Journal de la Société de Biologie, 196 (3), 241-244 (2002)

L'aromatase testiculaire

Serge Carreau, Sonia Bourguiba, Sophie Lambard & Isabelle Galeraud-Denis

Laboratoire de Biochimie-IRBA, EA 2608-USC INRA,Université de Caen, France

Reçu le 10 avril 2002

RÉSUMÉ

Le cytochrome P450 aromatase (P450arom) est l'unique enzyme qui catalyse de manière irréversible la transformation des androgènes en estrogènes. L'aromatase est impliquée notamment dans le développement, la reproduction, la différenciation sexuelle et le comportement, les métabolismes osseux et lipidique, le fonctionnement du cerveau ; son importance est capitale chez l'Homme. Nos résultats et ceux de la littérature démontrent que non seulement les cellules somatiques mais aussi les cellules sexuelles sont capables de produire des estrogènes via la présence d'une aromatase dont l'expression est contrôlée par les promoteurs II et I.4 dans le testicule de rongeurs. Très récemment nous avons démontré que les spermatozoïdes éjaculés chez l'homme contiennent des transcrits spécifiques de l'aromatase dont le taux varie en fonction de la qualité du spermatozoïde. Si la testostérone est le médiateur principal du développement testiculaire, les estrogènes produits localement, compte tenu de la présence de récepteurs spécifiques (ERα et ERβ), sont sans doute impliqués dans le contrôle de la spermatogenèse en agissant soit directement sur les cellules sexuelles, soit par l'intermédiaire des cellules somatiques, notamment au niveau des spermatides et de la maturation du spermatozoïde. Ces données nous incitent donc à analyser la physiologie testiculaire en tenant compte du rôle intrinsèque des estrogènes et cela en particulier chez l'homme comme cela est décrit dans l'article de C. Carani (ce volume).

SUMMARY The testicular aromatase: a physiopathological approach

The cytochrome P450 aromatase (P450arom) is the terminal enzyme involved in the irreversible transformation of androgens into estrogens. The P450arom plays a role in development, reproduction, sexual differentiation and behaviour, but also in bone and lipid metabolisms, brain functions and diseases such as breast and testicular tumors. Besides testicular somatic cells, where the aromatase gene is expressed via promoter II and I.4, this gene is transduced in a fully active protein in rat germ cells providing evidences for an additional site of estrogen production within the male gonad of rodents (our results and these in the literature). In addition we provided evidence for the expression of P450arom in ejaculated human spermatozoa. Together with the widespread distribution of estrogen receptors (ERα and ERβ) in various testicular cells as well as in the other parts of the genital tract, these data suggest a physiological role for these female hormones in the regulation of spermatogenesis especially in the postmeiotic steps.

AVANT-PROPOS

Les testicules de mammifères ont une double fonction : la production des gamètes et la synthèse de stéroïdes qui sont contrôlées par les gonadotrophines, dont l'action est modulée *in situ* par de nombreuses substances produites par les cellules gonadiques elles-mêmes. Parmi ces régulateurs paracrine et/ou autocrine, les estrogènes, bien que considérés comme des hormones typiquement femelles, semblent jouer un rôle de plus en plus important, en dehors de leur rôle dans le rétrocontrôle central sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (pour revues Carreau *et al.*, 1999 ; O'Donnell *et al.*, 2001).

LE GÈNE DU CYTOCHROME P450 AROMATASE ET SON EXPRESSION DANS LES CELLULES TESTICULAIRES

L'aromatase est une glycoprotéine membranaire composée de deux entités : le cytochrome P450 aromatase (P450arom), protéine spécifique contenant l'hème qui est responsable de la liaison et de la transformation des substrats androgéniques, et la réductase qui permet le transfert des électrons du NADPH réduit à l'hème des cytochromes. Le complexe enzymatique aromatase est présent chez tous les vertébrés, en particulier chez les mammifères où il est localisé dans le réticulum endo-

plasmique de pratiquement tous les tissus, notamment le cerveau, les gonades, le placenta, le tissu adipeux et la glande mammaire.

