

Les sources d'estrogènes

Serge CARREAU, Sonia BOURGUIBA, Isabelle DENIS-GALERAUD, Sophie LAMBARD

Biochimie, EA 2608-USC INRA, Université de Caen

RESUME

Le cytochrome P450 aromatasase (P450arom) est l'enzyme qui est responsable de la transformation irréversible des androgènes en estrogènes. Chez l'homme le P450arom est le produit d'un gène unique *CYP19* localisé sur le chromosome 15 dans la bande q21.1, c'est l'un des plus longs (environ 120 kb) parmi ceux codant pour des enzymes stéroïdiens. Il est composé de 18 exons dont 9 sont codants ; ce gène est singulier car il renferme au moins 8 exons non traduits tous situés dans l'extrémité 5' et épissés après leur transcription en aval d'autant de promoteurs dits « tissu-spécifiques ». Les éléments régulateurs diffèrent d'un promoteur à l'autre et l'expression du gène dépend donc de l'environnement cellulaire. 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. Dans le testicule du rat mature, l'expression de l'aromatase est contrôlée par les promoteurs II et I.4. Le taux de transcrits du P450arom est 2 fois plus élevé dans les spermatocytes pachytènes que dans les spermatides rondes alors que la bioactivité de la protéine évolue en sens inverse (elle est 4-5 fois plus importante dans les spermatozoïdes que dans les cellules plus jeunes). Très récemment nous avons démontré que les spermatozoïdes éjaculés chez l'homme renferment une aromatase avec des taux d'ARNm qui varient en fonction de la qualité du spermatozoïde : la quantité de messagers est diminuée de 30% dans les cellules immobiles. Si la testostérone est le médiateur principal du développement testiculaire, les estrogènes produits localement, compte tenu de la présence de récepteurs spécifiques (RE α et/ou RE β), sont sans aucun doute impliqués dans le contrôle de la spermatogenèse en agissant soit directement sur les cellules sexuelles soit par l'intermédiaire des cellules somatiques, en particulier au niveau des spermatides et de la maturation du spermatozoïde.

Mots clés : estrogènes, aromatase, spermatogenèse, récepteurs estrogènes, fertilité

I. INTRODUCTION

Les gonades de mammifères ont une double fonction : la production des gamètes et la synthèse de stéroïdes qui sont contrôlées notamment par des gonadotrophines, dont l'action est modulée *in situ* par de nombreuses substances produites par les cellules gonadiques elles-mêmes. Parmi ces régulateurs paracrines et autocrines, les estrogènes jouent un rôle éminent *in situ*, en plus de leur rôle de rétrocontrôle central sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. De fait, ces hormones, dont la production est très conservée dans l'évolution, sont impliquées dans le développement génital et la reproduction dans les deux sexes mais aussi dans la constitution osseuse, la neuroendocrinologie, la physiologie cardio-vasculaire et les cancers du sein, de l'ovaire, du testicule ou de la prostate. Ces observations ont été confirmées d'une part, par la découverte d'un second récepteur aux estrogènes (RE β) et d'autre part, avec les modèles de souris génétiquement déficientes en aromatase ou en récepteurs qui ont éclairé d'un jour nouveau le rôle joué par la balance hormonale androgènes/estrogènes en physiologie et en pathologie, notamment chez le mâle.

II. LES SOURCES D'ESTROGENES

Le cytochrome P450 aromatasase (P450arom) est une enzyme cruciale présente dans le réticulum endoplasmique de pratiquement tous les tissus, notamment le cerveau, les gonades, le placenta, la glande mammaire et les tissus adipeux et osseux ; elle est responsable de la transformation irréversible des androgènes en estrogènes. Cette enzyme est une glycoprotéine membranaire composée de deux entités : le cytochrome P450 aromatasase (P450arom), une glycoprotéine héminique spécifique, et une réductase ubiquiste. Chez l'homme le P450arom est le produit d'un

Correspondance :

Dr Serge Carreau - Biochimie EA2608-USC INRA. Université, Esplanade de la Paix, 14032-CAEN Cédex - Tel 02.31.56.54.88 - Fax 02.31.56.53.20 - Email carreau@ibba.unicaen.fr

gène unique, le *CYP19* localisé sur le chromosome 15 ; il est composé de 18 exons dont 9 sont codants (Figure 1). Dans la partie 5' non-codante du gène sont situés plusieurs promoteurs avec des éléments régulateurs spécifiques ce qui fait que l'expression de *CYP19* dépend de l'environnement cellulaire [24, 26].

