

# Mise en évidence des transcrits du cytochrome P450 aromatase dans les spermatozoïdes humains éjaculés.

S. LAMBARD<sup>1</sup>, I. GALERAUD-DENIS<sup>1,2</sup>, S. CARREAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimie-IRBA, UPRES EA 2608, Université de Caen et <sup>2</sup>Unité FIV, CHRU Clémenceau de Caen.

## RESUME

La conversion irréversible des androgènes en estrogènes est liée à l'existence d'un complexe enzymatique microsomial : le cytochrome P450 aromatase. Chez les mammifères, la présence de cette protéine dans le testicule est depuis longtemps établie. En effet, les ARNm codant pour le cytochrome P450 aromatase (P450arom), ainsi qu'une activité enzymatique ont été détectés non seulement dans les cellules somatiques du testicule (cellules de Sertoli et cellules de Leydig), mais également dans les cellules germinales de nombreuses espèces. Chez l'homme, la présence intracellulaire d'estrogènes et la mise en évidence d'un récepteur pour ces hormones sont autant de données permettant d'envisager les spermatozoïdes comme des cellules cible et/ou des cellules source d'estrogènes. Le but de notre travail a donc été d'étudier la possibilité pour les spermatozoïdes humains de synthétiser des estrogènes en recherchant d'une part, la présence de transcrits codant pour le P450arom et d'autre part, en mesurant les taux intracellulaires d'estradiol. Des ARNr 18 S et 28 S ont été mis en évidence dans 10 des 14 échantillons de spermes étudiés provenant de patients normospermes. A l'aide

d'amorces spécifiques, nous avons détecté par RT-PCR (transcription inverse associée à une polymérisation en chaîne) l'ARNm de l'aromatase dans trois échantillons, alors que tous expriment l'ARNm codant pour la GAPDH. Une "semi-nested-PCR" nous a alors permis de confirmer la présence de transcrits de l'aromatase dans les échantillons où le signal n'était pas visible en première PCR. Les taux intracellulaires d'estrogènes dans le spermatozoïde humain varient de 47 à 222 fmol/éjaculat et sont en accord avec ceux précédemment publiés. En conclusion, nous rapportons pour la première fois la présence de messagers codant pour le P450arom dans le spermatozoïde humain, et la possibilité de leur traduction en protéine biologiquement active.

**Mots clés :** Aromatase, spermatozoïde humain, estrogènes, RT-PCR.

**Correspondance :** S. Carreau, Biochimie-IRBA, UPRES EA 2608, Université de Caen, Esplanade de la Paix, 14032 Caen cedex. Tél : 02 31 56 54 88 ; Fax : 02 31 56 53 20 ; E-mail : carreau@ibba.unicaen.fr

Prix de DEA décerné par la Société d'Andrologie de Langue Française.

Présentation au XVIIème Congrès de la SALF, 7-8 décembre 2000, Bordeaux.

## I. INTRODUCTION

Les estrogènes, hormones stéroïdes synthétisés dans la plupart des tissus, apparaissent comme des modulateurs essentiels dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques. Les estrogènes ont longtemps été considérés comme des hormones typiquement féminines, mais la production de ces stéroïdes par le testicule de mammifères est maintenant clairement établie [pour revue, 4]. La transformation irréversible des androgènes en estrogènes est catalysée par un complexe enzymatique constitué de deux entités : le cytochrome P450 aromatasase (P450arom), spécifique de la liaison du stéroïde et une flavoprotéine ubiquiste, le NADPH cytochrome P450 réductase. L'aromatase est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique et est codée chez l'homme par le gène *CYP 19*, situé sur le chromosome 15. Ce gène *CYP 19* est composé de 9 exons codants et de huit exons non-codants ; ces 8 exons constituent l'exon I et sont transcrits de manière tissu spécifique [38]. Chez le rat, le P450arom a été mis en évidence par immunohistochimie dans les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli, les cellules germinales [22], ainsi que dans les spermatozoïdes testiculaires [20]. Ces observations sont retrouvées chez la souris ainsi que chez d'autres mammifères, tels le campagnol et l'ours [3, 20-22, 28, 40]. Bien que la présence d'estrogènes au sein du testicule de mammifères soit clairement établie, le rôle de ces hormones dans le tractus génital mâle reste encore mal connu. Il est clair que la synthèse d'estradiol existe dans les cellules germinales, et que des récepteurs aux estrogènes (surtout de type  $\beta$ ) sont présents dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales [42], ce qui permet de supposer un rôle des estrogènes dans la spermatogenèse et dans le dialogue cellules de Sertoli-cellules germinales chez le rat. Des souris déficientes en aromatasase (souris ArKO) présentent une spermatogenèse altérée avec une diminution du nombre de spermatozoïdes ronds et allongés et des spermatozoïdes avec des acrosomes anormaux [33], suggérant une intervention des estrogènes lors de la spermiogenèse. L'administration d'un inhibiteur de l'aromatase chez le singe [37] et le rat [41] conduit aux mêmes observations que chez les

