

# L'aromatase dans les cellules germinales du rat mâle: effets du TGF $\beta$ et du TNF $\alpha$

S. BOURGUIBA, C.GENISSEL, M.BENAHMED\*, S.CARREAU.

*Biochimie-IRBA, UPRES EA 2608, Université de Caen et \*INSERM U 407 Lyon.*

## RESUME

Les fonctions de reproduction chez le mâle sont sous le contrôle des hormones hypophysaires. 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 croissance et les cytokines. 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 immunolocalisée non seulement dans les cellules de Leydig, mais aussi dans les cellules germinales. L'objectif de notre travail est d'étudier les facteurs susceptibles de contrôler la production des estrogènes dans les cellules germinales du rat mâle adulte en précisant notamment, les effets du TGF $\beta$  et du TNF $\alpha$  sur l'expression du gène de l'aromatase. Les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes ont la capacité d'aromatiser les androgènes en estrogènes; cette activité augmente en fonction de stade de développement des cellules germinales: elle est 5 fois plus élevée dans les spermatides que dans les spermatocytes pachytènes. A l'aide d'amorces spécifiques, nous avons pu mettre en évidence par RT-PCR, l'ARNm de l'aromatase dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes. Nos résultats préliminaires obtenus par RT-PCR quantitative compétitive ont montré que la testostérone (200ng/ml) stimule la synthèse de l'ARNm de l'aromatase dans les deux types de cellules germinales étudiés. Cette stimulation est fortement inhi-

bée dans les spermatides rondes par l'ajout du TGF $\beta$  (1ng/ml); l'effet de ce facteur sur les spermatocytes reste à déterminer. L'ajout du TNF $\alpha$  (10ng/ml) aux cellules traitées par la testostérone induit une légère stimulation de la synthèse des messagers de l'aromatase dans les spermatocytes pachytènes; cependant, cette cytokine exerce un effet inhibiteur dans les spermatides rondes. En somme, dans le testicule des rongeurs, les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques représentent une nouvelle source d'estrogène; ces cellules possèdent en outre des récepteurs (ER $\beta$ ) pour ces hormones. Ces observations permettent de suggérer un contrôle estrogénique de la spermiogenèse chez certains mammifères.

**Mots clefs:** *aromatase, estrogènes, spermatocyte pachytène, spermatide ronde, RT-PCR, ARNm aromatase, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ .*

**Correspondance:** Dr S.CARREAU  
Tél: 02 31 56 54 88 Fax : 02 31 56 53 20  
E-mail: carreau@ibba.unicaen.fr

## I. INTRODUCTION

Chez le mâle outre les gonadotrophines, la testostérone, synthétisée par les cellules de Leydig, représente le principal régulateur paracrine du développement testiculaire. Elle est impliquée notamment dans l'initiation et le maintien de la spermatogenèse mais aussi dans la formation des caractères sexuels secondaires. Toutefois, la présence des estrogènes dans le testicule est bien documentée mais leur fonction au niveau du tractus génital mâle reste encore mal connue [3]. Cependant, les observations récentes obtenues chez les souris déficientes en aromatasase (ArKO) montrent un blocage de la spermatogenèse au stade spermatides rondes [17]. De plus, l'injection d'un inhibiteur de l'aromatasase chez le rat comme chez le singe provoque une réduction du nombre des spermatides et altère leur maturation [19].