Dans la gonade mâle on sait depuis longtemps que l'aromatase est principalement localisée dans les cellules de Leydig. Cependant nos travaux et ceux de la littérature (pour revues [4, 17]) démontrent que non seulement les cellules somatiques mais aussi les cellules sexuelles sont capables de produire des estrogènes (Figure 2). Chez le rat adulte le taux de transcrits du P450arom est plus élevé dans les cellules germinales jeunes (spermatocytes) par rapport aux cellules matures (spermatides) alors que l'activité aromatase évolue en sens inverse [14]. L'existence de la protéine dans les cellules germinales haploïdes, notamment les spermatides allongées et les spermatozoïdes, a été corroborée par les travaux de Janulis et coll. [11] qui ont montré que cette activité enzymatique diminuait au cours du transit épидидymaire et suggéré que l'enzyme était localisée dans la gouttelette cytoplasmique du spermatozoïde. Par ailleurs chez le rat [28] des messagers de l'aromatase ainsi qu'une activité enzymatique ont été décrits dans les cellules épithéliales de l'épididyme. Dans une étude réalisée chez le singe *Rhesus*, Peyrera-Martinez et coll. [20] ont mis en évidence des transcrits de l'aromatase dont le taux est plus élevé dans la région caudale que dans la partie proximale de la tête épидидymaire ; à l'inverse l'activité aromatase est plus forte dans la tête que dans le corps et la queue de l'épididyme.

Nous avons abordé l'analyse du (ou des) promoteurs du gène de l'aromatase afin de mieux comprendre la régulation de cette enzyme. Les résultats obtenus par RACE-PCR nous ont permis de mettre en évidence une participation prépondérante du promoteur II quelque soit le type cellulaire sans exclure la possibilité que, dans les cellules germinales, un ou plusieurs autres promoteurs soient concernés [13]. De fait, à partir de préparations hautement purifiées de spermatocytes pachytènes et de spermatides rondes chez le rat adulte, nous avons démontré que l'expression du gène de l'aromatase est inhibée par le TGF β alors que le TNF α exerce un effet inverse dans les spermatocytes ; ces données sont corrélées avec l'activité enzymatique. Il est à noter que l'effet du TNF α est largement amplifié en présence de dexaméthasone, ce qui naturellement évoque l'existence d'un promoteur de type I.4, comme cela a été démontré dans le tissu adipeux [25]. En conséquence, non seulement le promoteur PII mais aussi le PI.4 sont concernés dans le contrôle de l'expression de ce gène au niveau des cellules reproductrices (Bourguiba et al, European Testis Workshop, Dooworth 2002). Très récemment nous avons observé que des facteurs paracrines

d'origine sertolienne étaient impliqués positivement dans la régulation de l'expression de l'aromatase à la fois dans les cellules de Leydig [9] et dans les cellules germinales (Bourguiba et al., données non publiées) du rat adulte.

Ces données nouvelles ont été largement confortées par les travaux de l'équipe de Simpson [21] qui ont démontré que des souris déficientes en aromatase ou ArKO sont d'abord fertiles puis une infertilité progressive apparaît chez les animaux dès l'âge de 4 mois. Cette anomalie qui concerne tous les animaux âgés d'un an, est marquée par un arrêt de maturation des spermatides associé à une diminution de leur nombre. Outre des anomalies au niveau de l'acroso-me, une augmentation de l'apoptose a été observée dans le compartiment adluminal : les spermatides sont multinucléées et dégénérantes. Chez les mâles homozygotes pour la mutation, les taux de LH et de testostérone augmentent alors que celui de la FSH reste normal. Récemment l'impact des estrogènes d'origine alimentaire a été démontré comme étant responsables à faibles doses du développement de la spermatogenèse (les phytoestrogènes exercent une protection vis à vis de la dégénérescence des cellules germinales et assurent un maintien des fonctions sertoliennes) chez les souris ArKO qui sont fertiles au départ [22]. L'explication est en fait liée à la présence de génistéine dans l'alimentation qui se lie au récepteurs estrogéniques de type bêta largement présents dans les cellules germinales et le tractus génital mâle (pour revues [5, 17, 23]).