ArKO. Chez la souris, l'activité aromatasase est maximale au niveau des spermatozoïdes situés dans la tête de l'épididyme [21] et des récepteurs nucléaires aux estrogènes sont présents dans les cellules épithéliales de l'épididyme [10]. Les souris  $\alpha$ ERKO (souris dont le gène codant pour le récepteur aux estrogènes de type  $\alpha$  est inactivé) sont infertiles suite à une diminution de la réabsorption du fluide testiculaire, entraînant une compression des tubes séminifères. Ces observations sont donc en faveur d'un rôle des estrogènes dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes. Chez l'homme, les données sur l'aromatase et le rôle des estrogènes dans la reproduction sont encore très fragmentaires le P450 arom a été immunolocalisé dans les cellules de Leydig d'adultes [19] et ne activité aromatasase a été retrouvé dans ce même type cellulaire [29]. Par ailleurs, des récepteurs nucléaires aux estrogènes de types  $\alpha$  et  $\beta$  ont été mis en évidence au niveau des spermatocytes pachytènes et des spermatozoïdes ronds [13, 30], ainsi que dans le noyau des cellules épithéliales de l'épididyme [14]. De plus, la découverte récente d'une protéine membranaire liant l'estradiol dans le spermatozoïde humain [23], ainsi que la présence intracellulaire d'estrogènes [8] laissent supposer un rôle possible de ces hormones dans le spermatozoïde humain. Le but de notre travail a donc été d'étudier la capacité des spermatozoïdes humains éjaculés à produire des estrogènes.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. ECHANTILLONS

Les spermatozoïdes (n=14 ; moyenne d'âge=33,6±1,7 ans) ont été obtenus par masturbation après un délai d'abstinence sexuelle variant de trois à cinq jours, et ont subi une liquéfaction pendant 30 à 60 min à température ambiante. Les spermatozoïdes retenus avaient des paramètres spermatozoïdiques normaux (concentration > 20.10<sup>6</sup>/ml, mobilité > 40%, pourcentage de formes typiques > 30%). Les spermatozoïdes infectés et ceux avec plus de 5 % de cellules ronds ont été exclus. Les échantillons de sperme ont été traités immédiatement et individuellement ; après deux lavages dans du milieu Earle, les culots cellulaires ont été utilisés pour l'extraction

d'ARN. Des cellules de granulosa humaines (témoin positif pour l'aromatase) ont été obtenues à partir de ponctions ovariennes au laboratoire FIV ; des cellules de la lignée E293 (lignée cellulaire de rein embryonnaire humain), cultivées au laboratoire, ont été utilisées comme témoin négatif pour l'aromatase.

## 2. EXTRACTION DES ARN

Les ARN de spermatozoïdes, de cellules de la granulosa et de la lignée E293 ont été extraits par une méthode dérivée de celle de Chomczynski et Sacchi [9]. Brièvement, le culot de cellules est dissout dans une solution de lyse (thiocyanate de guanidium 4M, 0.5% de sarcosyl, 1% de Tris 1M, 1% de mercaptoéthanol). L'homogénat est placé dans un bain-marie glacé et un mélange d'acétate de sodium (pH : 4), de phénol, de chloroforme/alcool isoamylique (1/10/2) est ajouté. Après centrifugation (4000 rpm, 10 min, 4°C), la phase aqueuse est reprise avec de l'isopropanol. Deux précipitations pendant 30 min à -80°C sont effectuées, puis le culot d'ARN (récupéré après centrifugation) est resuspendu dans de l'éthanol à 75%, séché et dissout dans de l'eau traitée au DEPC ; les ARN sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. L'évaluation quantitative et qualitative des ARN est déterminée par une mesure de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm. L'intégrité des ARN est analysée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 % ; les bandes d'ARN ribosomiaux 18 S et 28 S sont visualisées sous UV à 254 nm.

## 3. TRANSCRIPTION INVERSE-POLYMERISATION EN CHAÎNE (RT-PCR)

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

Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques. Deux types de messagers vont être amplifiés : les messagers du P450arom (par PCR et par "semi-nested"-PCR) et ceux de la glyceraldé-