La transformation irréversible des androgènes en estrogènes est catalysée par un complexe enzymatique microsomial appelé aromatasase. Ce complexe est composé d'un cytochrome P450 aromatasase spécifique et d'une flavoprotéine ubiquiste, le NADPH cytochrome P450 réductase [20]. Dans le testicule les premières cellules sources d'estrogène mises en évidence, ont été les cellules de Sertoli chez le rat immature et les cellules de Leydig chez le rat mature. Cependant, des études récentes ont montré que les cellules germinales participent aussi à la synthèse des estrogènes [8-10,14]. Les cellules germinales du rat mâle adulte depuis le stade pachytène jusqu'au stade spermatozoïde, sont le siège d'une aromatasase active [9]. Ces cellules constituent donc une source d'estrogène additionnelle potentiellement significative dans le testicule de mammifères. Toutefois, la régulation de l'expression du gène de l'aromatasase (CYP 19) dans le testicule est peu étudiée. On sait à ce jour que le gène CYP 19 codant pour l'aromatasase testiculaire s'exprime préférentiellement via le promoteur PII. Ce dernier associé au promoteur PI.3 présentent des séquences régulatrices différentes : CRE (cAMP responsive element), AP-1 (séquences de régulation TCAGTCA), TGF $\beta$  (séquence régulatrice qui fixe le TGF $\beta$ ) et SP-1 (séquence régulatrice qui fixe le facteur de transcription SP-1) [13]. L'étude des facteurs susceptibles de moduler la régulation du gène CYP 19, est

donc déterminante dans le maintien de l'équilibre androgènes / estrogènes testiculaires. Le tissu germinale est un tissu à renouvellement très rapide et de ce fait est une cible potentielle pour les facteurs de croissance et les cytokines [11]. Le TGF $\beta$  et le TNF $\alpha$  sont sécrétés par les cellules de Sertoli et les cellules germinales. En outre des récepteurs notamment pour le TGF $\beta$  existent sur les cellules germinales, ce qui suggérerait son implication dans l'expression de l'aromatasase. Notre objectif est donc d'étudier l'expression du gène de l'aromatasase dans les cellules germinales purifiées du rat mâle adulte et d'étudier les facteurs susceptibles de contrôler la production des estrogènes dans ces cellules en précisant notamment, les effets du TGF $\beta$  et du TNF $\alpha$ .

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. Préparation des cellules germinales

A partir de testicules de rat Sprague-Dawley âgés de 90j, une suspension enrichie en cellules germinales est préparée selon le protocole décrit par Meistrich *et al.*, (1981) et modifié dans notre laboratoire pour la séparation des cellules germinales par la technique de Staput [12].

Le tissu testiculaire est soumis à une digestion enzymatique (trypsine 0,025%, DNase 0,1% dans du tampon PBS, pH 7,2) pendant 45 min à 32°C. La séparation des cellules germinales est réalisée à l'aide du Staput sur un gradient de densité continu non linéaire en albumine sérique bovine (2,75 - 0,2%) [1]. Les fractions contenant les spermatozoïdes pachytènes et les spermatides rondes sont identifiées au microscope. Les cellules germinales purifiées sont abondamment lavées avec du PBS supplémenté en pyruvate (6mM) et en glucose (3,3mM), comptées et la pureté est estimée au microscope.

### 2. Culture des cellules germinales

Les cellules germinales purifiées sont cultivées à raison de  $3.10^6$ -  $6.10^6$  cellules/ml pour les spermatozoïdes pachytènes et de  $7.10^6$ -  $10.10^6$  cellules/ml pour les spermatides rondes, à 32°C pendant 18 h dans du milieu Ham F12/DMEM (pH 7,3) supplémenté en pyruvate (10 mM) et en glucose (6 mM), sous atmosphère air / CO<sub>2</sub> (95 :5 ;v/v), en absence et en présence, de testostérone (200 ng/ml), de TGF $\beta$  (1ng/ml) et de TNF $\alpha$  (10 ng/ml). D'après la lit-

térature, la testostérone, le TGF $\beta$  et le TNF $\alpha$  exercent leurs effets optimaux sur les cellules des tubes séminifères pour les doses définies préalablement pour références [3 et 11].