Chez l'homme la source d'estrogène testiculaire est représentée par les cellules de Leydig bien qu'*in vitro* les cellules de Sertoli puissent produire de l'estradiol [8]. Par ailleurs des travaux font état de la présence d'estrogènes dans le spermatozoïde (pour revue [7]) et de l'existence de récepteurs pour ces hormones dans les spermatozoïdes humains [15]. Ces observations nous ont conduit à rechercher l'existence de l'aromatase (transcrits spécifiques, protéine et activité enzymatique) dans les spermatozoïdes éjaculés chez l'homme. En utilisant la RT-PCR et la «nested-PCR» avec des amorces spécifiques, nous avons pu mettre en évidence dans tous les échantillons de sperme provenant de patients normaux des ARNm de l'aromatase ; les résultats relatifs au séquençage des produits amplifiés montrent plus de 98% d'homologie avec la séquence de l'aromatase placentaire humaine. L'activité aromatase (mesurée par la méthode à l'eau tritiée) reste difficile à apprécier du fait de la faible quantité de protéines microsomiales ; toutefois nous avons pu doser par RIA l'estradiol dans les échantillons de sperme et les taux varient de 47 à 222 fmoles / éjaculat. En utilisant un anticorps anti-aromatase hautement spécifique, Turner et coll. [27], ont pu déceler sur coupe la présence de la protéine dans le cytoplasme entourant les noyaux des spermatides allongées chez l'homme. Récemment par Western-blots et en utili-

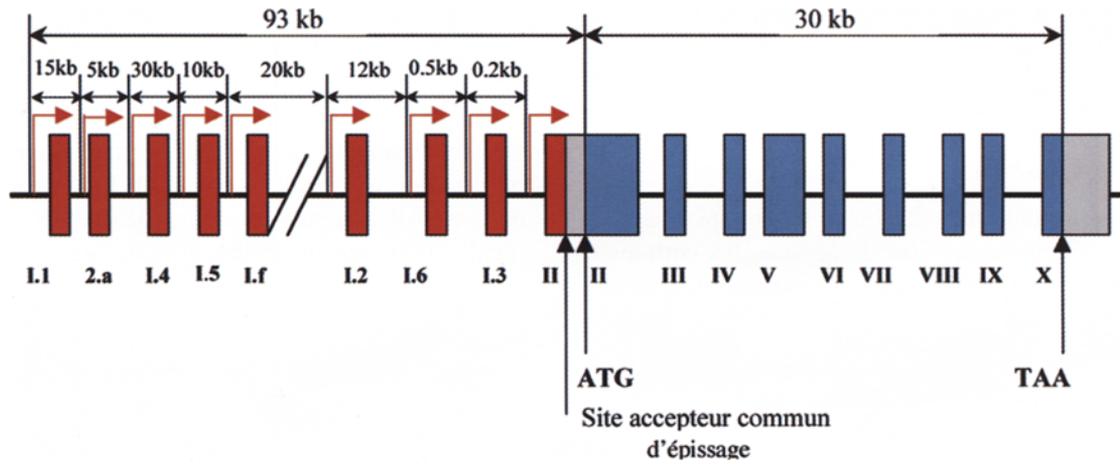


Figure 1 : Représentation schématique du gène *cyp19* humain d'après Sebastian et Bulun [24]. Le gène de l'aromatase humaine comporte neuf exons codants (en bleu) et neuf exons I non codants épissés alternativement (en rouge). Dans l'exon II se situent le site accepteur commun d'épissage et le site d'initiation de la traduction, le codon ATG, qui est commun à tous les transcrits. Les promoteurs associés à chaque exon I non codant sont représentés par des flèches (en rouge). La distance séparant les différents promoteurs est également indiquée. En gris, sont représentées les régions 3' et 5' non codantes.