hyde-3-phosphate (GAPDH), afin de comparer le taux de messagers de l'aromatase à ceux de la GAPDH, puisque ces derniers sont supposés être présents en quantité constante. L'amplification des ARNm codant pour le P450arom est réalisée pendant 30 cycles (1 min à 94°C, 1 min à 60°C, et 2 min 30 avec 2 sec d'incrémentation à chaque cycle) en présence de 200 µM de dNTP, 30 pmol d'amorces, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1,5 UI de *Taq* polymérase dans un volume final de 50 µl. Les amorces du P450arom sont choisies afin d'amplifier une séquence hautement conservée de 293 pb incluant les régions hélicales et d'aromatase situées entre les exons IX et X (respectivement 5' ARO : 5'TGA ATA TTG GAA GGA TGC ACA GAC T 3' en position 1304-1328 et 3' ARO : 5' GGG TAA AGA TCA TTT CCA GCA TGT 3' en position 1574-1597). La "semi-nested"-PCR se déroule dans les mêmes conditions que la PCR précédente avec un couple d'amorces inclus dans le premier couple d'amorces utilisé (respectivement 5' nARO : 5' TGA ATA TTG GAA GGA TGC ACA GAC T 3' en position 1304-1328 et 3' nARO : 5' TGG AAT CGT CTC AGA AGT GTA ACG AG 3' en position 1468-1493). Les conditions de PCR pour la GAPDH sont 95°C pendant 1 min, 60°C pendant 1 min, 72°C pendant 1 min 30, 30 cycles en présence de 25 pmol d'amorces (CG5 : 5' TGA ACG GGA AGC TCA CTG GCA TGG CCT T 3' en position 730-758 et CG3 : 5' GTG TGG TGG GGG ACT GAG TGT GGC AGG GAC 3' en position 1132-1162). Tous les fragments d'ADNc sont visualisés sous UV à 254 nm, grâce au bromure d'éthidium.

## 4. SÉQUENÇAGE

Les séquences d'ADN ont été déterminées par la méthode de Sanger [36], en utilisant le kit DNA sequencing (Biosystems). Les produits de RT-PCR sont amplifiés par une seconde PCR pendant 30 cycles aux mêmes conditions que précédemment en utilisant le même couple d'amorces. Le marquage des fragments d'extension est réalisé en 3' par incorporation de didéoxynucléotides fluorescents.

## 5. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Les microsomes ont été préparés à partir de

suspensions de spermatozoïdes soniqués. L'activité aromatase est mesurée par la libération d'une molécule d'eau tritiée lors de l'aromatase d'une molécule de  $1\beta$  [ $^3\text{H}$ ]andros-4-ène-3,17-dione (NEN). 500  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-maléate (50 mM, pH : 7,4) et 100  $\mu\text{l}$  de  $1\beta$  [ $^3\text{H}$ ]androst-4-ène-3,17dione (20000 dpm/ $\mu\text{l}$ ) sont ajoutés à la préparation de microsomes. La réaction est initiée par l'addition de 10 mM de NADPH. Les fractions microsomiales sont incubées dans un bain-marie à 34°C pendant une heure puis la réaction est stoppée par l'ajout de deux volumes de chloroforme. La  $1\beta$  [ $^3\text{H}$ ]androst-4-ène-3,17-dione non convertie est adsorbée par 500  $\mu\text{l}$  de charbon (7%) contenant du dextran (1.5%). Les tubes sont maintenus à 4°C puis centrifugés 10 min à 4000 rpm et la radioactivité d'un aliquot de la phase aqueuse est alors comptée en scintillation liquide. Les valeurs des blancs sont obtenues lors d'incubations identiques en absence de NADPH. Des fractions de microsomes de cellules de granulosa ont été utilisées comme témoin positif.

## 6. DOSAGE RIA DE L'ESTRADIOL

Les stéroïdes sont extraits des spermatozoïdes par 5 volumes de diéthyléther. Les concentrations en estradiol sont déterminées par dosage radioimmunologique en utilisant un anticorps hautement spécifique de l'estradiol.

L'anticorps, pour une valeur de liaison à 50%, présente une réaction croisée significative avec les stéroïdes suivants : 2 méthoxy-estradiol : 5%,  $\alpha$ -estradiol : 0,28%, estrone : 0,45%, estriol : 0,45%. La sensibilité du dosage est de 6 pg/tube et les coefficients de variations intra et inter-dosages sont inférieurs à 10 %.

## III. RESULTATS

### 1. IDENTIFICATION DES ARN RIBOSOMIAUX 18 S ET 28 S

L'analyse de l'ARN total extrait des cellules de la granulosa et des spermatozoïdes a été réalisée après électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % et marquage au bromure d'éthidium (figure 1). Les deux types cellulaires montrent deux bandes distinctes correspondant aux ARN ribosomiaux 18 S et 28 S. La présence d'ARN 18 S

et 28 S est observée dans 10 des 14 échantillons de sperme. Dans les spermatozoïdes, l'intensité du marquage au bromure d'éthidium est moins intense pour la bande 28 S.

### 2. AMPLIFICATION DES MESSAGERS DE LA GAPDH

Afin de vérifier la présence en quantité constante d'ARN dans les échantillons, une amplification des messagers de la GAPDH a été réalisée sur tous les prélèvements testés pour l'aromatase. L'amplification est positive dans tous les échantillons, le signal se situe à 431 pb et est d'une même intensité pour tous les spermatozoïdes, excepté pour un échantillon (colonne 4) (figure 2).

