

L'aromatase testiculaire : Du gène à la protéine

S. CARREAU, J. LEVALLET

Laboratoire de Biochimie-IRBA, CNRS EP 9, Université de Caen, Esplanade de la Paix,
14032 CAEN Cédex.

RESUME

La conversion irréversible des androgènes en estrogènes est assurée par l'aromatase, complexe enzymatique constitué de deux entités protéiques : un cytochrome P450 aromamatase, spécifique de la liaison du stéroïde et de la réaction d'aromatation, et une réductase ubiquitaire. L'aromatase est présente dans le réticulum endoplasmique de nombreuses cellules stéroïdogènes de vertébrés, et notamment les gonades. C'est une protéine unique de 503 acides aminés chez l'homme appartenant à la superfamille des cytochromes P450; elle est codée par un gène d'au moins 75 kb comportant 17 exons, dont 8 non codants soumis à un épissage alternatif. Le développement de la RT-PCR quantitative a permis de dénombrer dans le testicule du rat adulte, les transcrits de l'aromatase, non seulement dans les cellules de Leydig et de Sertoli mais aussi dans les cellules germinales à différents stades de leur maturation. Les taux d'ARNm du P450arom décroissent de 50% dans les cellules germinales entre le stade spermatocyte pachytène et spermatide ronde, et deviennent très faibles dans les spermatozoïdes.

En outre, en fonction du degré de maturation du testicule, le nombre de copies de l'ARNm varie, en particulier dans la cellule de Sertoli adulte où le taux est 20 fois inférieur à celui des cellules immatures alors que dans les cellules de Leydig la quantité d'ARNm augmente sensiblement avec l'âge. Très récemment nous avons rapporté l'existence de deux transcrits non-codants (perte du domaine de liaison à l'hème) dans les spermatocytes

pachytènes et les spermatides rondes résultant d'un épissage alternatif impliquant la partie 3' des pré-ARNm de l'aromatase. L'aromatase a été par ailleurs localisée par immunohistochimie dans les cellules de Leydig chez l'homme, chez le rat, le porc, le bélier et l'étaalon. Nous avons confirmé l'existence de l'aromatase dans les cellules de Leydig, mais nous l'avons aussi mise en évidence sur coupes testiculaires, dans les cellules situées à proximité de la lumière des tubes séminifères (plus précisément dans les spermatides allongées et les spermatozoïdes). Après incubation avec de l'androstènedione tritiée, la présence d'une protéine biologiquement active, non seulement dans les cellules de Leydig mais aussi dans les cellules germinales (activité enzymatique 2-5 fois plus forte dans les spermatozoïdes que dans les cellules germinales plus jeunes), a été confirmée. Les effets précis de l'aromatase testiculaire et des estrogènes restent à explorer de manière approfondie dans la mesure où l'on ne connaît pas bien les cibles moléculaires de ces hormones. En résumé, la présence du cytochrome P450 aromamatase dans les cellules somatiques et les cellules germinales du rat mâle confirment donc l'existence d'une source supplémentaire d'estrogènes dans le testicule de certains mammifères ce qui serait en faveur d'un rôle physiologique nouveau pour ces hormones sexuelles femelles dans la régulation des fonctions testiculaires.

Mots clés: ARNm, Gène, Aromamatase, Testicule, Mammifères

INTRODUCTION

L'aromatase est constituée de deux entités protéiques : une cytochrome P450 aromatase, spécifique de la liaison du stéroïde et de la réaction d'aromatation, et une cytochrome P450 réductase (utilisant une flavoprotéine non spécifique) qui permet le transfert d'électrons du NADPH réduit à l'hème des cytochromes [41]. L'aromatase est localisée dans les microsomes des cellules stéroïdogènes de vertébrés, et notamment au niveau des gonades; elle est impliquée dans le développement, la reproduction, la différenciation sexuelle et le comportement, les métabolismes osseux et lipidique, le fonctionnement du cerveau et certaines pathologies comme les cancers du sein et du testicule. C'est l'unique enzyme catalysant de manière irréversible la biosynthèse des estrogènes à partir des substrats androgéniques.