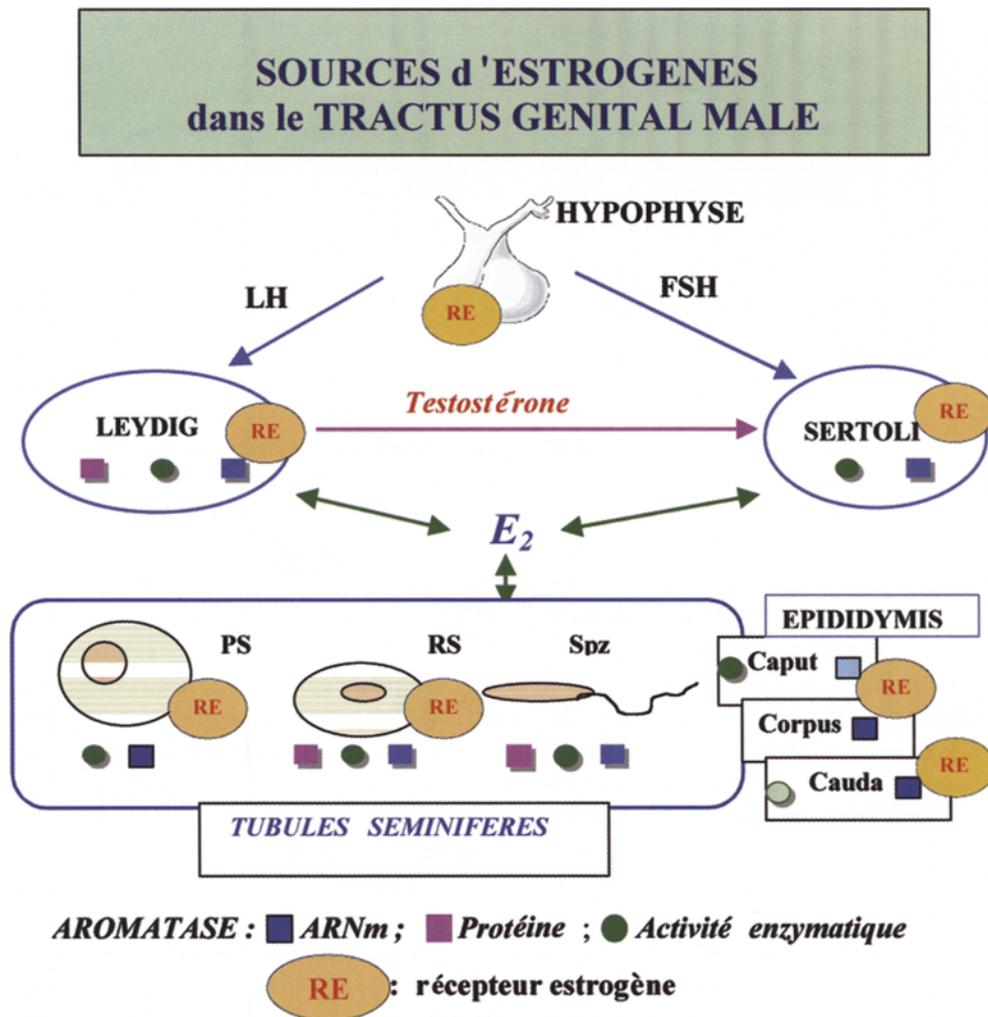


Figure 2 : Sources d'estrogènes dans le tractus génital mâle.

sant le même anticorps, nous avons démontré l'existence de l'aromatase dans les spermatozoïdes éjaculés [12] ; par ailleurs le taux de transcrits spécifiques l'aromatase est moins élevé (diminution de 30%) dans les cellules immobiles par rapport aux spermatozoïdes mobiles (Figure 3).