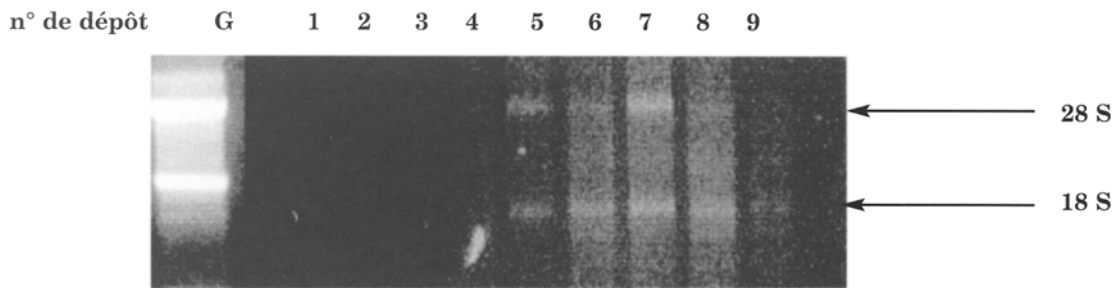
### 3. IDENTIFICATION DES TRANSCRITS DU CYTOCHROME P450AROMATASE DANS LES SPERMATOZOÏDES

L'étude par RT-PCR nous a permis de détecter un signal dans trois échantillons d'ARN extraits à partir de 14 donneurs différents. Sa taille de 293 pb correspond à celle attendue avec les amorces utilisées et ce signal est similaire à celui observé avec les cellules de la granulosa (figure 3). Une bande a pu être détectée sous U.V dans six autres échantillons, mais le signal était toujours trop faible pour être visualisable en photo. Enfin, cinq échantillons ne montraient aucun signal. Ce dernier résultat nous a amené à tester ces échantillons en "semi-nested"-PCR afin de confirmer ou non l'absence de transcrits du P450arom dans ces spermatozoïdes. Les résultats obtenus en "nested"-PCR confirment la présence de messagers du P450arom dans tous les échantillons testés (figure 4).

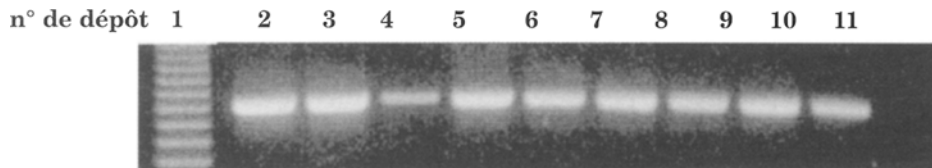
Pour s'assurer de l'identité du fragment amplifié, les produits de PCR provenant des échantillons 2, 4 et 5 (figure 3) ont été séquencés. L'alignement des séquences des produits de PCR des spermatozoïdes et des cellules de la granulosa avec les séquences publiées du cytochrome P450 aromatase humain [11] est identique excepté pour quelques bases non identifiées.

### 4. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

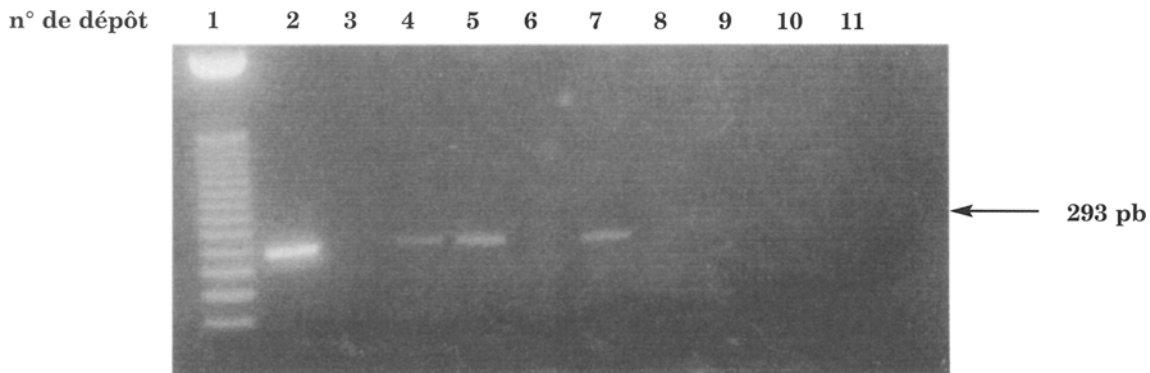
La quantité de protéines extraites à partir des cellules de la granulosa est soixante fois plus importante que celle extraite à partir des sper-



