage de la testostérone sérique

Deux techniques de dosage sont utilisées, la technique immuno-enzymatique ELISA, et la technique radio-immunologique RIA. Les deux techniques ont donné presque les mêmes résultats, sauf que la première n'est pas sensible pour les valeurs trop faibles du taux de la testostérone, ce qui nous a obligé à utiliser la deuxième technique. Celle-ci est très efficace essentiellement lorsque le taux de la testostérone baisse et devient difficilement détectable.

La technique ELISA est basée sur le principe de la compétition. L'antigène à doser (testostérone de l'échantillon) et l'antigène marqué par un enzyme (testostérone marquée à la POD) sont ajoutés simultanément à une quantité donnée d'anticorps (antitestostérone marquée à la biotine) fixée à la streptavidine, elle-même, préalablement fixée à la paroi interne des tubes. Après homogénéisation et incubation, la fraction libre est séparée par lavage. La fraction liée fixée donc à la paroi des tubes est colorée par un substrat chromogène, puis mesurée par un lecteur photométrique. La quantité de la fraction liée est inversement proportionnelle à la concentration de la fraction non marquée libre ajoutée, c'est-à-dire la testostérone de l'échantillon à doser. La détermination de cette concentration est faite en se référant à une courbe d'étalonnage préparée parallèlement avec des solutions connues de testostérone.

La technique RIA est basée aussi sur le principe de la compétition. La testostérone est marquée à l'iode 125. L'anticorps est préalablement fixé à la paroi des tubes. La testostérone à doser (échantillon ou standard) et la testostérone marquée (traceur) sont ajoutées simultanément aux tubes

renfermant les anticorps. Après homogénéisation et incubation, la fraction libre est séparée par aspiration. La fraction liée attachée à la paroi des tubes est mesurée à l'aide d'un compteur gamma relié à un ordinateur. Elle est inversement proportionnelle aux taux de la testostérone ajoutée (échantillon ou standard). La concentration en testostérone de l'échantillon est donnée directement en ng/ml.

■ Étude histologique des testicules

Nous avons suivi les étapes classiques de l'histologie. Pour la coloration, nous avons utilisé la technique à l'hématoxyline-éosine (HE), comportant un bain de 5 min d'hématoxyline (Merck) qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux), un bain de HCl 1 % pour différencier les coupes et obtenir une coloration rose, un bain de 3 min de carbonate de lithium pour colorer en bleu les coupes, un bain de 5 min d'éosine qui colore les structures acidophiles (cytoplasmes). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

■ Mise en évidence du phénomène

d'apoptose au niveau des testicules

L'un des premiers signes d'apoptose est la condensation de la chromatine. Le bleu de toluidine boraté (bleu de toluidine 1 %, tétraborate de sodium 1 %) permet de mettre en évidence cette condensation. Pour cela, la solution colorée est diluée au 1/10^e dans l'alcool à 70 °C, puis elle est déposée sur les coupes placées sur platine chauffante, pendant 45 à 60 secondes. Après rinçage à l'eau distillée, les coupes sont déshydratées puis montées. Les cellules apoptotiques montrent des noyaux denses de couleur bleu foncée. Au contraire, les cellules normales montrent des noyaux lâches avec filaments de chromatine et des nucléoles bien visibles.

■ Exploitation statistique des résultats

Elle est effectuée à l'aide du test "T" de Student-Fisher. $P \leq 0.05$ est considéré comme significatif. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM, avec signalisation si la différence avec les témoins est significative ou non.

Tableau I : Incidence d'une exposition orale durant 3 mois au nickel

		T		N1		N2	
		PA	PR	PA	PR	PA	PR
Mâle	PC.	242 ± 13,08		247,25 ± 10,514		244,25 ± 17,627	
	Testicule	1,185 ± 0,066	0,490 ± 0,013	1,198 ± 0,071	0,485 ± 0,023	1,138 ± 0,048	0,469 ± 0,017
	Épididyme	0,459 ± 0,036	0,190 ± 0,011	0,464 ± 0,016	0,188 ± 0,003	0,466 ± 0,010	0,193 ± 0,010
	Vésicules séminales	0,843 ± 0,061	0,349 ± 0,019	0,923 ± 0,067	0,364 ± 0,009	1,031 ± 0,079	0,423 ± 0,020
	Prostate	0,379 ± 0,049	0,159 ± 0,025	0,426 ± 0,041	0,172 ± 0,013	0,449 ± 0,045	0,183 ± 0,007
Femelle	PC.	159 ± 4,086		159,6 ± 4,377		152,8 ± 10,556	
	Ovaire	0,024 ± 0,001	0,015 ± 0,0007	0,029 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,025 ± 0,002	0,016 ± 0,0005
	Utérus	0,257 ± 0,023	0,162 ± 0,015	0,365 ± 0,059*	0,229 ± 0,035*	0,375 ± 0,085*	0,237 ± 0,034*

(50 ppm : N1 et 250 ppm : N2) sur l'évolution du poids corporel (PC) et des poids absolus (PA) en g et relatifs (PR) en g/100g de PC, des organes sexuels chez le rat mâle et femelle.
 *Différence significative par rapport aux témoins (T), (P < 0,05).
 **Différence hautement significative par rapport aux témoins (T), (P < 0,01).

Résultats

■ Poids relatifs des organes sexuels

Nos résultats montrent que les poids absolus et relatifs du testicule, de l'épididyme, de la prostate, des vésicules séminales chez les mâles, de l'ovaire chez les femelles, ne changent pas d'une façon statistiquement significative chez les traités durant 90 j par rapport aux témoins. Toutefois, ceux de l'utérus montrent une augmentation statistiquement significative chez les femelles recevant le nickel durant 90 jours (Tableau I).

■ Frottis vaginaux

Ces frottis montrent que l'œstrus est

présent chez les femelles traitées aux mêmes proportions que chez les témoins (Tableau II).

■ Variation du taux de la testostérone sérique

La figure 1 montre une variation importante du taux de la testostérone sérique chez les rats traités par rapport aux contrôles. Ce taux baisse d'une façon statistiquement significative au 10^e jour du traitement pour le groupe N2 et au 15^e du traitement pour le groupe N1. On constate ensuite que le taux de la testostérone sérique remonte beaucoup au 15^e jour du traitement pour N2 et au 30^e jour pour N1. Il s'agit d'une aug-

Tableau II : Incidence du nickel administré par voie orale d'une façon chronique durant 5, 10, 15, 30, 60 et 90 jours, sur le pourcentage de l'apparition de l'œstrus mis en évidence par frottis vaginal chez la rate

	T	N1	N2
5 jours	50	45	40
10 jours	40	40	20
15 jours	100	80	20
30 jours	60	0	60
60 jours	40	40	20
90 jours	100	100	100

mentation compensatrice d'origine éventuellement hypophysaire.