### 3. Extraction des microsomes et mesure de l'activité aromatasase

La préparation des microsomes à partir des cellules germinales purifiées dérive de la technique décrite par Rayan en 1959 [16]. La mesure de l'activité aromatasase est réalisée par la méthode à l'eau tritiée. Cette technique repose sur l'élimination stéréospécifique, sous forme d'eau, des atomes d'hydrogène en position du carbone 1 des androgènes, au cours de la réaction [6]. Les microsomes sont incubés dans 500  $\mu$ l du tampon Tris-maléate (50 mM) avec 1000 pmoles de [1-<sup>3</sup>H] 4 androstène-3,17-dione ; la réaction est initiée par l'ajout de 0,6 mM de NADPH. Elle est stoppée après 30 min d'incubation à 37°C par l'addition de 2 volumes de chloroforme. Les tubes sont vortexés pendant 30 secondes, puis centrifugés 5 min à 4000 rpm à 4°C. Les stéroïdes sont adsorbés en présence de 500  $\mu$ l d'une suspension de charbon (7%) contenant du dextran T70 (1,5%). Les tubes sont maintenus 10 min à 4°C et centrifugés 10 min à 4000 rpm à 4°C. La radioactivité d'un aliquot de la phase aqueuse (500  $\mu$ l) est alors comptée en scintillation liquide.

### 4. Transcription inverse - Polymérisation en chaîne (RT-PCR)

Cette technique a été utilisée pour la mise en évidence des ARNm de l'aromatasase dans les cellules germinales purifiées. Les ARN totaux sont extraits à partir des spermatoctes pachytènes et des spermatides rondes après incubation avec du Trizol (GibcoBRL); cette méthode est dérivée de la technique de Chomczynski et Sacchi [5].

Les ARNm présents dans les ARN totaux sont rétro-transcrits en ADN complémentaire en présence de 200 UI de Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, France) ; 500  $\mu$ M dNTP ; 0,2  $\mu$ g d'oligo dT (12-18 mers) et 24 UI RNAsine dans du tampon de RT. La transcription a lieu pendant 1 h à 37°C puis 5 min à 94°C.

Les ADNc sont utilisés pour l'amplification en chaîne en présence de 200  $\mu$ M dNTP ; 50 pmoles de chaque amorce ; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1,5 UI

de la Taq polymérase (Promega, France). La réaction de PCR est initiée par une étape de 5 min à 94°C puis s'ensuivent 35 cycles (30 sec à 94°C, 30 sec à 60°C et 1 min à 72°C avec incrémentation de 2 sec à chaque cycle).

Le couple d'amorces a été choisi pour amplifier un fragment de 289 pb hautement conservé du gène de l'aromatasase contenant la région hélicale et la région d'aromatation [9].

#### Les amorces utilisées sont :

- amorce 5'arom de 23 bases située sur l'exon 8 (1555-1577), 5'- GCT TCT CAT CGC AGA GTA TCC GG- 3'

- amorce 3'arom de 24 bases située sur l'exon 9 dans la région d'aromatation (1821-1844), 5'- CAA GGG TAA ATT CAT TGG GCT TGG - 3'.

Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 2% en présence de bromure d'ethidium (BET) et les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous UV à 254 nm.

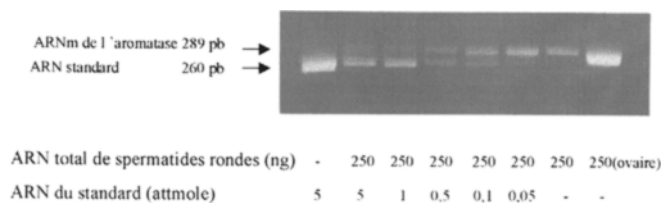
Transcription inverse-Polymérisation en chaîne quantitative compétitive

Cette méthode permet d'évaluer la quantité d'ARNm de l'aromatasase présent dans une suspension d'ARN total. Le fragment de 289 pb est co-amplifié avec un standard interne de 260 pb (ce standard correspond au fragment 289 pb mais délété de 29 pb); ces deux fragments possèdent les mêmes extrémités permettant ainsi de les amplifier par le même couple d'amorces (5'arom et 3'arom). Pour chaque échantillon à quantifier, une RT est réalisée en présence d'une quantité connue et constante d'ARN total et une quantité d'ARN standard à concentrations différentes. La PCR qui suit est réalisée avec le couple d'amorces (5'arom et 3'arom) dans les conditions citées précédemment. Les produits amplifiés (fragments de 289 pb et standard de 260 pb) sont séparés sur gel d'agarose à 4% contenant du BET (Fig. 1). Les gels analysés avec le système Bio-Profil (Wiber Lourmat) et les quantités d'ARNm spécifiques sont déterminées comme précédemment décrit [9,10].