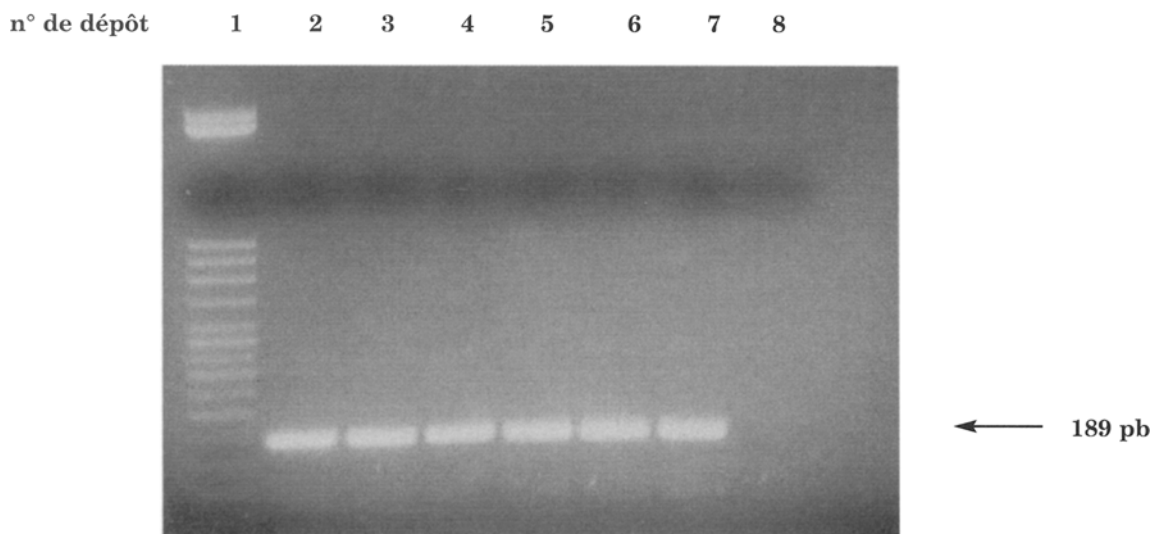
**Figure 1 :** G : ARN extraits à partir de cellules de la granulosa ; 1-9 : ARN extraits à partir de spermatozoïdes humains de donneurs différents présentant des paramètres spermatiques normaux.



**Figure 2 :** Expression des messagers codant pour la GAPDH. 1 : standard de taille (50 pb) ; 2 : 750 ng d'ARN extraits de cellules de la granulosa ; 3 : 750 ng d'ARN de cellules de la lignée E 293; 4-10 :750 ng d'ARN de spermatozoïdes humains ; 11 : contrôle interne.



**Figure 3 :** Expression des transcrits codant pour le cytochrome P450aromatase. 1 : standard de taille (50 pb) ; 2 : 750 ng d'ARN de cellules de la granulosa ; 3 : 750 ng d'ARN de cellules de la lignée E 293; 4-10 : 750 ng d'ARN de spermatozoïdes humains ; 11 : contrôle interne.



**Figure 4 :** Recherche par "semi-nested"-PCR des ARNm codant pour le cytochrome P450 aromatase dans les spermatozoïdes humains. 1 : standard de taille ; 2-6 : spermatozoïdes humains ; 7 : cellules de la granulosa ; 8 : contrôle interne.

matozoïdes. Une activité aromatasase évaluée à 230 fmol/mg de protéine/heure a été mesurée dans un seul échantillon. Etant donnée la trop faible quantité de protéines obtenues, la mesure de cette activité pour le suivi individuel des patients s'avère très difficile.

## 5. CONCENTRATIONS INTRACELLULAIRES D'ESTRADIOL

Des lysats de suspensions de spermatozoïdes provenant de sept patients différents ont été utilisés pour mesurer le taux intracellulaire d'œstradiol. Ces spermatozoïdes contiennent des taux d'œstradiol variant de 47 à 222 fmol/éjaculat. Exprimés en fmoles par  $10^8$  spermatozoïdes, les concentrations d'œstradiol varient de 10 à 37 fmoles (figure 5).

## IV. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois la présence d'ARNm codant pour le cytochrome P450 aromatasase dans différents échantillons de spermatozoïdes humains éjaculés. Nous avons également mis en évidence la présence de deux bandes distinctes d'ARN 18 S et 28 S dans ces échantillons de spermes, bien que l'intensité du marquage soit plus faible que dans les cellules somatiques. Comme les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes, il n'est pas surprenant que les ARN 18 S et 28 S soient en concentration moins importante que dans les autres types cellulaires. Les données dont nous disposons sur les ARN ribosomiaux dans le spermatozoïde humain sont rares. Seul Betlach *et al.* [2] décrivent la présence d'ARNr en faible quantité dans des ARN totaux extraits à partir d'un seul sperme. Plus récemment, l'équipe de Miller *et al.* [26] a noté l'absence de 18 S et 28 S dans des ARN totaux extraits à partir d'un pool de spermatozoïdes humains. Cependant, les résultats obtenus ici ne sont pas pour autant contradictoires, les ARN 18 S et 28 S pouvant être masqués ou en trop faible quantité pour être détectés.