Après ces dates, le taux de la testostérone retrouve celui des rats

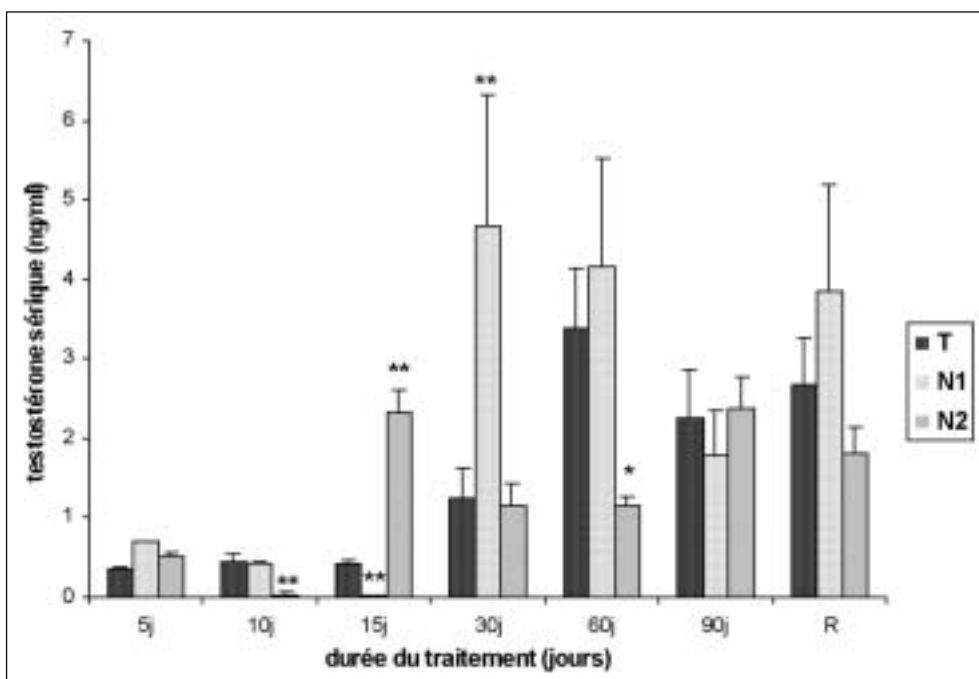


Figure 1 : Évolution du taux de la testostérone sérique (ng/ml) chez des rats mâles recevant une eau de boisson enrichie en chlorure de nickel (N1 : 50 ppm, N2 : 250 ppm) durant 5, 10, 15, 30, 60 et 90 jours, Comparaison avec des rats témoins (T) recevant l'eau distillée.
 R = récupération : 2 mois après arrêt du traitement au nickel.
 *Différence significative par rapport aux témoins (T), (P < 0,05).
 **Différence hautement significative par rapport aux témoins (T), (P < 0,01).

Tableau III : Évolution du taux de la testostérone sérique (ng/ml) chez des rats mâles recevant une eau de boisson enrichie en chlorure de nickel (N1 : 50 ppm, N2 : 250 ppm) durant 5, 10, 15, 30, 60 et 90 jours. Comparaison avec des rats témoins (T) recevant l'eau distillée

	5 j	10 j	15 j	30 j	60 j	90 j	R
T	0,348 ± 0,023	0,450 ± 0,098	0,427 ± 0,054	1,237 ± 0,381	3,389 ± 0,748	2,256 ± 0,621	2,679 ± 0,589
N1	0,698 ± 0,014	0,428 ± 0,020	0,012 ± 0,001**	4,663 ± 1,654**	4,156 ± 1,366	1,798 ± 0,571	3,841 ± 1,342
N2	0,517 ± 0,051	0,033 ± 0,003**	2,324 ± 0,289**	1,141 ± 0,303	1,141 ± 0,129*	2,382 ± 0,395	1,811 ± 0,336

R = récupération : 2 mois après arrêt du traitement au nickel.
 *Différence significative par rapport aux témoins (T), (P < 0,05).
 **Différence hautement significative par rapport aux témoins (T), (P < 0,01).

témoins malgré la poursuite de l'administration orale du nickel (Tableau III).

■ Histologie du testicule

D'après la figure T de la Planche I, l'histologie du testicule témoin montre des tubes séminifères serrés avec des espaces interstitiels faibles. On peut observer facilement les différents stades de la spermatogenèse qui se déroulent d'une façon centripète au niveau de la paroi des tubes. Les spermatogonies de petite taille sont situées à proximité de la membrane basale. Les spermatoocytes I et II de plus grande taille sont à noyaux volumineux et parfois en phase de division. Les spermatoïdes plus petits sont situés vers l'intérieur des tubes. Les spermatozoïdes mûrs remplissent presque la totalité de la lumière des tubes par leurs flagelles. Chez les rats traités au nickel, ces différents stades sont touchés. Parmi les perturbations signalées : spermatozoïdes non mûrs avec absence de flagelles, absence totale des spermatozoïdes et destruction de la paroi du tube séminifère avec présence de travées

vides entre les cellules germinales (figure N1 de la planche I).

■ Mise en évidence du phénomène d'apoptose

Après traitement au nickel, les coupes testiculaires montrent des cellules apoptotiques avec des noyaux denses vers la lumière des tubes séminifères (planche II).

En effet, la condensation de la chromatine est l'un des premiers signes de la mort cellulaire. L'effet cytotoxique du nickel semble donc s'exercer par un phénomène d'apoptose qui touche les derniers stades de la spermatogenèse.

■ Taux de gestation

Les résultats du tableau IV, figure 2, montrent qu'à la suite des croisements inter-groupes, le taux de gestation est fortement abaissé dans le cas des femelles N2 comparées aux rates témoins.

Chez les femelles témoins accouplées avec des mâles N1 ou N2, le taux de gestation est faiblement touché. Le nombre moyen d'implantations montre aussi une baisse importante chez les femelles (N2).

Discussion

La physiologie de la fertilité chez les mammifères est très sensible aux perturbations de l'organisme par des agents exogènes (1). Plusieurs composés exogènes incluant les pesticides, les drogues, les solvants organiques, le tabac, les xénohormones, les métaux lourds tels que le plomb, le nickel, le cadmium, le vanadium... bien que les mécanismes biochimiques de leur toxicité ne soient encore bien compris, ils sont considérés comme de véritables agents toxiques, touchant la fertilité (1,3-14). Dans nos conditions expérimentales, nous remarquons une diminution

Figure 2 : Impact du nickel administré durant 90 j dans l'eau de boisson (N1 = 50 ppm, N2 = 250 ppm) sur le pourcentage du taux de gestation et le nombre moyen d'implantations par portée, détectés par des croisements intergroupes entre mâles (m) et femelles (f).