## III. RESULTATS

### 1. Activité aromatasase dans les cellules germinales purifiées.

Les cellules germinales possèdent une aromatasase capable de convertir l'androstènedione en



**Figure 1: Exemple de RT-PCR quantitative compétitive.**

estrone. Cette activité augmente en fonction du stade de développement de la cellule germinale (Tableau 1 ci-dessous).

	Spermatozoa ronds	Spermatocytes pachytènes
Activité enzymatique (fmole/mg de protéine/min)	34,25	178,2

Le témoin positif utilisé est représenté par les protéines microsomiales placentaires humaines. L'activité aromatase est de 97,8 pmoles/mg de protéine/min.

## 2. Mise en évidence des ARNm de l'aromatase dans les cellules germinales

L'étude par RT-PCR nous a permis de mettre en évidence le messager du cytochrome P450 aromatase dans les spermatocytes pachytènes et les spermatozoa ronds (Fig.2). Un fragment unique de 289 pb a été amplifié à partir des ARN extraits des cellules germinales et des tubes séminifères. La taille du fragment est identique à celui codant pour le cytochrome P450 aromatase dans l'ovaire de ratte; aucun signal n'est visible dans l'ARN de muscle qui nous sert de témoin négatif.

## 3. Effets du TGF et du TNF sur l'expression du gène de l'aromatase.

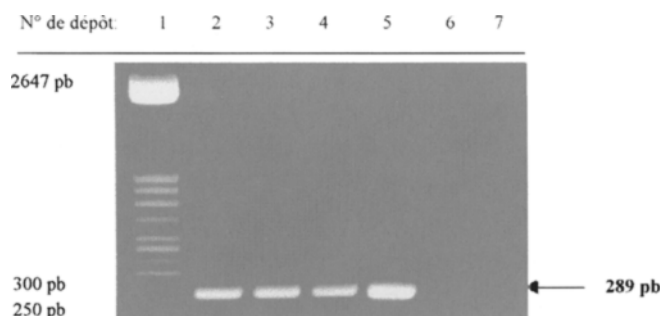
La technique de RT-PCR quantitative compétitive a été utilisée afin d'estimer le contenu de chaque type cellulaire en messager du cytochrome P450 aromatase et d'apprécier les effets potentiels de TGF et du TNF sur l'expression du gène. Les résultats sont représentés dans le tableau 2 ci-dessous.

## Quantité d'ARNm aromatase (attmoles / µg d'ARN total)

	Spermatozoa ronds	Spermatocytes pachytènes
--	-------------------	--------------------------

Cellules incubées sans traitement	2,043	1,609
+ Testostérone (T, 200ng/ml)	3,494	2,595
+ T (200ng/ml)+TNF (10ng/ml)	3,76	1,562
+ T (200ng/ml)+TGF (1ng/ml)	-	0,53

Le témoin positif est représenté par l'ARN d'ovaire de ratte, la quantité d'ARNm spécifiques de l'aromatase est de 19,8 attmoles/µg d'ARN total.



**Figure 2: Expression de l'aromatase dans les cellules germinales purifiées. L'amplification par RT-PCR d'ARN extrait de cellules testiculaires de rat adulte: le marqueur de taille (ligne 1); spermatocytes pachytènes (ligne 2); spermatozoa ronds (ligne 3); tubes séminifères (ligne 4), ovaire (témoin positif, ligne 5). L'ARN de muscle (témoin négatif, ligne 6) et un blanc où l'ARN est remplacé par de l'eau (ligne 7).**