LE GENE DE L'AROMATASE

Depuis environ une dizaine d'années, la plupart des gènes de la stéroïdogénèse ont été isolés et en particulier les clonages des ADNc puis du gène humain de l'aromatase (CYP19) par différentes équipes [11, 32, 48] ont été réalisés. S'étalant sur plus de 75 kb avec au moins 17 exons, le gène unique de l'aromatase, ou CYP 19 (car il permet l'élimination du méthyle situé au niveau du C19 caractéristique des androgènes), est un des plus longs parmi les gènes des enzymes du métabolisme des stéroïdes, il est localisé sur le chromosome 15 dans la région q21.1 . Il appartient à la superfamille des cytochromes P450 qui comprend au moins 500 gènes regroupés en 36 familles, et aussi plusieurs dizaines de pseudogènes [36, 41-42].

Le gène de l'aromatase est en outre singulier car il contient au moins 8 exons non codants , tous en 5' soumis à un épissage alternatif après leur transcription en aval d'autant de promoteurs dits tissus-spécifiques. Les domaines fonctionnels du gène de l'aromatase humain sont indiqués dans le tableau 1 ; les 9 exons codants (exons II à X) correspondent à la traduction (site d'initiation dans l'exon II) d'une seule et même protéine de 55kDa conte-

nant 503 acides aminés [31, 33, 42, 49]. Le site accepteur d'épissage commun est situé 38 pb en amont du site d'initiation de la traduction de l'exon II (Figure 1).

Parmi ces multiples promoteurs, ceux du placenta (PI.1), du tissu adipeux (PI.4, PI.3 et II) et de l'ovaire (PII) sont les mieux caractérisés. Il est intéressant de noter que selon Bulun et al. [3] le promoteur PII serait celui qui serait préférentiellement activé au niveau testiculaire, mais la mise en évidence récente de l'exon I.6 à ce niveau [45] laisse supposer l'utilisation d'autres promoteurs testiculaires. L'utilisation d'un promoteur toujours là sur le gène dépend des facteurs transcriptionnels présents dans la cellule à un moment donné [7], dont l'activation peut varier en fonction du stade de développement, des conditions physiologiques ou pathologiques ou des facteurs du milieu (Figure 1).

LES ARNm DU CYTOCHROME P450 AROMATASE

La complexité de l'épissage alternatif du gène de l'aromatase est bien démontrée. Les différentes formes d'épissage des ARN pré-messagers de l'aromatase ont pour conséquence, selon les tissus ou les conditions physiologiques, l'obtention d'ARNm présentant en 5' la séquence de l'un des exons non codants connus à ce jour (I.1, 2a, I.4, I.3, 1.f, I.5, I.6 ou PII). De plus, on trouve en 3' deux sites de polyadénylation, donnant pour le placenta deux transcrits de 3,4 et 2,9 kb majoritaires [32], démontrant donc une hétérogénéité des transcrits dans la région 3' non codante. Les différentes longueurs d'ARNm de l'aromatase connues chez l'homme et les rongeurs sont répertoriées dans le Tableau 1.

Bien qu'aucun travail n'ait été publié sur la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène de l'aromatase, selon leurs séquences 5' non traduites [49], les transcrits décrits présentent certainement une stabilité ou un taux de traduction différents que l'on ne peut pas apprécier avec la RT-PCR quantitative.