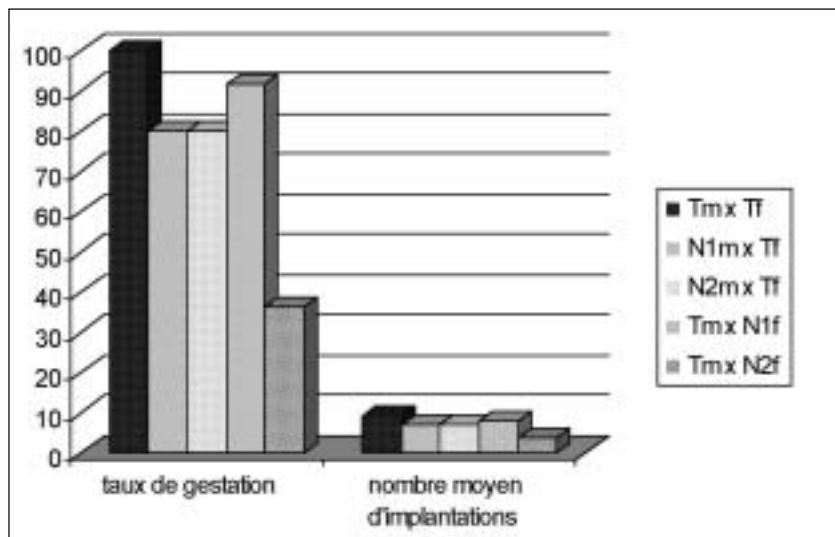


Tableau IV : Impact du nickel administré durant 90 jours dans l'eau de boisson (N1 = 50 ppm, N2 = 250 ppm) sur le pourcentage du taux de gestation et le nombre moyen d'implantations par portée, détectés par des croisements intergroupes.

Mâles x femelles	Pourcentage du taux de gestation	Nombre moyen d'implantations par portée
T x T	100	9
N1 x T	80	7
N2 x T	80	6,8
T x N1	91,66	7,83
T x N2	36,36	3,54

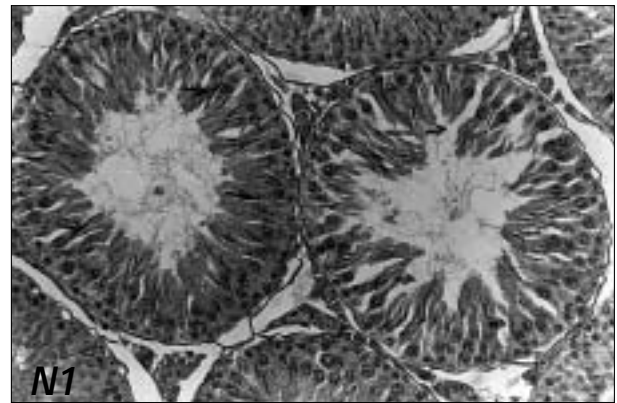
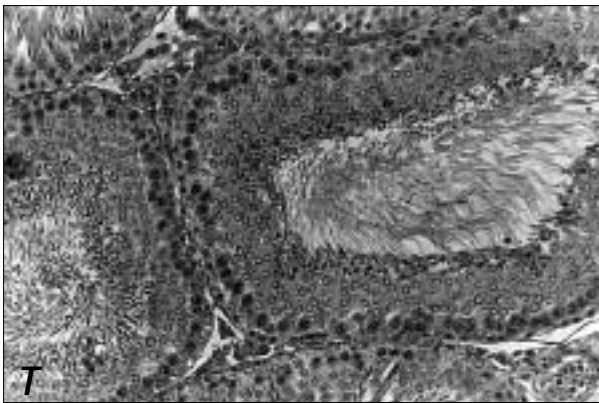


Planche I : Structure histologique des testicules de rats témoins (T) et traités par le chlorure de nickel (N1) durant 15 j, montrant différents types d'altérations.
 - Blocage de la spermiogenèse.
 - Travées et destruction des cellules de Sertoli.
 Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : x 200

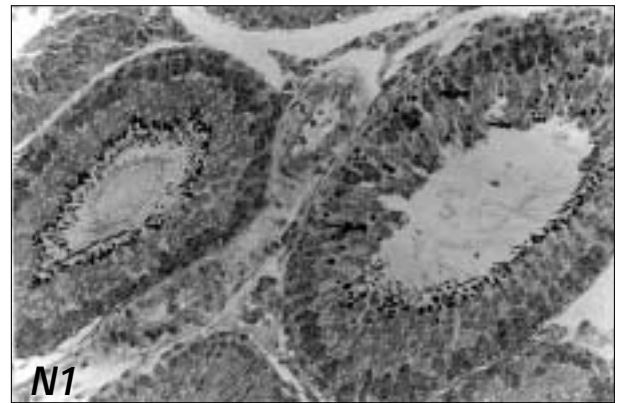
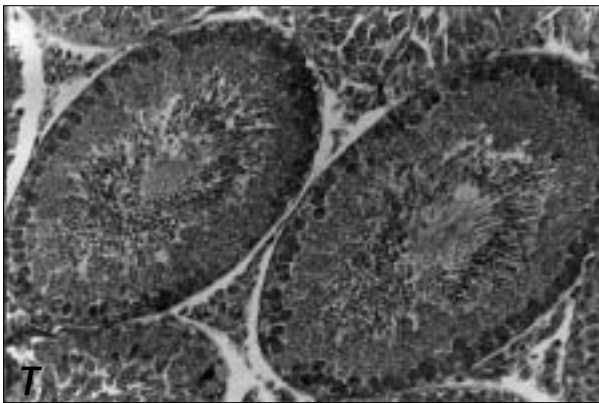