## IV. DISCUSSION

La présente étude a démontré que les cellules germinales constituent une nouvelle source d'estrogène dans le testicule de rat mâle adulte. Ceci confirme les données bibliographiques récentes [8,9]. La purification par Staput des différents types de cellules germinales a permis de montrer que chaque type cellulaire, spermatocytes pachytènes et spermatozoa ronds, a la capacité d'aromatiser les androgènes en estrogènes. Cependant, l'activité

enzymatique est 1000 fois plus faible par rapport à celle de l'aromatase placentaire humaine. Dans les cellules germinales, l'activité aromatase augmente en fonction du degré de leur maturation. Levallet *et al.*, 1998 ont montré que l'activité aromatase est maximale dans les spermatozoïdes [9], alors que la production des estrogènes par les cellules de Sertoli de rat diminue en fonction de l'âge: elle est minimale chez l'adulte et inhibée par les cellules germinales [2,18]. Ainsi la participation des cellules de Sertoli à l'activité aromatase tubulaire est faible chez le rat adulte et les cellules germinales représentent donc la source majeure de la production d'estrogènes dans les tubes séminifères.

L'étude par RT-PCR nous a permis de mettre en évidence le messager de l'aromatase dans les spermatocytes pachytènes et les spermatozoïdes ronds. Un fragment unique de 289 pb est amplifié à partir d'ARN extrait de spermatocytes pachytènes, spermatozoïdes ronds, tubes séminifères et ovaire de ratte. Une coloration 3 $\beta$ -HSD a été réalisée sur un aliquot de chaque fraction germinale; aucune contamination par les cellules de Leydig n'a été mise en évidence. La pureté de ces cellules est élevée, 90% pour les spermatocytes pachytènes et 95% pour les spermatozoïdes ronds. L'origine germinale de l'aromatase amplifiée ne fait aucun doute puisque Janulis *et al.*, 1996 et Levallet *et al.*, 1998 amplifient aussi, chez le rat adulte, le messager de l'aromatase à partir d'ARN issu de spermatocytes pachytènes et spermatozoïdes ronds [7,9].

Pour étudier la régulation du gène de l'aromatase, nous nous sommes posés la question de savoir si le TGF $\beta$  et le TNF $\alpha$  peuvent influencer la synthèse de l'ARNm de l'aromatase dans les cellules germinales purifiées. Le choix de ces facteurs s'imposait pour les raisons suivantes:

-le TGF $\beta$  est d'une part produit par les cellules de Sertoli et les cellules germinales [11]. Les récepteurs I et II de ce facteur ont été localisés dans les cellules somatiques mais aussi dans les cellules germinales: spermatocytes et spermatozoïdes [15]. D'autre part il a été démontré que le TGF $\beta$  inhibe l'aromatase sertolienne stimulée par la FSH [11].

-le TNF $\alpha$  est une cytokine sécrétée par les cellules de Sertoli et les cellules germinales surtout les spermatozoïdes ronds. Le TNF $\alpha$  a des actions diverses, il stimule la prolifération des cellules germinales primordiales et s'oppose à la production de l'aromatase dans les cellules de Sertoli [11], alors qu'il stimule l'expression du gène de l'aromatase dans les cellules adipeuses humaines [22].

Dans le but d'estimer le contenu en messager de l'aromatase dans les cellules germinales et d'analyser les effets du TGF $\beta$  et du TNF $\alpha$  sur l'expression du gène, nous avons employé une technique sensible, la RT-PCR quantitative compétitive. Nous avons observé une diminution de la quantité d'ARNm de l'aromatase en fonction de degré de maturation de la cellule germinale et cela inversement par rapport à l'activité enzymatique. Ceci est probablement dû à un décalage temporel au cours de la spermatogenèse entre l'expression des ARNm et l'apparition d'une protéine active; ce décalage favoriserait, au cours de la période prépubertaire, un rapport androgène / estrogène en faveur de la testostérone, indispensable pour la spermatogenèse.

La testostérone testée à une dose de 200ng/ml, stimule la synthèse d'ARNm de l'aromatase dans les deux types cellulaires étudiés. Cette observation confirme les données rapportées par Vornberger *et al.*, (1994) qui montrent la présence de récepteurs aux androgènes dans les cellules germinales du rat, suggérant ainsi que les androgènes régulent d'une manière directe la spermatogenèse [21] mais pourquoi pas aussi via la synthèse des estrogènes [9].