Le P450arom est issu d'un gène unique le *CYP19* (ainsi nommé car il permet l'élimination du méthyle en C19 caractéristique des androgènes), appartenant à la superfamille des cytochromes P450 qui contient au moins 500 membres regroupés en 74 familles de gènes et de nombreux pseudo-gènes (pour revues Simpson *et al.*, 1994 ; 1997). Le gène *CYP19* humain est localisé sur le chromosome 15 dans la bande q21.1, c'est l'un des plus longs (environ 100 kb) parmi ceux codant pour des enzymes stéroïdiens (Bulun *et al.*, 1997). Le gène du P450arom a été cloné chez de nombreuses espèces, il est composé de 17 exons dont 9 sont codants (II à X), et le site d'initiation de la traduction est localisé dans l'exon II. Ce gène est tout à fait particulier car il renferme au moins 8 exons non traduits ; tous situés dans l'extrémité 5', ils sont épissés après leur transcription en aval d'autant de promoteurs tissu-spécifiques (Fig. 1). Parmi ces nombreux promoteurs ceux du placenta (PI.1) et de l'ovaire (PII) sont les mieux caractérisés ; ils renferment de nombreux éléments régulateurs de la transcription (CRE, GAS, GRE, SF1, AP1, ...).

Dans le testicule du rat, PII est activé préférentiellement (Lanzino *et al.*, 2001). Chez le rat, les ARN messagers de l'aromatase sont présents non seulement dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli mais aussi dans les cellules germinales à différents stades de leur maturation (Levallet *et al.*, 1998a). Dans les cellules sexuelles, le taux d'ARNm du P450arom dans les spermatocytes pachytènes est 3 fois supérieur à celui des spermatides rondes ; dans les spermatozoïdes, ce taux est encore plus faible. En fonction du degré de maturation du testicule, le nombre de copies du P450arom varie, en particulier dans la cellule de Sertoli adulte où le taux est 10 fois inférieur à celui des cellules immatures. Par contre, dans les cellules de Leydig, la quantité d'ARNm varie peu en fonction de l'âge et est équivalente à celle des spermatocytes pachytènes (Carreau, 2001). Cependant les données que nous avons pu mettre en évidence dans les cellules germinales démontrent que le TGFβ et le TNFα contrôlent le gène de l'aromatase ; ainsi, non seulement le promoteur PII est concerné, mais également le promoteur PI.4 (Bourguiba *et al.*, 2000 ; résultats non publiés). En outre, nous avons rapporté, dans les cellules germinales, la présence de deux transcrits supplémentaires du P450arom (l'un où l'exon 10 est remplacé par un intron, et l'autre renferme un exon 9 tronqué). Ces deux ARNm résultent d'un épissage alternatif dans la partie des sites de polyadénylation ce qui confirme l'apparition de transcrits de longueur variable. Ces deux transcrits coderaient pour des protéines inactives ayant perdu le domaine de liaison à l'hème (ces protéines pré-