Planche II : Mise en évidence histologique de cellules apoptotiques au niveau des testicules de rats témoins (T) et traités au chlorure de nickel (N1) durant 60 j.
 - Condensation de la chromatine, indice d'apoptose.
 Coloration : bleu de toluidine boraté. Gr : x 200

statistiquement significative du taux de la testostérone sérique au 10^e jour de l'exposition orale au nickel pour les rats N2 et au 15^e jour pour les rats N1. Donc la baisse du taux de cette hormone sexuelle est d'autant plus rapide que la dose est importante (N2 > N1). Il semble donc que l'intoxication au nickel induit une défaillance hormonale sexuelle. Toutefois, si l'exposition au nickel se poursuit, nos résultats montrent que cette défaillance est rapidement corrigée. Le taux de testostérone augmente beaucoup (au 15^e j pour N2 et au 30^e pour N1) puis baisse pour retrouver celui des témoins, malgré la poursuite du traitement au nickel. Xie et al. (14) en 1995 ont signalé aussi une défaillance testiculaire causée par le nickel mais pour une exposition aiguë. L'adaptation hormonale

au traitement chronique au nickel pourrait être expliquée, ou bien par l'intervention du mécanisme de "feed back" hypophysaire par augmentation compensatrice des gonadostimulines (FSH, LH), ou bien par l'intervention d'un système endogène de protection, éventuellement par les protéines de stress : les métallothionéines par exemple. Il serait donc intéressant d'approfondir cette étude en s'intéressant de près aux FSH et LH hypophysaires et circulantes, et aux métallothionéines endogènes. L'histologie testiculaire montre une atrophie des tubes séminifères avec atteinte de la spermatogenèse et apparition de celles apoptotiques au niveau des testicules des rats soumis au nickel. Ceci indique que le nickel est cytotoxique. En effet, de nombreuses études ont montré que le nic-

kel peut induire des dommages oxydatifs au DNA et que le magnésium peut protéger l'organisme contre ces perturbations (21). Le nickel phagocyté par la cellule augmente l'activité des radicaux oxygénés, catalyse la transformation du DNA et peut causer un cancer, l'intervention des anti-oxydants endogènes et exogènes arrête ces réactions (18,20, 22-24). La vitamine E baisse les effets cytotoxiques du nickel, du vanadium et du mercure (25). Le nickel peut endommager chez l'homme, l'épithélium rénal, à travers ses effets génotoxiques oxydatifs, les anti-oxydants peuvent protéger contre ces effets (26). Le nickel, avec le cadmium et le chlore, sont considérés donc comme des stress oxydatifs (27). L'organisme peut se défendre et s'adapter à ces stress par ses anti-

oxydants endogènes et ses protéines de stress telles que les métallothionéines rencontrées chez l'homme et chez de nombreux animaux (28). Elles jouent probablement un rôle de désintoxication et de protection des cellules contre les effets de certains produits chimiques et radicaux oxygénés (29).

En ce qui concerne les poids relatifs des organes sexuels autres que l'utérus, nos résultats ne montrent pas une variation significative chez les rats traités au nickel durant 90 j par rapport aux témoins. Ceci peut être expliqué par l'adaptation hormonale déjà signalée.

Cependant, concernant les accouplements intergroupes, nos résultats montrent que le taux de gestation et le nombre moyen d'implantations sont endommagés dans le cas des femelles N2, traités durant 90 j. Il s'agit probablement d'une défaillance d'origine utérine, étant donné que les cycles sexuels hormonaux et ovariens sont normaux d'après les frottis vaginaux réalisés chez ces femelles. Il semble donc que le nickel est cytotoxique au niveau de l'utérus, avec absence d'une adaptation. La défaillance sexuelle induite par le nickel dans nos conditions expérimentales semble être due à une action cytotoxique directe sur les testicules et l'utérus, faisant intervenir un mécanisme apoptotique. En effet, de nombreux polluants sont considérés comme étant des stress oxydatifs et leurs effets cytotoxiques et génotoxiques semblent s'exercer par le processus de l'apoptose (30-37). Cet effet cytotoxique du nickel est signalé par de nombreux auteurs sur d'autres tissus tels que l'épithélium rénal (26).

Conclusion

Nos résultats montrent que le nickel administré d'une façon chronique par voie orale chez le rat provoque des perturbations sexuelles de deux types : des perturbations fonctionnelles hormonales de caractère "dose-dépendant", elles sont rapidement corrigées. Des perturbations organiques directes locales caractérisées par une atteinte de la sperma-

togénèse, une apparition de cellules apoptotiques au niveau de la paroi des tubes séminifères et une baisse du taux de la gestation chez les femelles traitées malgré la présence d'un cycle œstrien vaginal normal. Ces résultats confirment les effets cytotoxiques du nickel classé parmi les stress oxydants.

RÉFÉRENCES

- 1- JEGOU B. (juin 1996) *Les hommes deviennent-ils moins fertiles ? Moins de spermatozoïdes et de qualité moindre ? L'environnement en question*. La Recherche, 288 : 60-65.
- 2- BUJAN L. (1998) *Environnement et spermatogénèse*. Contracept. Fertil. Sex. 26 (1) : 39-48.
- 3a- EL FEKI A., SAKLY M., KAMMOUN A. (1984) *Incidence du gaz d'échappement sur l'activité corticosurrénaline, la croissance générale et la variation de certains métabolismes intermédiaires chez le rat mâle en période de croissance*. Arch. Intern. Physiol. Bioch. Belgique, 92 : 167-77.
- 3b- EL FEKI A., SAKLY M., KAMMOUN A. (1985) *Incidence de différentes agressions aiguës et chroniques sur la croissance générale et l'activité corticosurrénaline chez le rat*. Ann. Endocrin. Paris, 46 : 107-12.
- 3c- EL FEKI A., HJAIEJ L., KAMMOUN A. (1996) *Incidence de la pollution atmosphérique (gaz d'échappement) sur l'activité sexuelle du rat*. 9^{es} Journées Biologiques de la SSNT, Tunis : 48.
- 3d- EL FEKI A., GHORBEL F., SMAOUI M., MAKNI-AYADI F. KAMMOUN A. (2000) *Effets du plomb d'origine automobile sur la croissance générale et l'activité sexuelle du rat*. Gynécol. Obstet. Fertil. Paris, 28 : 51-9.
- 4- SMAOUI M., REBAÏ T., EL FEKI A. (1997) *Incidence en fonction du temps des émissions d'origine automobile sur la croissance générale, la fertilité et la variation de certains paramètres biochimiques chez le rat*. 8^e Congrès Arabe de Biologie, Amman, Jordanie : 134-35.
- 5- TUORMAA T.E. (1995) *The adverse effects of tobacco smoking on reproduction and health : a review from the literature*. Nurth Health, 10 (2) : 105-20.
- 6- TOPPARI J., LARSEN J.C., CHRIS-