La difficulté d'analyser les ARN par RT-PCR dans le spermatozoïde humain réside dans l'obtention d'ARN en quantité suffisante afin d'amplifier les transcrits du cytochrome P450

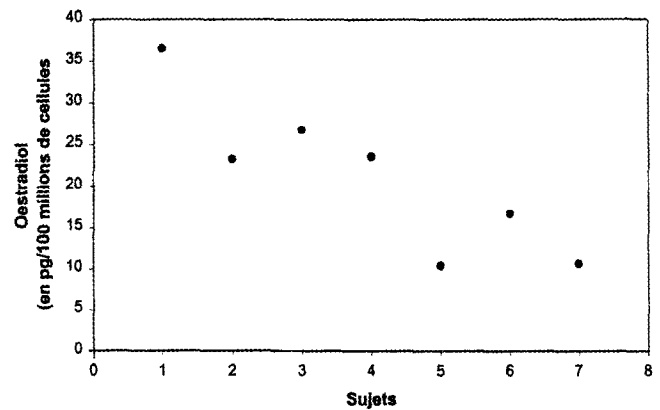


Figure 5 : Concentrations intracellulaires d'œstradiol exprimées en fmol/ $10^8$  spermatozoïdes humains ( $n=7$ ).

aromatasase. La présence d'autres ARNm dans le spermatozoïde humain éjaculé avait déjà été rapportée pour le gène des protamines 2 [25], des phosphodiesterases [32], des récepteurs à la progestérone [35]. Ces travaux avaient été réalisés soit sur des pool de spermatozoïdes de donneurs différents soit sur des spermes traités individuellement en nested-PCR [34]. Tout récemment, l'équipe de Goodwin *et al.* a pu détecter des ARNm codant pour les N-cadhérines et la sous-unité  $\alpha$  1C des canaux calciques sur des échantillons traités individuellement [15, 16]. Cependant, en utilisant une méthode au dodécyl sulphate de sodium/citrate, Goodwin *et al.* [16] ont obtenu un taux d'ARN total plus faible que la valeur estimée de 0,07 pg d'ARN par spermatozoïde rapportée par Pessot *et al.* [31] et la concentration de 0,14 pg par spermatozoïde que nous avons obtenu en utilisant une méthode d'extraction au thiocyanate de guanidium/alcool isoamylique.

Nous avons choisi de rechercher les ARNm codant pour la GAPDH pour vérifier la présence d'ARN en quantité constante, puisque nous n'avons pas pu détecter les transcrits codant pour la  $\beta$ -actine, tout comme Goodwin *et al.* l'ont récemment rapporté [15].

Il reste donc maintenant à connaître la signification biologique de ces transcrits. Lors de la maturation des spermatocytes en spermatozoïdes, les histones, autour desquelles s'enroule l'ADN, sont remplacées par des protamines. La chromatine se trouve alors trop condensée pour pouvoir être transcrite. Cependant, 15 %

de cette chromatine reste liée aux histones et ces 15 % pourraient alors être transcrits en ARNm [39]. Mais jusqu'à présent, rien n'est clairement établi concernant les ARNm du spermatozoïde : sont-ils synthétisés à une étape antérieure de la spermatogenèse et ensuite stockés sous forme de ribonucléoprotéines ou sont-ils les produits d'une synthèse active au sein du spermatozoïde? L'équipe de Miller *et al.* [24] a mis en évidence des éléments SINE, LINE et ALU, qui, selon lui, seraient les traces d'une traduction très active lors de la spermatogenèse. Cependant, un traitement avec de l'actinomycine D bloque complètement la transcription dans le spermatozoïde humain et un traitement avec le cycloheximide réduit fortement la traduction [27], ce qui laisse supposer la possibilité d'activités transcriptionnelle et traductionnelle dans le spermatozoïde humain pendant la capacitation et la réaction acrosomique.

La quantité de protéines microsomiales obtenue avec des échantillons de spermatozoïdes traités individuellement ne permet pas la mesure de l'activité enzymatique. Par contre, la mesure des taux intracellulaires d'estradiol est un moyen d'étude supplémentaire pour estimer la capacité stéroïdogène des spermatozoïdes. Nos premiers résultats sont en accord avec ceux publiés par Chew *et al.* [8], qui rapportent un taux intracellulaire d'estradiol variant d'un patient à un autre (33 à 678 fmol/éjaculat). Ces observations sont corroborées avec des travaux plus anciens rapportés par Castadena *et al.* [5] et Gunasegaram *et al.* [17], démontrant l'existence de voies stéroïdogènes dans le spermatozoïde humain.

La mise en évidence de transcrits spécifiques du gène de l'aromatase dans le spermatozoïde humain pose maintenant le problème du rôle physiologique de ces messagers, par conséquent celui de l'aromatase et des estrogènes. L'expression d'ARNm codant pour le cytochrome P450 aromatase et la présence d'estradiol endogène, permettent d'envisager le spermatozoïde humain comme une potentielle source d'estrogènes. Nous ne disposons actuellement que de quelques données sur les estrogènes et les spermatozoïdes humains. Récemment, un récepteur aux estrogènes non typé et non loca-

lisé [12], ainsi qu'une protéine membranaire liant les estrogènes à la surface du spermatozoïde humain [23] ont été découverts. Le seul effet connu des estrogènes sur les spermatozoïdes humains est une augmentation de la mobilité lorsque ceux-ci sont incubés *in vitro* avec de l'estradiol [1, 7]. En présence de citrate de clomiphène et de tamoxifène, les effets précédemment décrits sont abaissés [6].