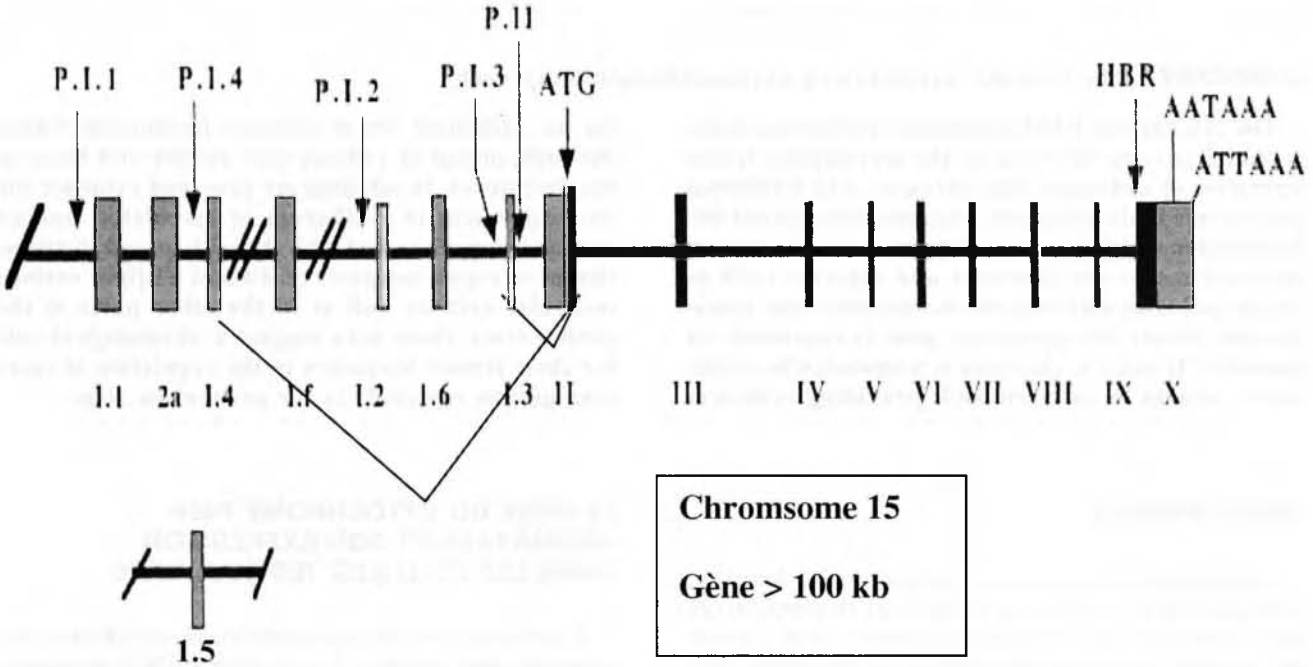


FIG. 1. – Représentation schématique du gène de l'aromatase humaine.

La taille du gène (incluant la région régulatrice) est supérieure à 100 kb. Les exons non traduits (I.1 à I.3) sont placés sur le gène (sauf l'exon I.5) et sont indiqués avec leurs promoteurs (P.). La région de fixation de l'hème (HBR) et les sites de polyadénylation sont représentés. Les distances entre les exons I.4 et I.2 sont encore mal connues (//). Les autres exons traduits sont représentés par des chiffres de II à X.

Dans la gonade mâle le promoteur II est essentiel mais les promoteurs I.6/I.3 et I.4 peuvent être concernés dans l'expression du gène de l'aromatase.

dictives auraient la possibilité de lier l'androgène, donc de diminuer son taux mais sans le transformer en estrogène (Levallet *et al.*, 1998b).

Les différents ARNm de l'aromatase sont la résultante de la complexité de l'épissage alternatif de ce gène. Parmi ces transcrits, peu de données sur leur régulation différentielle et leur stabilité (régulation post-transcriptionnelle) sont disponibles. Nous avons abordé cet aspect récemment en analysant la demi-vie des ARNm de l'aromatase à partir de cellules de Leydig purifiées chez le rat adulte. La stabilité des messagers est optimisée (x2) en présence de facteurs endocrines (LH, testostérone) apportant donc une explication quant à la synthèse de la protéine aromatase et, par voie de conséquence, sur l'activité enzymatique qui peut varier sensiblement (Génissel *et al.*, 2001). Concernant les cellules sexuelles du rat, l'activité aromatase augmente en fonction du degré de maturation : elle est 2 à 4 fois plus élevée dans les spermatozoïdes testiculaires par rapport aux autres cellules (Carreau *et al.*, 1999).

L'AROMATASE CHEZ L'HOMME

L'aromatase a été d'abord décrite dans les cellules de Leydig puis *in vitro*, une activité aromatase a été mise en évidence non seulement dans les cellules de Leydig mais aussi dans les cellules de Sertoli qui peuvent par ailleurs devenir une source importante d'estrogènes dans le cas de tumeurs testiculaires chez des garçons prépubères (gynécomastie associée au syndrome de Peutz-Jegler (pour revue Carreau, 1996). En outre, la capacité du spermatozoïde humain à métaboliser la pregnénolone en dérivés delta 4-3 cétoniques, dont la testostérone et l'estradiol, a été décrite (Gunasegaram *et al.*, 1998).

Nous venons de décrire la présence d'ARNm de l'aromatase dans le spermatozoïde humain éjaculé. Il est intéressant de noter que ces transcrits présentent plus de 98 % d'homologies avec la séquence publiée de l'aromatase humaine, et que leur taux sont significativement plus faibles dans des spermatozoïdes immobiles (Lambard *et al.*, 2001 ; soumis)

Peu de données sont disponibles concernant la régulation de l'expression du gène du P450arom chez l'homme (Simpson *et al.*, 1997 ; Bulun *et al.*, 1993). Le promoteur PII est présent, il est associé au promoteur 1.6 (identique en termes de régulation au promoteur 1.3) qui est surexprimé dans les tumeurs testiculaires (Shozu *et al.*, 1998).

Chez l'homme, quel que soit le tissu, les exons codants pour les ARNm sont identiques, ils conduisent à la synthèse d'une protéine de 55 kDa contenant 503 acides aminés (Simpson *et al.*, 1994, 1997).

Tableau 1. – Aromatase et récepteurs aux estrogènes (ERα et ERβ) dans le tractus génital mâle chez l'homme.