- TIANSEN P., GIWERCMAN A., GRANDJEAN P. GUILLETTE L.J. (1996) *Male reproductive health and environmental xeno-oestrogens*. Environ. Health Perspect. 104 (suppl. 4) : 741-803.
- 7- BENOFF S., HURLEY I.R., BARCIA M., MANDEL F.S., COOPER G.W. HERSHLAG A. (1997) *A potential role for cadmium in the etiology of varicocele associated infertility*. Fertil. Steril. 67 (2) : 336-47.
8. ONO H., FUN AKOSHI T., SHIMADA H. KOJIMA S. (March 1997) *Comparative effects of disulfiram and diethyl dithiocarbamate against testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium*. J. Toxicol. Environm. Health 50 (4) : 389-99.
- 9- GERHARD I. RUNNEBAUM B. (1992) *Environmental pollutants and fertility disorders. Heavy metals and minerals*. Geburtshilfe Frauenheinkd., 52 (7) : 383-96.
- 10- DOMINGO J.L. (May-June 1996) *Vanadium : a review of the reproductive and developmental toxicity*. Rep. Toxicol. 10 (3) : 175-82.
- 11- GENNART J.P., BUCHET J.P., ROELS H., GHYSELEN P., CEULEMANS E., LAUWERYS R. (1992) *Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese*. Am. J. Epidemiol. 135 (11) : 1208-19.
- 12- FOSTER W.G., McMAHON A., RICE D.C. (Sept.-Oct. 1996) *Sperm Chromatin structure is altered in cynomolgus monkeys with environmentally relevant blood levels*. Toxicol. and health, 12 (5) : 723-35, (Sept.-Oct. 1996).
13. SMITH M.K., GEORGE E.L., STOBER J.A., FENG H.A., KIMMEL G.L. (1993) *Perinatal toxicity associated with nickel chloride exposure*. Environ. Res. 61 (2) : 200-11.
14. XIE J. (1995) *Effects of chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel*. Toxicology, 103 (3) : 147-55.
- 15- SIVERSTEN T.S., TCHACHTCHINE V., LUND E., BUKOV V., THOMASSEN Y., NORSETH T. (1998) *Urinary nickel in populations living in the proximity of two Russian nickel refineries : A Norwegian-Russian population based-study*. Environ. Health. Perspect. 106 (8) : 503-11.
16. ACCOMINOTTI M., BOST M.,

- HAUDRECHY P., MAUTOUT B., CUNAT P.J., COMET F. (1998) *Contribution to chromium and nickel enrichment during cooking of foods in stainless steel utensils*. Contact. Dermatit. 38 (6) : 305-10.
- 17- LIN X., COSTA M. (1994) *Transformation of human osteoblasts to anchorage-independent growth by insoluble nickel particles*. Environ. Health. Perspect. 102 (suppl. 3) : 289-92.
- 18- HUANG X., THUANG Z., FRENKL K., KLEIN C.B., COSTER M. (1994) *The role of nickel and nickel-mediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis*. Environ. Health. Perspect. 102 (suppl. 3) : 281-84.
- 19- WU L.F., NAVARRO C., DE PINA K., QUENARD M., MANDRAND M.A. (1994) *Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of Escherichia coli K-12 and comparison of nickel and cobalt toxicity of the aerobic and anaerobic growth*. Environ. Health. Perspect. 102 (suppl. 3) : 297-300.
- 20- FLETCHER G. G., ROSSETTO F.E., TURNBULL J.D., NIEBOER E. (1994) *Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds*. Environ. Health. Perspect. 102 (suppl. 3) : 69-79.
- 21- HONG Y.C., PAIK S. R., LEE H.J., LEE K.H., JANG S.M. (1997) *Magnesium inhibits nickel-induced genotoxicity and formation of reactive oxygen*. Environ. Health Perspect. 105 (7) : 744-48.
- 22- COSTA M., SALNIKOUR K., COSENTINO S., KLEIN C.B., HUANG X., ZHUANG Z. (1994) *Molecular mechanism of nickel carcinogenesis*. Environm. Health Perspect. 102 (3) : 127-30.
- 23- SHI X., DALAL N. KASPRZAK K.S. (1994) *Enhanced generation of hydroxyl radical and sulfur trioxide anion radical from oxidation of sodium sulfite, nickel (II) sulfite, and nickel subsulfide in the presence of nickel (II) complexes*. Environ. Health. Perspect. 102 (3) : 91-6.
- 24- LANDOLPH J.R. (1994) *Molecular mechanisms of transformation of C3H/10T 1/2 Cl mouse embryo cells and diploid human fibroblasts by carcinogenic metal compounds*. Environ. Health. Perspect. 102 (3) : 119-25.
- 25- KLEIN C. B., KARGACIN B., SU S., COSENTINO S., SNOUR E.T., COSTA M. (1994) *Metal mutagenesis in transgenic Chinese Hamster cell lines*. Environ. Health. Perspect. 102 (3) : 63-7.
- 26- HAUGEN A., MOEHLE L., MOLLERUP S., RIVEDAL E., RYBERG D. (1994) *Nickel induced alterations in human renal epithelial cells*. Environ. Health. Perspect. 102 (3) : 117-18.
- 27- FRENKEL K., KARKOZSKA J., COHEN B., BARNASKI B., JAKUBOUSKI M., COSMA G., TAIOLI E., TONIOLO P. (1994) *Occupational exposures to Cd, Ni, and Cr modulate titers of antioxidant DNA base autoantibodies*. Environ. Health. Perspect. 102 (3) : 221-25.
- 28- KÄGI J.H.R. (1993) *Evolution structure and chemical activity of class I metallothioneins : an overview in : metallothionein III, Biological roles and medical implications*. Suzuki K.T., Imura N., Kimura M. eds. Berlin, Birkhauser Verlag : 29-56.
- 29- CHERIAN M.G., HOWELL S.B. IMURA N., KLAASSEN C.D., KOROPATNICK J., LAZO J.S., WAALKES M.P. (1994) *Role of metallothionein in carcinogenesis*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 126 : 1-5.
- 30- JOULIN V. (1999) *Importance des mécanismes d'apoptose dans la toxicité hépatique de certains polluants*. Deuxième Colloque Sciences et Environnement, SSNT, Bizerte, CP3 : 3.
- 31a- TEBOURBI O., BEN RHOUMA K., SAKLY M. (1999) *Caractérisation de l'apoptose induite par le DDT, rôle du stress oxydatif*. Deuxième Colloque Sciences et Environnement, SSNT, Bizerte, C6 : 19.
- 31b- HECHMI HALLEGUE D., BEN RHOUMA K. SAKLY M. (1999) *Rôle de l'apoptose et du stress oxydatif dans la cytotoxicité de la dieldrine*. Deuxième Colloque Sciences et Environnement, SSNT, Bizerte, C41 : 56.
- 31c- CHAMKHIA N., BEN RHOUMA K., SAKLY M. (1999) *Quelques aspects de la toxicité du styrene chez le rat*. Deuxième Colloque Sciences et Environnement, SSNT, Bizerte, C42 : 57.
- 31d- TEBOURBI O., BEN RHOUMA K., SAKLY M. (1999) *Effet du DDT sur le système reproducteur mâle. Mise en évidence d'une action apoptotique*. Deuxième Colloque Sciences et Environnement, SSNT, Bizerte, C43 : 58.
- 32- KODAIRA K., TAKAHACHI R., HIRA BAYACHI M., SUZUKI T., OBINATA M. UEDA M. (1996) *Over expression of C-myc induces apoptosis at the prophase of meiosis of rat primary spermatocytes*. Mol. Reprod. Dev. 45 (4) : 403-10.
- 33- SUZUKI M., ABE K., YOCHINAGA K., OBINATA M., FURUZAWA M., ABE K. (1996) *Specific arrest of spermatogenesis caused by apoptotic cell death in transgenic mice*. Genes. cells, 1 (12) : 1077-86.
- 34- CAI L., HALES B.F., ROBAIRE B. (1997) *Introduction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide*. Biol. Reprod. 56 (6) : 1490-97.
- 35- INABA Y., FUJISAWA M. OKADA H., ARAKAWA S. & KAMIDONO S. (1998) *The apoptotic changes of testicular germ cells in the obstructive azoospermia models of prepubertal and adult rats*. J. Urol. 160 (2) : 540-44.
- 36- BLANCO-RODRIGUEZ J., MARTINEZ-GARCIA C. (1998) *Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis*. J. Androl. 19 (4) : 487-97.
- 37- EL-GOHARY M., AWARA W.M., NASSAR S., HAWAS S. (1999) *Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats : the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor*. Toxicology, 132 (1) : 1-8.