III. ROLE DES ESTROGENES

La spermatogenèse est un long processus de prolifération cellulaire et de maturation qui, depuis une cellule diploïde (spermatogonie) via la méiose, donne naissance à une cellule haploïde mature, le spermatozoïde. Avant d'atteindre ce stade ultime de maturation, un certain nombre de cellules germinales vont spontanément dégénérer par apoptose.

De nombreux travaux laissent supposer une implication des estrogènes dans la physiologie gonadique mâle :

- a) l'aromatase est exprimée dans les cellules somatiques et germinales chez le rat [5],
- b) des récepteurs aux estrogènes (RE) sont présents dans les cellules testiculaires, les canaux efférents et l'épididyme [10],
- c) des souris déficientes en RE [6] ou en aromatase [17] sont stériles. De plus, une synchronisation existe entre le redémarrage de la spermatogenèse et la synthèse d'estrogènes [2] chez le campagnol (rongeur hibernant).

Nous avons choisi le campagnol pour analyser *in vivo* le rôle des estrogènes dans les fonctions gonadiques du mâle,

en particulier lors de la mise en place de la spermatogenèse.

Nous avons démontré la présence conjointe de RE β et de l'aromatase dans les cellules germinales et mis en évidence des variations d'expression en fonction du cycle de la lumière : il y a beaucoup plus d'activité aromatase et de RE chez les animaux en période d'activité sexuelle (printemps) que chez ceux en repos hivernal [1]. Des animaux ont été traités avec différentes doses d'estradiol par le Dr Bilinska (Université de Cracovie, Pologne) ; les résultats préliminaires montrent qu'à faibles doses les estrogènes exercent un effet bénéfique sur le développement de la spermatogenèse chez les animaux immatures (Bilinska et al., VI th Aromatase Conference, Kyoto 2002). En outre et en collaboration avec le Dr Durand (INRA-INSERM, Lyon) une analyse *in vitro* du rôle des estrogènes est en cours afin notamment, de préciser l'impact de ces hormones femelles dans la maturation des cellules germinales isolées.

Chez l'homme le rôle positif des estrogènes dans la survie des cellules germinales [19] et dans la mobilité des spermatozoïdes est connu et supporté par la présence de RE (pour revue [16]). A côté de ces récepteurs classiques qui induisent des effets génomiques, des récepteurs membranaires fonctionnels pour les estrogènes ont été mis en évidence par Luconi et coll. [15] dans le spermatozoïde ce qui est en parfait accord avec la nécessité d'effets rapides mis en cause dans la réaction acrosomique et la capacitation.