Tissu/Cellules	Aromatase	ERα	ERβ
Leydig	+	+ (o)	+ (o)
Péritubulaire	?	–	+ (#)
Sertoli	+	–	+ (o, #)
Spermatogonie	?	–	+ (#, §)
Spcytes pach.	?	+ (*)	+ (#, §, *)
Sptides rondes	?	+ (*)	+ (#, §, *)
Spermatozoïde	+	+ ?	+ ?
Canaux eff.	?	+ (#)	+ (#, o)
Epididyme	?	–	+ (#)
Vés. seminales	?	+ (#)	+ (#)
Prostate	+	–	+ (o)

* : Pentakainen, 2000 ; o : Pelletier, 2000; # : Saunders, 2001 ; § : Makinen, 2001.
Pour plus de détails voir les revues de : Carreau, 1999, 2001 ; Hess, 2000 ; O'Donnell, 2001.

PERSPECTIVES SUR LE RÔLE DES ESTROGÈNES DANS LA GONADE MÂLE

Comme toutes les hormones, les estrogènes agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (ER) qui, en tant que facteurs de transcription, vont moduler l'expression de gènes cibles impliqués dans la croissance, la différentiation et les fonctions des cellules.

À côté du rôle classique de régulateur central dans la production des gonadotrophines attribué aux hormones femelles, toutes les observations que nous avons décrites (notamment la présence pluricellulaire d'une aromatase biologiquement active dans le testicule ; Carreau, 2001) sont clairement en faveur d'un rôle des estrogènes dans la spermatogenèse. De fait, l'équipe de Simpson (pour revue O'Donnell *et al.*, 2001) a rapporté que des souris mâles déficientes en aromatase par "knock out" du gène (ArKO), deviennent infertiles à partir de l'âge de 4 mois (arrêt de maturation des spermatides au « stade arrondi » chez tous les animaux âgés d'un an avec, en parallèle, une apoptose augmentée). De plus l'existence de récepteurs aux estrogènes dans les cellules testiculaires, et en particulier dans les canaux efférents et l'épididyme a été rapportée. Les résultats obtenus avec les souris déficientes en ER (ERKOα) montrent que les mâles sont stériles suite à une insuffisance de réabsorption du fluide au niveau efférentiel conduisant par reflux à la destruction des cellules germinales en amont (pour revues Couse & Korach, 1999 ; Hess, 2000). Par ailleurs, nous avons mis en évidence chez le campagnol, une synchronisation entre le redémarrage de la spermatogenèse, l'expression de l'aromatase et des récepteurs aux estrogènes (ERβ) dans les spermatocytes et les spermatides (Bilinska *et al.*, 2001).

Chez l'homme outre les données présentées par le Dr Carani (article associé), les travaux de Pentikainen *et al.* (2000) confirment les points ci-dessus avec notamment la mise en évidence chez l'homme, de ERα et ERβ, dans les spermatocytes et les spermatides. En outre ces auteurs ont démontré que l'estradiol (à concentration physiologique) exerçait un rôle protecteur pour les cellules germinales *in vitro* (effet antiapoptotique). Les ERβ ont été retrouvés par Saunders *et al.* (2001) et Makinen *et al.* (2001). Enfin il faut ajouter les résultats plus anciens faisant état d'un rôle positif des estrogènes dans la motilité

des spermatozoïdes (Cheng & Boettcher, 1979). Ces observations sont à rapprocher des travaux démontrant la présence d'ER dans les spermatozoïdes avec un effet génomique (Durkee *et al.*, 1998) et non génomique (Luconi *et al.*, 1999) des estrogènes.

En conclusion la structure du gène *CYP19* souligne la complexité de la régulation de son expression mais aussi l'importance physiologique de cette enzyme. Il apparaît que les éléments de régulation présents sur les différents promoteurs reflètent l'existence de voies d'activation cellulaires variées compte tenu du type cellulaire et de l'état physiologique ou pathologique. Il apparaît fondamental de préciser la régulation de l'expression du gène de l'aromatase, notamment dans les cellules germinales du testicule, et le mécanisme d'action des estrogènes à ce niveau compte tenu de l'existence des récepteurs spécifiques. Cette ultime étape est capitale car elle revêt un intérêt majeur dans la mesure où des gènes estrogénorégulés pourront être identifiés comme étant nécessaires à la qualité du gamète

Remerciements. – Je tiens à remercier chaleureusement les docteurs J. LEVALLET, C. GÉNISSEL, et B. BILINSKA pour leur active collaboration durant ces dernières années.

BIBLIOGRAPHIE

Bilinska B., Schmalz-Fraczek B., Kotula M. & Carreau S. , Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Mol.Cell. Endocrinol.*, 2001 , *178*, 189-198.