H. Chakroun*; **N. Hfaiedh***;
F. Makni-Ayadi**; **F. Guermazi*****;
A. Kammoun****; **A. Elfeki***

*Laboratoire d'Écophysiologie Animale, Faculté des Sciences de Sfax.

**Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine de Sfax.

***Laboratoire de Biophysique, Faculté de Médecine de Sfax.

Laboratoire de Médecine nucléaire, CHU Bourguiba, Sfax.

****Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences de Tunis.



H. CHAKROUN*; N. HFAIEDH*;
F. MAKNI-AYADI**;
F. GUERMAZI***;
A. KAMMOUN****; A. ELFEKI*

SUMMARY : The object of this study is to explore the impact of chronic exposures to nickel on the reproductive functions in pubescent rats.

Two hundred male and female rats (B.W. 110-130 g) were fed on concentrated tablets (SICO-SFAX). The drink water was controlled. Some rats received distilled water (T), the other ones received distilled water rich of Ni Cl₂ with two concentrations : 50 ppm (N1) and 250 ppm (N2). This treatment lasted 5, 10, 15, 30, 60 or 90 days depending on the groups.

Our results suggested that the absolute and relative weights of sexual organs remain unchanged. The percentage of the oestrus apparition detected by vaginal smear in female rats did not seem to be affected by the nickel treatment. However, a decrease of testosterone serum level was detected from the 10th day in (N2) and from the 15th day in (N1). This decrease was compensated by an important increase in the 15th day (N2) and in the 30th day (N1). Beyond 30 days, the testosterone level returned to the same values as controls, although the exposure continued. Exposed males/females were bred with control females/males, and the fecundity was assessed at G 15 by counting the number of implantations. These numbers seemed to be highly reduced in females (N2) compared to females (C).

Our study tried to show that chronic exposure to nickel may cause a double sexual disorder. The first would be functional affecting the hormonal function while the second would be organic affecting the uterus inside and reducing the rate of pregnancies. Whereas the first was rapidly corrected, the second seemed to persist.

KEY WORDS :

- Fertility
- Nickel
- Rat
- Testosterone

Nickel and fertility in the rat

Several studies have indicated a reduction of the number and the quality of human male sexual cells during these last years (Jegou, 1996). This disruption of the human male sexual device was reported to be due to the pollution of the environment. This supports the hypothesis of impact of the environment on health (Bujan, 1998). Many studies have shown the harmful effect of poisonous factors present in our environment on the reproductive function. Indeed, automotive exhaust gas (El Feki et al. 1984, 1985, 1996; Smaoui, 1997), tobacco (Tuorma, 1995), pesticides (Jegou, 1996), xéno-hormones (Toppari et al. 1996), cadmium (Benoff et al. 1997; Ono et al. 1997), mercury (Gerhard & Runnebaum 1992), vanadium (Domingo 1996), manganese (Gennart et al. 1992), lead (Foster et al. 1996), and nickel (Smith et al. 1993; Xie 1995) have been reported as susceptible agents.

In nature, nickel is present in air, water and polluted foods. It comes from the industrial wastes, from fish caught in contaminated sea waters, from heavy road traffic, from plants that are close to sources of emissions and refineries, from tobacco... The most affected people are mechanics, smokers and some exposed professionals (Sivertsen et al 1998). Numerous authors have studied the impact of nickel on health. It can cause dermatitis to certain persons (Accominoti et al. 1998). Particles of nickel are known like carcinogens in various animals. They may cause some morphological transformations in numerous cellular systems and chromosomal aberrations (Lin & Costa, 1994). The salts of nickel as particles of nickel can be allergens and carcinogens in man while forming the oxygenated radicals (Huang et al. 1994). This cytotoxicity was investigated in numerous micro-organisms (Wu et al. 1994). Mutagenous and

cytotoxic effects of salts and particles of nickel were studied (Fletcher et al. 1994).

However, works concerning the impact of nickel on fertility are very rare or non deductive.

The purpose of this survey is to shed some light on the possible roles played by this cytotoxic metal on the reproductive function.

Materials and methods

■ Animals

200 pubescent male and female Wistar rats of bodily weight between 110 and 130 g were used. They were regrouped by four in an animal house maintained at 22 °C to 24 °C with steady hygrometry and equipped with a system of ventilation and a system adjusting periods of obscurity (10h) and of light (14h). Animals had access ad libitum to food (concentrated to 14 % of proteins, SICO, Sfax, Tunisia), and to water.

■ Experimental protocols

Animals were distributed in three groups of both sexes. One, control group (C) received distilled water as drink water. The two other ones, received the chloride of nickel (Sigma) in their drink water at the rate of 50 ppm (group N1) and 250 ppm (group N2). This treatment was administered for all groups during 5, 10, 15, 30, 60 or 90 days.

The control subjects and the treated ones were weighed every morning.