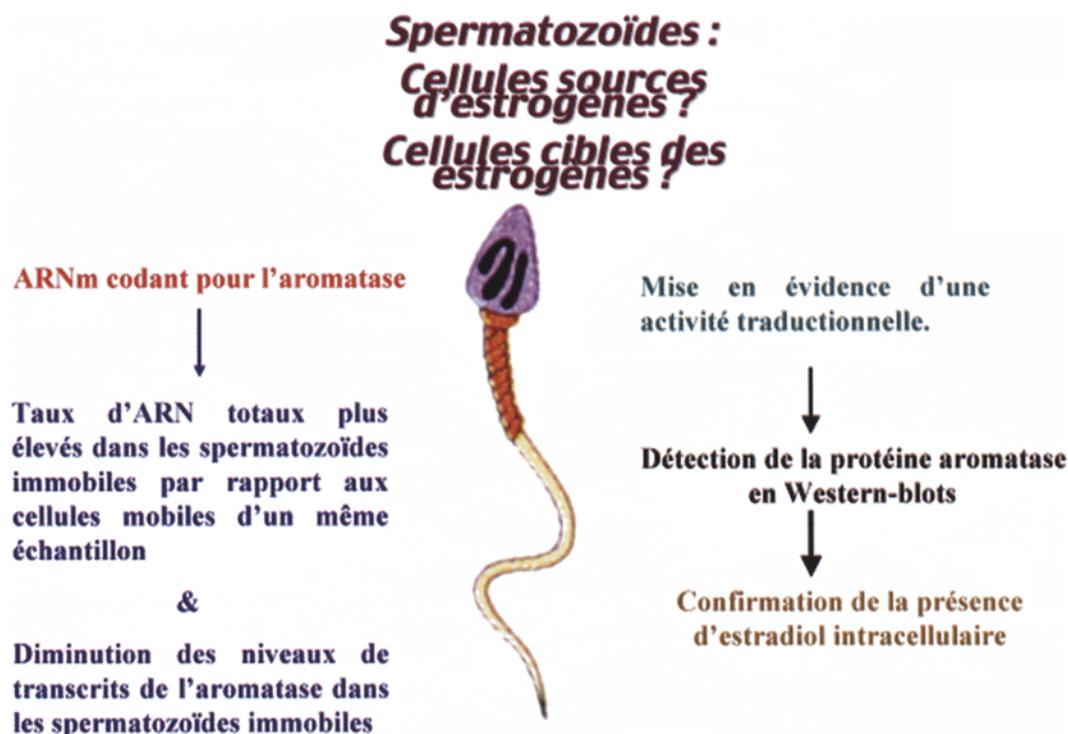


Figure 3 : Spermatozoïdes et œstrogènes.

IV. CONCLUSION

Si la testostérone est le médiateur principal du développement testiculaire, les estrogènes produits localement, compte tenu de la présence de récepteurs spécifiques, sont certainement 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. Nous ne sommes finalement qu'au début de cette nouvelle "base de données" où le rôle paracrine / intracrine des estrogènes est hautement probable compte tenu de l'expression particulière de l'aromatase et de la présence de récepteurs aux estrogènes dans les cellules du tractus génital de mâle (Tableau 1).

Tableau 1 : Récepteurs aux estrogènes (RE α RE β) et activité aromatase dans les cellules testiculaires et le tractus génital des primates.

Tissu /cellules	RE α	RE β	Activité Aromatase
Leydig	+ [18]	+ [18]	+
Péritubulaire	-	= [23]	?
Sertoli	-	+ [18], [23]	+
Spermatogonie	-	+ [23]	?
Spermatocyte Pachytène.	+ [19]	+ [19], [23]	?
Spermatide Ronde	+ [19]	+ [19], [23]	?
Spermatozoïde	+	+	+
Canaux Efférents.	+ [23]	+ [23], [18]	?
Epididyme	-	+ [23]	+
Vésicules Séminales	+ [23]	+ [23]	?
Prostate	-	+ [18]	+

Pour plus de détails voir revues [3, 5, 17].

REMERCIEMENTS :

Je voudrais adresser un remerciement particulier au Pr Bilinska (Université Jagiellonian, Cracovie) pour son aide tout au long de ces années.

REFERENCES

- BILINSKA B., SCHMALZ-FRACZEK B., SADOWSKA J., CARREAU S. : Localisation of cytochrome P450 aromatase and oestrogen receptors α and β in bank vole testicular cells. Acta Histochem., 2000, 102 : 1-15.
- 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.
- CARREAU S. : Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. Mol. Cell. Endocrinol., 2001, 178 : 65-72.
- CARREAU S., BOURGUIBA S., LAMBARD S. et al. : Aromatase expression in male germ cells. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 2001, 79 : 203-208.
- CARREAU S., BOURGUIBA S., LAMBARD S., GALERAUD-DENIS I., GENISSEL C., LEVALLET J. : Reproductive system : aromatase and estrogens. Mol. Cell. Endocrinol., 2002, 193 : 137-143.
- 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.
- DENIS I., MARIE E., CARREAU S. : Estrogènes et spermatozoïde. Andrologie, 1999, 9 : 252-260.
- FOUCAULT P., DROSDOWSKY M.A., CARREAU S. : Germ cells and Sertoli cells interactions in human testis : evidence for stimulatory and inhibitory effects. Hum. Reprod., 1994, 9 : 2062-2068.
- GENISSEL C., CARREAU S. : Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig cells. Mol. Cell. Endocrinol., 2001, 178 : 141-148.
- HESS R.A., BUNICK D., LUBAHN D.B., ZHOU Q., BOUMA J. : Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor- α knockout mice. J. Androl., 2000, 21 : 107-121.
- 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.
- LAMBARD S., GALERAD-DENIS I., BOURAIMA H., BOURGUIBA S., CHOCAT A., CARREAU S. : Cytochrome P450 aromatase expression in ejaculated human spermatozoa. Mol. Hum. Reprod., *soumis pour publication*, 2002.
- LANZINO M., CATALANO S., GENISSEL C. et al. : Aromatase messenger ribonucleic acid is derived from the proximal promoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli and germ cells of the rat testis. 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., 1998, 58 : 919-926.
- 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.