En ce qui concerne l'ARNm testiculaire de l'aromatase le développement de la RT-PCR

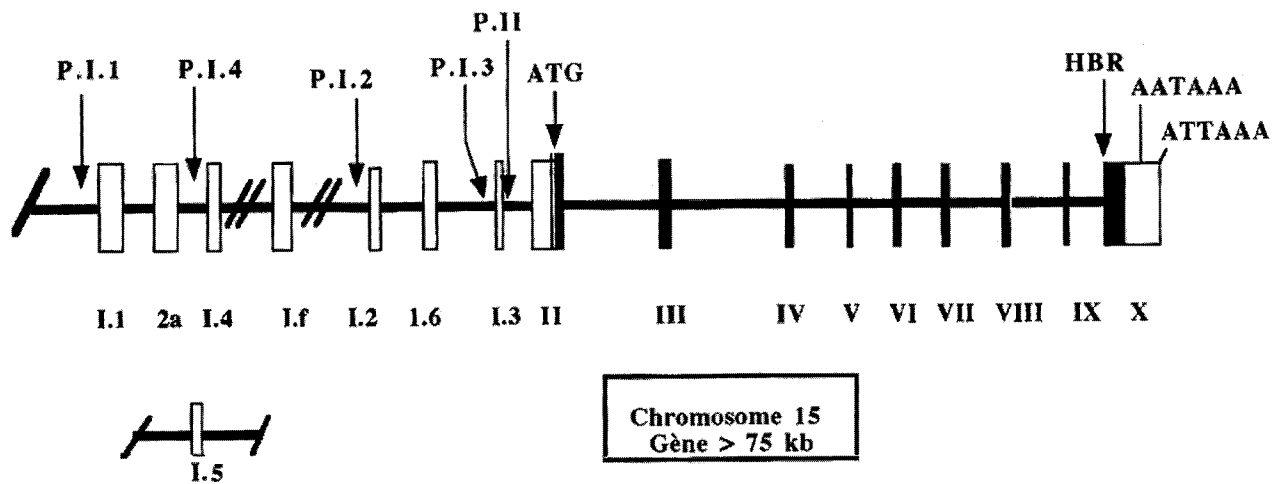


Figure 1. Représentation schématique du gène de l'aromatase humaine. La taille du gène (incluant la région régulatrice) est supérieure à 75 kb. Les exons non traduits (I.1 à I.3) sont placés sur le gène (sauf l'exon I.5) et sont indiqués avec leurs promoteurs (P.). La région de fixation de l'hème (HBR) 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.

Tableau 1. Domaines fonctionnels du gène de l'aromatase humain.

Exon	Domaine	Fonctions
II	A, B, C, D	Segments d'anchrage dans la membrane
III	E, F, G	Domaines de structure
IV	H, I, J	Région en boucle, rôle dans la liaison au substrat
V	K, L, M	Domaines de structure
VI	N, O, P	Maintien de la conformation du site actif
VII	Q, R, S	Domaines de structure
VIII	T, U, V	Hélice distale
IX	V, W, X	Domaines de liaison au stéroïde
X	Y, Z	Hélice proximale de liaison à l'hème

quantitative a permis de dénombrer des transcrits, non seulement dans les cellules de Leydig et de Sertoli [26] mais aussi dans les cellules germinales à différents stades de leur maturation [17, 27]. Le séquençage (Figure 2) du fragment amplifié dans les cellules testiculaires montre 100% d'homologie avec la séquence de l'ADN d'ovaire de rat publiée par Hickey et al [15].

En mettant au point un dosage spécifique par RT-PCR quantitative des ARNm de l'aromatase [26], nous avons montré chez le rat adulte que les cellules somatiques (Leydig et Sertoli) et les germinales (spermatocyte, spermatide, spermatozoïde) expriment à des degrés divers ce transcrit spécifique. La quantité de transcrits exprimée par 10^6 cellules est équivalente dans les cellules de Leydig et les spermatoocytes pachytènes; les quantités d'ARNm de P450arom sont encore 2 fois plus faibles dans les spermatides pour devenir proches de la limite de dosage dans les spermatozoïdes. Cependant cette technique ne nous permet pas de savoir si l'augmentation du nombre de messagers résulte d'une augmentation du taux de transcription selon le promoteur utilisé, ou d'une stabilité différente des ARNm. En outre, en fonction du degré de maturation du testicule, le nombre de copies de l'ARNm