■ Taking of samples

The slaughter of animals always took place in the morning by decapitation to avoid the effect of stress. The blood was recovered, cooled, and then centrifuged. The serum was stored at -20 °C. It served for the testosterone determination. The body of the animal was weighed then opened. The left

Table I : Impact of orally exposition to nickel during 3 months

		C		N1		N2	
		AW	RW	AW	RW	AW	RW
Male	B.W.	242 ± 13,08		247,25 ± 10,514		244,25 ± 17,627	
	Testicle	1,185 ± 0,066	0,490 ± 0,013	1,198 ± 0,071	0,485 ± 0,023	1,138 ± 0,048	0,469 ± 0,017
	Epididyme	0,459 ± 0,036	0,190 ± 0,011	0,464 ± 0,016	0,188 ± 0,003	0,466 ± 0,010	0,193 ± 0,010
	Seminal vesicles	0,843 ± 0,061	0,349 ± 0,019	0,923 ± 0,067	0,364 ± 0,009	1,031 ± 0,079	0,423 ± 0,020
	Prostate	0,379 ± 0,049	0,159 ± 0,025	0,426 ± 0,041	0,172 ± 0,013	0,449 ± 0,045	0,183 ± 0,007
Female	B.W.	159 ± 4,086		159,6 ± 4,377		152,8 ± 10,556	
	Ovary	0,024 ± 0,001	0,015 ± 0,0007	0,029 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,025 ± 0,002	0,016 ± 0,0005
	Uterus	0,257 ± 0,023	0,162 ± 0,015	0,365 ± 0,059*	0,229 ± 0,035*	0,375 ± 0,085*	0,237 ± 0,034*

(50 ppm : N1 and 250 ppm : N2) on the body weight (BW) (g), absolute (AW) (g) and relative (RW) (g/100g BW) weights of sexual organs in the rat.
*p < 0.05, **p < 0.01 compared with controls (C).

testicle and epididym, the seminal vesicles, the prostate, the left ovary and the uterus were weighed by precise scales. Stages of the sexual cycle were determined by vaginal smear in females.

Female rats treated during 90 days were mixed with males during 10 days, and then were isolated. After 10 days, the uterus was dissected to search for a possible gestation, and in the cases where this one was positive, the number of implantations was determined.

Table II : Impact of chronic orally administration of nickel (50 ppm : N1, 250 ppm : N2) on the percentage of the oestrus detected by vaginal smear in female rats

	C	N1	N2
5 days	50	45	40
10 days	40	40	20
15 days	100	80	20
30 days	60	0	60
60 days	40	40	20
90 days	100	100	100

Table III : Impact of the orally exposition to nickel (50 ppm : N1, 250 ppm : N2) on the percentage of pregnancies and the middle number of implantations in female rats after crossings beetwen groups

Males x females	Percentage of pregnancies	Middle number of d'implantations
C x C	100	9
N1 x C	80	7
N2 x C	80	6,8
C x N1	91,66	7,83
C x N2	36,36	3,54

■ Testosterone determination

Two techniques of dosage were used : the immuno-enzymatic assay ELISA, and the radioimmunologic assay RIA. The two techniques nearly gave the same results. The second technique was essentially very efficient when the rate of the testosterone was lower.

The technique ELISA was based on the principle of the competition. The antigen to measure (testosterone of the sample) and the antigen marked by one enzyme (testosterone marked to the POD) were added simultaneously to a quantity of antibody (anti-testosterone marked to the biotin) fixed to the streptavidine previously applied to the inside of the tubes. After homogenization and incubation, the free fraction was separated by washing. The bound fraction fixed to the inside of tubes was colored by a chromogene substratum then measured with a photometric reader. The quantity of the bound fraction was inversely proportional to the concentration of the unmarked free fraction added ; i.e. the testosterone of the sample to be measured. The concentration was determined in reference to a curve of standardization prepared simultaneously with known solutions of testosterone. The technique RIA was also based on the principle of the competition (radio immunoassay kit, réf. 1119, Immunotech, France). The testosterone was marked to the iodine 125. The antibody was previously fixed to the inside of tubes. The testosterone to be measured (sample or standard) and the marked testosterone (tracer) were added simultaneously to tubes containing antibodies. After homogenization and incubation, the free

fraction was separated by suction. The bound fraction attached to the inside of tubes was measured with a gamma meter connected to a computer. It was inversely proportional to rates of the testosterone added (sample or standard). The concentration in testosterone of the sample was given directly in ng/ml. The sensitivity of the RIA was 0.025 ng/ml. The coefficient of intra-assay variation (%) was 14.8 and the coefficient inter-assays variations (%) was 11.9. The cross reactivity (%) with 5 a-dihydroxytestosterone was 10.

■ Statistical analysis

It is realized with the «T» test of Student-Fisher. P≤0.05 was considered significant. Results were represented under shape of average ± SEM, with signaling if the difference with controls was significant or no.

Results

■ Sexual organs weights

Our results showed that the absolute and relative weights of the testicle, of the epididyme, of the prostate, of the seminal vesicles for males and of the ovary for females did not change after 90 days of treatment in comparison with the reference rats. However, those of the uterus showed a statistically significant increase among the females receiving the nickel during 90 days (table 1).

■ Vaginal smears

Table 2 showed that the oestrus was present among the females treated with the same proportions as controls.

■ Variation of the serum testosterone rate

Figure 1 showed significant variations of the testosterone serum level for treated rats in comparison with the controls. This rate decreased in the 10th day of the treatment for the group N2 and in the 15th for the group N1. This decrease was compensated by an important increase on the 15th day of the treatment for N2 and on the 30th day for N1.

Beyond 30 days, the rate of the testosterone returned to the same values as controls, although the exposure treatment continued.

■ Rates of pregnancies

Following crossings between groups showed that the number of pregnancies was lowered strongly in the case of females N2 in comparison with the control females. The number of implantations showed also a significant decrease among the treated (N2) (Table 3).

Discussion

The physiology of mammals fertility was very sensitive to disruptions of the organism by the exogenous agents (Jegou, 1996). Several exogenous compounds such as pesticides, drugs, organic solvents, tobacco, xenohormones and heavy metals like lead, nic-

kel, cadmium and vanadium, were considered as real toxic agents which affected the reproductive function (El Feki et al. 1984, 1985, 1996; Gennart et al. 1992; Gerhard et al. 1992; Smith et al. 1993; Tuorma 1995; Xie 1995; Domingo 1996; Foster et al. 1996; Jegou 1996; Toppari et al. 1996; Benoff et al. 1997; Ono et al. 1997; Smaoui et al. 1997). However the biochemical mechanisms of their cytotoxicity were not well explained.

This study has attempted to explore the impact of nickel administered by oral route on the reproductive function of the rat. Relative weights of sexual organs, vaginal smears, testosterone serum level and number of pregnancies and implantations have been chosen as biomarkers.