Des études complémentaires sur l'expression de l'aromatase et sa localisation cellulaire à la fois dans des spermés normaux et pathologiques devraient nous aider à comprendre si les estrogènes du spermatozoïde ont un rôle non seulement au niveau du tractus génital mâle, mais aussi dans les phases ultérieures, à savoir la capacitation et la survie des spermatozoïdes.

### Remerciements

Nous remercions le Dr Anne Chocat, ainsi que Mlle Sonia Bourguiba pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

### REFERENCES

1. BECK K.J., HERSCEL S., HUNGERSHOFER R., SCHWINGER E. : The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X- and Y-bearing human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1972, 27 : 407-412.
2. BETLACH C.J., ERICKSON R.P. : 28 S et 18 S ribonucleic acid from mammalian spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 1978, 198 : 49-56.
3. BILINSKA B., SCHMALZ-FRACZEK B., SADOWSKA J., CARREAU S. : Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in testicular cells-an immunohistochemical study of the blank vole. *Acta Histochem.*, 2000, 102 : 167-181.
4. CARREAU S., GENISSEL C., BILINSKA B., LEVALLET J. : Sources of oestrogens in the testis and reproductive tract of the male. *Int. J. Androl.*, 1999, 22 : 211-223.
5. CASTADENA E., RIOS E., PEREZ A.E. *et al.* : In vitro biotransformation of steroid hormones by human semen. *Fertil. Steril.*, 1974, 25 : 261-270.
6. CHAN S.Y.W., WANG C.C.L., TANG L.C.H. : Effect of clomiphene citrate on human spermatozoa motility and fertilizing capacity in vitro. *Fertil. Steril.*, 1985, 43 : 773-776.
7. CHENG C.Y., BOETTCHE B. : The effect 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.
8. CHEW P.C.T., LOGANATH A., PEH K.L., CHOW W.P., GUNASEGARAM R., RATNAM S.S. : Concentrations of intracellular sex steroids in human spermatozoa. *Arch. Androl.*, 1993, 30 : 165-170.
  9. CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. : Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, 162 : 156-159.
  10. COOKE P.S., YOUNG P., HESS R.A., CUNHA G.R. : Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs. *Endocrinology*, 1991, 128 : 2874-2879.
  11. CORBIN C.J., GRAHAM-LORENCE S., MCPHAUL M., MASON I.J., MENDELSON C.R., SIMPSON E.R. : Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85 : 9848-9852.
  12. DURKEE T.J., MUELLER M., ZINAMAN M. : Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998 : 178, 1288-1297.
  13. ENMARK E., PELTO-HUIKKO M., GRANDIEN K. et al. : Human oestrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, 82 : 4258-4265.
  14. ERGÜN S., UNGERFROREN H., HOLSTEIN A.F., DAVIDOFF M.S. : Estrogen and progesterone receptors and estrogen receptor-related antigen (ER-D5) in human epididymis. *Molec. Reprod. Develop.*, 1997, 47 : 448-455.
  15. GOODWIN L.O., KARABINUS D.S., PERGOLIZZI R.G. : Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 6 : 487-497.
  16. GOODWIN L.O., KARABINUS D.S., PERGOLIZZI R.G., BENOOFF S. : L-type voltage-dependent calcium channel  $\alpha$ -1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 2 : 127-136.
  17. GUNASEGARAM R., CHEW P.C.T., LOGANATH A., PEH K.L., RATNAM S.S. : A  $\Delta^4$ -3-keto pathway for testosterone synthesis in the human spermatozoa. *Arch. Androl.*, 1995, 40 : 49-57.
  18. IDAOMAR M., GUERIN J.F., LORNAGE J., MONCHAMONT P., CZYBA J.C. : Effects of oestradiol and its antagonist-tamoxifen on motility and metabolism of human spermatozoa. *Adv. Contracept.*, 1987, 3 : 337-341.
  19. INKSTER S., YUE W., BRODIE A. : Human testicular aromatase : immunocytochemical and biochemical studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 80 : 1941-1947.
  20. 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 : 65-71.
  21. JANULIS L., HESS R.A., BUNICK D. et al. : Mouse epididymal sperm contains active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J. Androl.*, 1996, 17 : 111-116.
  22. LEVALLET J., BILINSKA B., MITTRE H., GENISSEL C., FRESNEL J., CARREAU S. : Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in rat testicular cells. *Biol. Reprod.*, 1998, 58 : 919-926.
  23. 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.
  24. MILLER D., BRIGGS D., SNOWDEN H. et al. : A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa : implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene*, 1999, 237 : 385-392.
  25. MILLER D., TANG P., SKINNER C., LILIFORD R. : Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression. *Hum. Reprod.*, 1994, 9 : 864-869.
  26. MILLER D., WHITTON K., KRAWETZ S.A., WYKES S. : Molecular analysis of human spermatozoa : Potential for infertility research. 11<sup>th</sup> European Testis Workshop on molecular and cellular endocrinology of the testis. St-Malo, 2000, F 10.
  27. NAZ R.K. : Effect of actinomycin D and cycloheximide on human sperm function. *Arch. Androl.*, 1998, 41 : 135-142.
  28. NITTA H., BUNICK D., HESS R.A. et al. : Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*, 1993, 132 : 1396-1401.
  29. PAYNE A.H., KELCH R.P., MUSICH S.S., HALPERN M.E. : Intratesticular site of aromatization in the human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1976, 42 : 1081-1087.
  30. PENTIKÄINEN V., REKKILÄ K., SUOMALAINEN L., PARVINEN M., DUNKEL L. : Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85 : 2057-2067.
  31. PESSOT C.A., BRITO M., FIGUEROA J., CONCHA I., YANEZ A., BURZIO L.O. : Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1989, 158 : 272-278.
  32. RICHTER W., DETTMER D., GLANDER H.J. : Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 732-736.
  33. ROBERTSON K.M., O'DONNELL L., JONES M.E.E.