Sources of estrogens

Serge CARREAU, Sonia BOURGUIBA, Isabelle DENIS-GALERAUD, Sophie LAMBARD

16. LUCONI M., FORTI G., BALDI E. : Genomic and nongenomic effects of estrogens : molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 2002, 80 : 369-381.
17. O'DONNELL L., ROBERTSON K.M., JONES M.E.E., SIMPSON E.R. : Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, 2001, 22 : 289-318.
18. PELLETIER G., EL-ALFY M.J. : Immunocytochemical localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85 : 4835-4840.
19. PENTAKAINEN V., ERKKILA K., SUOMALAINEN 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.
20. PEREYRA-MARTINEZ A.D., ROSELLI C.E., STADELMAN H.L., RESKO J.A. : Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male rhesus monkeys. *Endocrine*, 2001, 16 : 15-19.
21. 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. Sc.*, 1999, 96 : 7986-7997.
22. ROBERTSON K.M., O'DONNELL L., SIMPSON E.R., JONES M.E.E. : The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology*, 2002, 143 : 2913-2921.
23. SAUNDERS P.T.K., SHARPE R.M., WILLIAMS K. : 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.
24. SEBASTIAN S., BULUN S.E. : A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86 : 4600-4602.
25. SHOZU M., ZHAO Y., SIMPSON E.R. : TGF β 1 stimulates expression of the aromatase (CYP19) gene in human osteoblast and THP-1 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2000, 160 : 123-133.
26. SIMPSON E.R., MICHAEL M.D., AGARWAL V.R., HINSELWOOD M.M., BULUN S.E., ZHAO Y. : Expression of the CYP 19 (aromatase) gene : an unusual case of alternative promoter usage. *F.A.S.E.B. J.*, 1997, 11 : 29-36.
27. TURNER K.J., MacPHERSON S., MILLAR M.R. et al. : Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J. Endocrinol.*, 2002, 172 : 21-30.
28. WISZNIEWSKA B. : Primary culture of rat epididymal epithelial cells as a source of estrogen. *Andrologia*, 2002, 34 : 1-8.

The ability of the testis to irreversibly convert androgens into estrogens is related to the presence of a microsomal enzymatic complex called aromatase, which is composed of a specific glycoprotein, cytochrome P450 aromatase (P450arom) and an ubiquitous reductase. In the rat testis, we have immunolocalized P450arom not only in Leydig cells, but also in germ cells and especially in elongated spermatids. We have shown that the level of P450arom mRNA transcripts decreases according to the stage of germ cell maturation and is much higher in younger germ cells than in mature germ cells, while aromatase activity is 2- to 4-fold higher in spermatozoa compared to the other two enriched germ cell preparations. By using an *in vitro* model of mature rat Leydig cells, pachytene spermatocytes and round spermatids, we have shown that several factors direct the expression of the aromatase gene in these cells and that promoters PII but also PI.4 are clearly involved. Our recent data obtained from ejaculated human spermatozoa demonstrate expression of aromatase both in terms of mRNA and protein, and our results also suggest that aromatase could be involved in the acquisition of sperm motility. Together with the widespread distribution of ERs in testicular cells, these data provide new light on the hormonal regulation of spermatogenesis in mammals.

Key-words: estrogens, aromatase, spermatogenesis, estrogen receptors, fertility