Our results suggested a statistically significant reduction of the testosterone serum level from the 10th day of the oral exposure to the nickel for rats N2 and from the 15th day for rats N1. The nickel seems to be a cause of a sexual hormonal failure. However, although the exposure treatment continued, our results showed that this failure was rapidly corrected. Xie et al. (1995) signaled also a testicular failure caused by nickel but for an acute exposure. The hormonal adaptation to the chronic treatment with nickel could be explained by the intervention of the «feed back» mechanism by compen-

satory increase of gonadostimulines (FSH, LH). Kekela (1999) showed that a nickel exposure was characterized by a decrease of the number of spermatozoon in the rat. Chronic metals intoxication according to Telisman (2000) leads to a progressive testicular deficiency together with a decrease of semen density, spermatozoon motility and also modification of the testosterone serum level. Previous research has attempted to show that intoxication by several environmental factors, (Bujan, 1998; Lasely, 1998; Reeder, 1998), organochlorides (De Solla, 1998), heavy metals (Gerhard, 1998; Telisman, 2000), pesticides (Hallidin, 1999), Chemical drugs (Nagao, 1998), induces a testicular disfunctioning and a deterioration of spermatogenesis, which can be due to a sexual deficiency. Authors have shown that nickel toxicity acts upon various systems, mainly the renal epithelial cells (Haugen et al. 1994).

Our results did not show a significant variation of the relative weight of sexual organs among the male rats treated with nickel during 90 days in comparison with the controls. This result would be explained by the already hormonal adaptation.

However, our results showed that the number of pregnancies and the average number of implantations were decreased among the females N2,

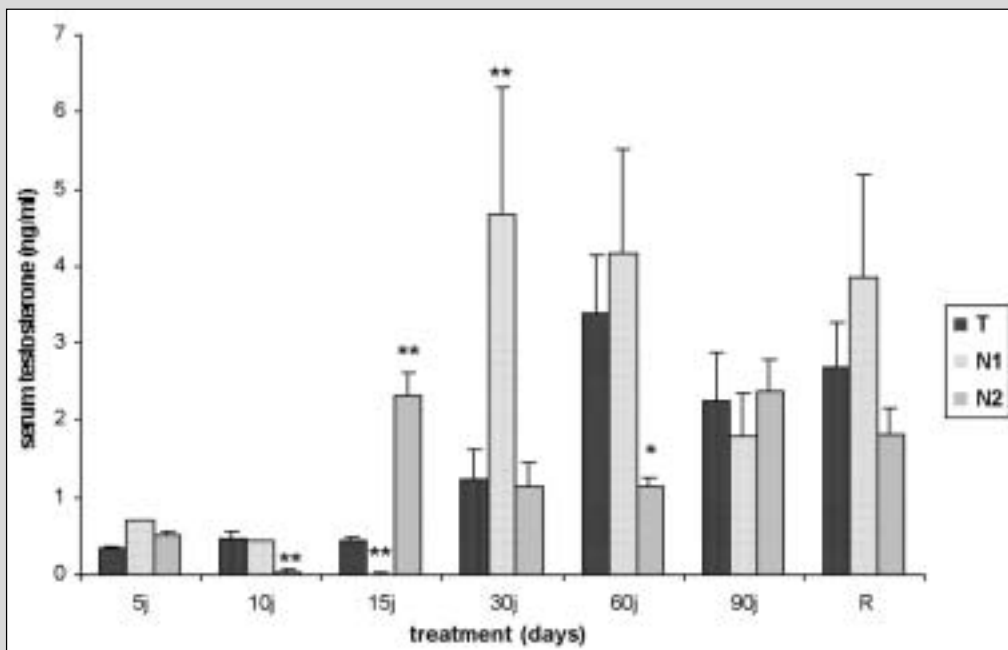


Figure 1 : Effect of the orally exposition to nickel (50 ppm : N1, 250 ppm : N2) during 3 months on serum testosterone levels in rats. R = recovery : 2 months after interrupting treatment. * : $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with controls (C).

treated during 90 days. A uterine failure would be the cause of these decreases. The hormonal and ovarian functions seemed to be unaffected according to the vaginal smears which indicated the presence of a normal oestrus in these females. According to Kekela (1999), a decrease of the number of pregnancies and of embryos indicates a decrease in the female reproductive function probably due to a decrease in uterus function. It seemed therefore that nickel is a persistent cytotoxic in the inside of the uterus. This hypothesis should be supported by a histological study. The cytotoxic effect of nickel was signalled by authors on other cells as the renal epithelium (Haugen et al. 1994). Some studies suggested that chronic exposure to this metal induces some oxidative damages to DNA and that magnesium protects the organism against these disruptions (Hong et al. 1997). Nickel, phagocytosed by the cell increases the activity of oxygenated radicals, catalyzes the transformation of the DNA and can cause cancer. The endogenous and exogenous antioxidants intervention stop these reactions (Costa et al. 1994; Fletcher et al. 1994;

Huang et al. 1994; Landolph 1994; Shi et al. 1994). Vitamin E decreases the cytotoxic effects of nickel, vanadium and mercury (Klein et al. 1994). Nickel can damage the renal epithelium in man, through its genotoxic oxidative effects. Antioxidants can protect against these effects (Haugen et al. 1994). Nickel, cadmium and chlorine were considered, therefore, as stress oxidative (Frenkel et al. 1994). The organism can defend itself and can adjust to this stress by its endogenous antioxidants and its proteins of stress as metallothioneines. They probably play a disintoxicating and protective role for cells against certain chemical effects and oxygenic radicals (Cherian et al. 1994). Our experimental study has been achieved with two nickel chloride doses, 50 ppm and 250 ppm. These doses have been selected according to the bibliography (Smith et al. 1993). They were usually found in environments exposed to nickel such as industrial areas or heavy road traffic areas. In conclusion, our results tried to show that the administration of nickel chloride by oral route in drinking water at

the rate of 50 ppm or 250 ppm during 5, 10, 15, 30, 60 or 90 days for rats in growth period, seems to cause two reproductive disruptions. The first would be functional affecting the hormonal function while the second would be organic affecting the uterus inside and reducing the rate of pregnancies. Whereas the first was rapidly corrected, the second seemed to persist.

Acknowledgments : We thank Mr. Hajji Ayadi from the Engineering School of Sfax, for his help with the English language.

H. Chakroun*; **N. Hfaiedh***;
F. Makni-Ayadi**; **F. Guermazi*****;
A. Kammoun****; **A. Elfeki***

*Laboratory of Animal Ecophysiology,
Faculty of Sciences, Sfax.

**Laboratory of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Sfax.

***Laboratory of Biophysique,
Faculty of Medicine, Sfax.

Laboratory of Nuclear Medicine,
CHU Bourguiba, Sfax.

****Laboratory of Animal Physiology,
Faculty of Sciences, Tunis.