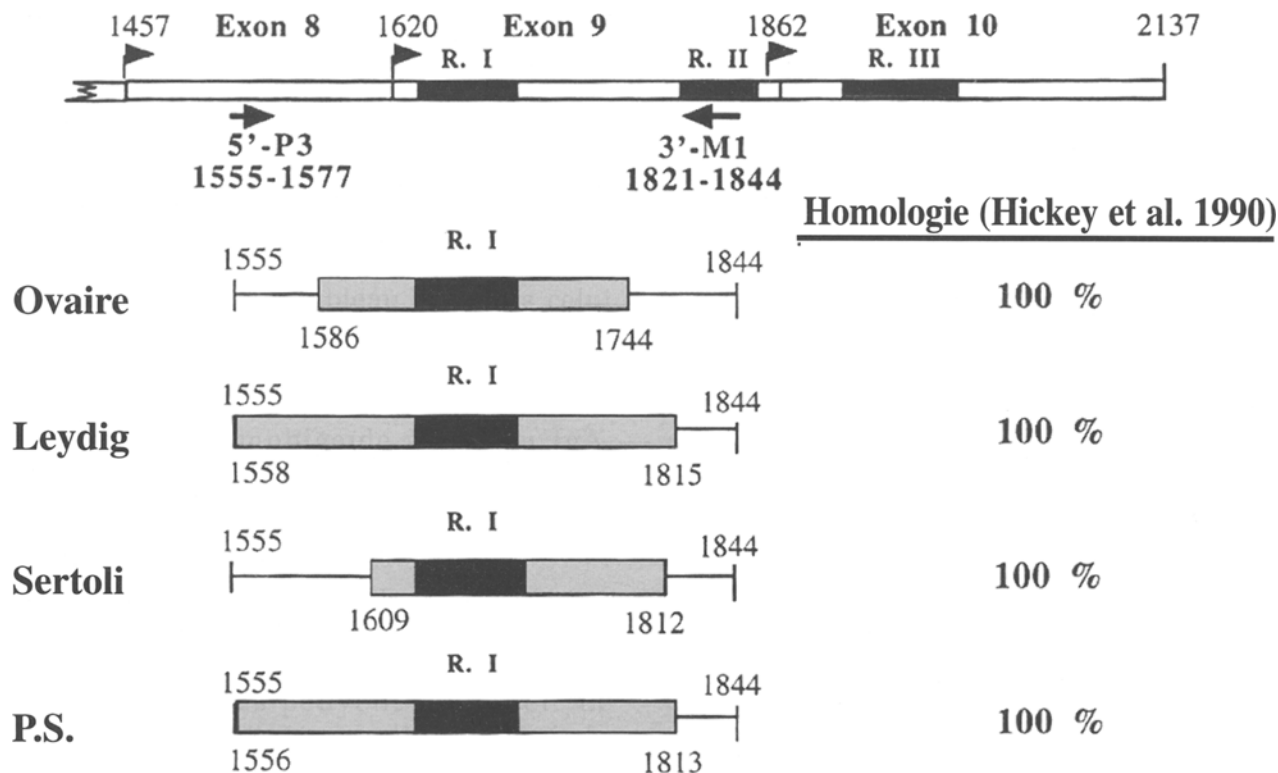


Figure 2. Séquençage des différents ARN messagers obtenus après PCR dans les cellules testiculaires du rat. Les pourcentages d'homologies ont été calculés après comparaisons des séquences obtenues avec celle de l'aromatase d'ovaire de ratte décrite par Hickey et al (1990). P.S. Spermatoocyte pachytène.

varie, en particulier dans la cellule de Sertoli adulte où le taux est 10 fois moindre que dans les Leydig adultes et 20 fois inférieur à celui des cellules de Sertoli immatures. Par contre dans les cellules de Leydig la quantité d'ARNm reste la même quel que soit l'âge du rat [26]. Très récemment nous avons rapporté l'existence de 2 transcrits non-codants (perte du domaine de liaison à l'hème) dans les cellules germinales résultant d'un épissage alternatif impliquant la partie 3' des pré-ARNm de l'aromatase [28].