Nos résultats préliminaires montrent que la stimulation de l'expression de l'aromatase par la testostérone est abolie sous l'effet du TGF $\beta$  (1ng/ml) au niveau des spermatozoïdes ronds; cependant au niveau des spermatocytes pachytènes l'effet de ce facteur reste à déterminer. L'action du TGF $\alpha$  nécessite la coopération de deux types de récepteurs: le récepteur de type I et de type II. En effet, la liaison du TGF $\beta$  au récepteur de type II est insuffisante, ce dernier requiert le récepteur de type I pour que la transduction du signal ait lieu. Notre résultat obtenu coïncide avec l'augmentation du nombre de récepteurs de type I au stade des spermatozoïdes [15].

Quant à l'ajout du TNF $\alpha$  (10ng/ml) aux cellules incubées avec la testostérone, celui-ci induit une légère stimulation de l'expression de l'aromatase dans les spermatocytes pachytènes, alors qu'il inhibe cette expression dans les spermatides rondes. Cette faible réponse au TNF $\alpha$  dans les spermatocytes pachytènes soulève les questions suivantes:

-les récepteurs de cette cytokine sont-ils présents au niveau de la membrane cellulaire à ce stade de vie de la cellule germinale ?

-l'action du TNF $\alpha$  sur les spermatocytes pachytènes nécessiterait-elle la présence d'autres facteurs de croissance comme dans la cellule de Sertoli (EGF) [4] ?

Les cellules germinales sont capables de produire les estrogènes, mais aussi présentent des récepteurs aux estrogènes de type  $\beta$ . Les estrogènes réguleraient donc de manière autocrine (voire paracrine) la spermatogenèse, mais une sur-exposition aux estrogènes pourrait avoir des effets pathologiques [3].

Il apparaît donc intéressant de poursuivre l'étude de la régulation de l'expression du gène de l'aromatase, pour comprendre par quels mécanismes et selon quel mode les facteurs de croissance et les cytokines contrôlent la production des estrogènes d'une part, en fonction du développement de la gonade et d'autre part en relation avec le déroulement de la spermatogenèse.

## REFERENCES

- BELLVÉ A.R., CAVICCHIA J.C., MILLETTE C.F., O'BRIEN D.A., BHATNAGAR Y.M., DYM M.: Spermatogenic cells of the pubertal mouse. *J Cell Biol.* 1977 ; 74 : 68-85.
- BOITANI C., RITZEN E.M., PARVINEN M.: Inhibition of rat Sertoli cell aromatase by factor (s) secreted specifically at spermatogenic stages VII and VIII. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1981; 23: 11-22.
- CARREAU S., GENISSEL C., BILINSKA B., LEVALLET J.: Topical review : Sources of estrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Inter J Androl.* 1999 ; 22 : 211-223.
- CHAUVIN M.A., GUILLAUMOT P., MORERA A.M.: The epidermal growth factor receptor is required for tumor necrosis factor  $\alpha$  action on aromatase activity in Sertoli cells. *Testis Workshop 2000.*
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 ; 162 : 156-159.
- GAILLARD J.L., SILBERZAHN P.: Aromatization of 19-norandrogens by equine testicular microsomes. *J. Biol. Chem.* 1987 ; 262, 12 : 5717-5722.
- JANULIS L., BAHR J.M., HESS R.A., BUNICK D.: P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells : detection by reverse transcription polymerase chain reaction amplification. *J Androl.* 1996 ; 17 , 6 : 651-658.
- JANULIS L., BAHR J.M., HESS R.A., JANSSEN S., OSAWA Y., BUNICK D.: Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl.* 1998 ; 19, 1 : 65-71.
- 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.* 1998 ; 58 : 919-926.
- LEVALLET J., CARREAU S.: Expression in vitro du gène de l'aromatase dans les cellules testiculaires du rat. *C.R. Acad. Sci (Paris).* 1997; 320:123-129.
- MAUDUIT C., BENAHMED M.: Growth factors in the testis development and function. *Research in male gametes production and quality.* (Eds : S. Hamamah, R. Mieusset). 1996 ; 3-45.
- MEISTRICH M.L., LONGTIN J., BROCK W.A., GRIMES S.R., MACE M.C.: Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod.* 1981 ; 25 : 1065-1077.
- MICHAEL M.D., KILGORE M.W., MOROHASHI K., SIMPSON E.R.: Ad 4 BP / SF-1, regulates cyclic AMP induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP 19) gene in the ovary. *J.Biol.Chem.* 1995 ; 270, 22 : 13561-13566.
- NITTA H., BUNICK D., HESS R.A., JANULIS L., NEWTON S., MILLETTE C et al.: Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology.* 1993 ; 132 : 1396-1401.
- OLASO R., PAIRAULT C., HABERT R.: Expression of type I and II receptors for transforming growth factor  $\beta$  in the adult rat testis. *Histochem Cell Biol.* 1998 ; 110 :613-618.
- RAYAN K.J.: Biological aromatization of steroids. *J.Biol.Chem.* 1959 ; 234, 2 : 268-272.
- ROBERTSON K.M., O'DONNELL L., MEACHEM S.J., BOON W.C., FISHER C.R., GRAVES K.H., McLACHLAN R.I et al.: Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Poc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 7986-7991.
- ROMMERTS F.F.G., DE JONG F.H., BRINKMANN A.O., VAN DER MOLEN H.J.: Development and cel-