- et al.* : Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96 : 7986-7991.
34. ROHWEDDER A., LIEDIGK O., SCHALLER J., GLANDER H.J., WERCHAU H. : Detection of mRNA of  $\beta_1$  integrins in ejaculated human spermatozoa by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. Mol. Hum. Reprod., 1996, 2 : 499-505.
  35. SACHDEVA G., SHAH C.A., KHOLKUTE D.S., PURI C.P. : Detection of progesterone receptor transcripts in human spermatozoa. Biol. Reprod., 2000, 62 : 1610-1614.
  36. SANGER F., NICKLEN S., COULSON R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74 : 5463-5467.
  37. SHETTY G., KRISHNAMURTHY H., KRISHNAMURTHY H.N., BHATNAGAR A.S., MOUDGAL N.R. : Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). Steroids, 1998, 63 : 414-420.
  38. SIMPSON E.R., ZHAO Y., AGARWAL V.R. *et al.* : Aromatase expression in health and disease. Rec. Prog. Horm. Res., 1997, 52 : 185-210.
  39. TANPHAITCHITIR N., SOBHON P., TALUPPETH N., CHALERMISARACHAI P. : Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. Exp. Cell Res., 1978, 117 : 347-356.
  40. TSUBOTA T., NITTA H., OSAWA Y. *et al.* : Immunolocalization of steroidogenic enzymes, P450<sub>scc</sub>,  $\beta$ -HSD, P450<sub>c17</sub>, and P450<sub>arom</sub> in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) testis. Gen. Comp. Endocrinol., 1993, 92 : 439-444.
  41. TSUTSUMI I., FUGIMORI F., NAKAMURA MATHUU J.P., ONO T., DIZEREGA G.S. : Disruption of seminiferous epithelial function in the rat by ovarian protein. Biol. Reprod., 1987, 36 : 451-461.
  42. VAN PELT A.M.M., DE ROOIJ D.G., VAN DER BURG B., VAN DER SAAG P.T., GUSTAFSSON J.A., KUIPER G.G.J.M. : Ontogeny of estrogen receptor- $\beta$  expression in rat testis. Endocrinology, 1999, 140 : 478-483.

## ABSTRACT

### Expression of P450 aromatase transcripts in ejaculated human spermatozoa.

S. LAMBARD, I. GALERAUD-DENIS,  
S. CARREAU

**The conversion of androgens into estrogens is catalyzed by the cytochrome P450 aromatase. The presence of this protein within the mammalian testis has now been clearly established, as mRNA coding for aromatase and P450 aromatase activity have been detected in somatic cells (Sertoli cells and Leydig cells) and in germ cells in the testis of various species. Conversely, very limited data on aromatase in testicular cells are available in men. It has been shown that human spermatozoa are able to synthesize not only androgens but also, to a lesser extent, estrogens. It has also been reported that the sperm membrane contains an estrogen-receptor-related protein that is able to bind steroids. The ability of human spermatozoa to convert androgens into estrogens has been studied using two approaches: (1) detection of specific aromatase (P450<sub>arom</sub>) transcripts and (2) measurement of endogenous estradiol. Total RNA was extracted from individual ejaculates of normospermic patients using a guanidium isothiocyanate-isoamyllic acid method. The presence of 18 and 28 S rRNA was detected on 1.5% agarose gel containing ethidium bromide in 10/14 patients. Three responses were observed when sperm mRNA was used as template in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with P450<sub>arom</sub> specific primers: 1) presence of the expected 293 bp PCR product (3/14), 2) detection of a weak signal by UV absorbance (6/14) and 3) no visible staining (5/14). However, all samples expressed transcripts for a housekeeping gene, human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Sequence alignments from PCR products of spermatozoa and granulosa cells with the published human P450<sub>arom</sub> sequence are identical except for certain unidentified bases. We confirmed the presence of P450 aromatase transcripts by nested-PCR in patients without a positive P450<sub>arom</sub> mRNA signal on the first PCR. Intracellular estradiol concentrations in human spermatozoa are in the range of 47-222 fmol per ejaculate. These data demonstrate, for the first time, the presence of P450<sub>arom</sub> gene specific PCR products likely coding for a biologically active enzyme in ejaculated human spermatozoa.**

**Key words:** Aromatase, human spermatozoa, estrogens, RT-PCR.