ACTIVITE AROMATASE et LOCALISATION TESTICULAIRE DE LA PROTEINE

Au niveau testiculaire, l'aromatase a été localisée par immunohistochimie d'abord dans les cellules de Leydig chez l'homme [16], chez le rat [23], le porc [8], le bélier [2] et chez l'éta- lon [1]. Cependant, des différences selon les espèces ont été rapportées, parce que chez la souris [37], l'ours brun [51-52], et le coq [24],

l'aromatase est présente non seulement dans les cellules de Leydig, mais aussi dans les tubes séminifères, de manière prédominante dans les spermatides. Par ailleurs, l'activité aromatase a été détectée *in vitro* dans les cellules de Sertoli humaines [10], et de rat [38]. Ces discordances pourraient provenir d'une régulation paracrine ou endocrine différente, notamment entre les résultats sur coupes d'organes et avec des cellules isolées [5].

Chez le rat, il y a une évolution au cours du développement dans la localisation cellulaire de l'aromatase testiculaire dont le site principal d'aromatase se trouve dans les cellules de Sertoli chez l'immature, tandis qu'il apparaît leydigien chez l'adulte [6,38]. Cependant, par immunohistochimie nous avons confirmé l'existence de l'aromatase dans les cellules de Leydig, mais aussi nous l'avons mise en évidence dans les cellules situées à proximité de la lumière des tubes séminifères (plus précisément dans les spermatides allongées), ceci sur

Tableau 2. Taille des différents transcrits du cytochrome P450 aromatase

Espèce	Tissu	Taille des ARNm (kb)	Ref
Humain	placenta	3,0 - 2,4	40
	placenta	3,0 - 2,9	33
	granulosa	3,0 - 2,7 - 1,7	46
Rat	Sertoli	5,2 - 3,3 - 1,9	39
	granulosa	2,7 - 2,2 - 1,7	25
Souris	spermatocytes	3,5 - 3,1 - 2,5 - 1,8	37
	spermatides		
	ovaire	2,5 - 2,1	47

des coupes de testicules de rats matures. Après incubation de microsomes obtenus à partir des différentes cellules testiculaires purifiées, avec de l'androstènedione tritiée, la présence d'une protéine biologiquement active, non seulement dans les cellules de Leydig mais aussi dans les cellules germinales, a été confirmée. Il est remarquable de noter que dans les spermatozoïdes l'activité enzymatique est 2 à 5 fois supérieure à celle des cellules germinales plus jeunes. Dans les cellules de Leydig l'activité aromatase n'est que 2 fois plus élevée par rapport à celle du tube séminifère; ce qui est en accord avec les données publiées chez la souris [37] et conforme avec la présence d'une aromatase fonctionnelle dans le spermatozoïde [12,18]. Parmi les transcrits de l'aromatase exprimés dans les cellules germinales chez le rat, certains sont donc traduits en protéine biologiquement active, d'autres correspondraient à une protéine tronquée inactive [18, 27-28].