- lular localization of rat testicular aromatase activity. *J. Reprod.Fert.* 1982 ; 65 : 281-288.
19. SHETTY G., KRISHNAMURTHY H., KRISHNAMURTHY H.N.: Effect of longterm treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys. *Steroids*, 1998; 63: 414-420.
  20. SIMPSON E.R., MAHENDROO M.S., MEANS G.D., KILGORE M.W., HINSHELWOOD M.M., GRAHAM-LORENCE S et al.: Aromatase cytochrome P450 the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 1994; 15: 342-355.
  21. VORNBERGER W., PRINS G., MUSTO N.A., SUAREZ-QUIAN C.A.: Androgen receptor distribution in rat testis: New implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology.* 1994; 134, 5: 2307-2316.
  22. ZHAO Y., NICHOLS J.E., VALDEZ R., MENDELSON C.R., SIMPSON E.R.: Tumor necrosis factor- stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promotor I.4. *Mol.Endocrinol.* 1996 ; 10, 11 : 1350-1357.

by RT-PCR that germ cells express a specific aromatase mRNA. In addition the preliminary results obtained using a competitive RT-PCR method show that testosterone enhances the expression of aromatase in the two germ cell populations. That increase of aromatase transcripts is reduced when spermatids are incubated with TGF $\beta$ . Conversely the addition of TNF $\alpha$  further enhances the aromatase transcription in pachytene spermatocytes whereas an inhibitory effect is observed with spermatids. Therefore, in rodent testes, meiotic and post-meiotic germ cells represent an additional source of estrogens; together with existence of estrogen receptors (ER $\beta$ ) on these cells these data likely suggest an estrogenic control of the spermiogenesis in some mammals.

**Key words** : aromatase, estrogens, pachytene spermatocyte, round spermatid, RT-PCR, aromatase mRNA, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ .

## ABSTRACT

### Regulation of the aromatase gene expression in adult male rat germ cells: effects of TGF $\beta$ and TNF $\alpha$

S. BOURGUIBA, C.GENISSEL, M.BENAHMED\*,  
et S.CARREAU.

The testicular functions are mainly under gonadotropins control but locally - produced factors, such as growth factors, cytokines and steroid hormones are also concerned to optimize the spermatogenesis. The ability of the male gonad to transform irreversibly androgens into estrogens is known and related to the presence of aromatase. In the rat testis besides Sertoli and Leydig cells, the germ cells have the capacity to produce estrogens but the regulation of the aromatase gene expression is poorly understood. The aim of our work was to study the putative effects of TGF $\beta$  and TNF $\alpha$  on the aromatase expression in purified adult rat germ cells. Pachytene spermatocytes and round spermatids have the capacity to produce estrogens (the enzyme activity is 5-fold higher in haploid germ cells). Using specific primers we have shown