Bourguiba S., Genissel C., Benhamed M & Carreau S., L'aromatase dans les cellules germinales du rat: effets du TGFβ et du TNFα. *Andrologie*, 2000, *10 (2)*,148-154.

Bulun S. E., Rosenthal I. M., Brodie A. M. H. *et al.*, Use of tissue-specific promoters in the regulation of aromatase cytochrome P450 gene expression in human testicular and ovarian sex cord tumors, as well as in normal fetal and adult gonads. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, *77*, 1616-1621.

Bulun S. E., Noble L. S., Takayama K., Michael M. D. *et al.*, Endocrine disorders associated with inappropriated high aromatase expression. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1997, *61 (3-6)*, 133-139.

Carreau S., Paracrine control of human Leydig cell and Sertoli cell functions. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1996, *34 (3)*, 111-119.

Carreau S., Genissel C., Bilinska B. & Levallet J., Sources of estrogen in the testis and the reproductive tract of the male. *Inter. J. Androl.*, 1999, *22*, 211-223.

Carreau S., Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Molec. Cell. Endocrinol.*, 2001, 178, 65-72.

Cheng C. Y. & Boettcher B., The effects of steroids on the *in vitro* migration of washed human spermatozoa in modified tyrode's solution or in fasting human blood serum. *Fertil. Steril.*, 1979, *32* , 566-570.

Couse J. F. & Korach K. S., Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.*, 1999, *20*, 358-417.

Durkee T. J., Mueller R. M. & Zinaman M., Identification of oestrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Amer. Jl. Obst. Gyn.*, 1998, *178*, 1288-1295.

Genissel C., Levallet J. & Carreau S., Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells. Comparison with estradiol production. *J. Endocrinol.* , 2001, *168*, 95-105.

Gunasegaram R., Chew P. C. T., Loganath A., Peh K. L. & Ratnam S. S., A4-3-keto pathway for testosterone synthesis in human spermatozoa. *Arch. Androl.*, 1998, *40*, 49-57.

Hess R. A., Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev. Reprod.*, 2000, *5*, 84-92.

Lambard S., Galeraud-Denis I. & Carreau S., Mise en évidence des transcrits du cytochrome P450 aromatase dans les spermatozoïdes humains éjaculés. *Andrologie*, 2001, *1*, 36-44.

Lanzino M., Catalano S., Genissel C., Ando S., Carreau S. & McPhaul J., Aromatase mRNA is derived from the proximal pPromoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli, and germ cells of the rat testes. *Biol. Reprod.*, 2001, 64, 1439-1443.

Levallet J., Bilinska B., Mittre H., Genissel C., Fresnel J. & Carreau S., Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol. Reprod.*, 1998a, *58*, 919-926.

Levallet J., Delarue B., Mittre H. & Carreau S., Alternative splicing events in the coding region of the P450 aromatase gene in male rat germ cells. *J. Molec. Endocrinol* ., 1998b, *20*, 305-312.

Luconi M., Muratori M., Forti G. & Baldi E., Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, *84*, 1670-1678.

Makinen S., Makela S., Zhang W. H., Warner M., Rosenlund B., Salmi S., Hovatta O. & Gustafsson J. A., Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Molec. Hum. Reprod.*, 2001, *7*, 497-503.

O'Donnell L., Robertson K. M., Jones M. E. & Simpson E. R., Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, 2001, *22*, 289-318.

Pelletier G. & El-Alfy M., Immunocytochemical localization of estrogen recptors α and β in the human reproductive organs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, *85*, 4835-4840.

Pentakainen V., Erkkila K., Sumalainen L. , Parvinen M. & Dunkel L., Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, *85*, 2057-2067.

Saunders P. T. K., Sharpe R. M., Williams K., Macpherson S., Urquart H., Irvine D. S. & Millar M., Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol. Hum. Reprod.* 2001, *7*, 227-236.

Shozu M., Zhao Y., Bulun S. E. & Simpson E. R., Multiple splicing events involved in regulation of human aromatase expresion by a novel promoter 1.6. *Endocrinology*, 1998, *139*, 1610-1617.

Simpson E. R., Mahendroo M. S., Means G. D. *et al.*, Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.*, 1994, *15*, 342-355.

Simpson E. R., Michael M. D., Agarwal V. R., Hinshelwood M. M., Bulun S.E. & Hao Y., Expression of the *CYP19* (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB J.*, 1997, *11*, 29-36.