CONCLUSIONS : ROLES DES ESTROGENES DANS LE TESTICULE

Si la synthèse testiculaire d'estrogènes est indiscutable, le mécanisme d'action de ces hormones implique généralement l'existence de

récepteurs [19] qui ne sont pour le moment décrits que dans les cellules de Sertoli et de Leydig [35] mais aussi dans les cellules des canaux efferents [14]. Par ailleurs Kuiper et al [22] ont décrit la présence de deux types de récepteurs aux estrogènes dans le testicule dont l'un (ER α) est prépondérant par rapport à l'autre (ER β) ce qui augmente la probabilité d'un rôle des hormones femelles dans ce tissu mâle [43]. Concernant le rôle des estrogènes dans les cellules germinales, bien qu'aucune preuve de récepteur ne soit connue, des évidences très fortes plaident en faveur d'un effet stimulant puisque chez des souris mâles transgéniques dépourvues de récepteurs fonctionnels aux estrogènes, même si le tractus génital se développe normalement, une hypofertilité voire une stérilité a été rapportée en association avec une diminution du nombre et de la motilité des spermatozoïdes [9, 20, 30]. Chez l'homme, une mutation homozygote inactivant le gène de l'aromatase [4] provoque une stérilité avec 1 million de spermatozoïdes immobiles /ml de sperme. De plus, les travaux récents de Shetty et al [44] chez le singe démontrent que le blocage de la synthèse d'estrogènes par injection d'inhibiteur de l'aromatase, conduit à une réduction de la production de sperme consécutive à l'interruption de maturation des cellules germinales; données à rapprocher du rôle mitogène de l'estradiol démontré sur des gonocytes de rat in vitro [29].

Les estrogènes, à un taux physiologique, se révèlent ainsi être, contrairement à la notion classique, tout à fait essentiels à la reproduction du mâle [Korach, dans ce numéro]; par contre, une concentration supra-physiologique d'estrogènes peut inhiber la fertilité masculine [53] et notamment dans les cancers testiculaires [34]. En outre, les xénoestrogènes ont été évoqués pour expliquer les baisses de la concentration et de la qualité des spermatozoïdes humains dans plusieurs pays d'Europe [50].

Les effets précis de l'aromatase testiculaire et des estrogènes restent à explorer plus avant, dans la mesure où l'on ne connaît pas bien les cibles moléculaires de ces hormones; peu de données sont disponibles concernant les gènes estrogéno-sensibles dans le tractus génital

mâle. Cependant, il est à noter que dans l'infertilité masculine, la tête epididymaire sensible aux estrogènes est souvent impliquée car ces hormones femelles joueraient un rôle essentiel dans la réabsorption du fluide entourant les spermatozoïdes à ce niveau [12-13]. Ainsi, mieux connaître le rôle de ces hormones dans cette région est capital pour comprendre les effets stimulants ou néfastes des estrogènes sur la spermatogenèse et l'épididyme, et développer peut-être de nouvelles approches contraceptives, ou thérapeutiques, comme avec les inhibiteurs de l'aromatase. En conclusion, la structure du gène de l'aromatase souligne d'une part, la complexité de la régulation de son expression selon les types de tissus ou leur état physiologique ou pathologique, mais également son rôle en particulier dans la physiologie testiculaire des mammifères.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Ministère français de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche qui a permis au Dr B. BILINSKA (Université Jagiellonienne, Cracovie, Pologne) de mener à bien les travaux d'immunolocalisation de l'aromatase chez le rat dans notre équipe.

REFERENCES

- ALMADHIDI J., SERALINI G.E., FRSNEL J., SILBERZAHN P., GAILLARD J.L. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. *J. Histochem. Cytochem.*, 1995; 43 : 571-577.
- BILINSKA B., LESNIAK M., SCHMALZ B.: Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens? *Reprod. Fert. Dev.*, 1997; 9 : 193-199.
- BULUN S.E., ROSENTHAL I.M., BRODIE A.M., 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.
- CARANI C., QIN K., SIMONI M., FAUSTINI-FUSTINI M., SERPENTE S., BOYD J., KORACH K.S., SIMPSON E.R. : Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N.Engl. J. Med.*, 1997; 337: 91-95.
- CARREAU S. : Germ cells-Sertoli cells interactions and Leydig cell function. In: Dufau M.L., Fabbri A., Isidori A., eds. *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Frontiers in Endocrinology, 1994; 5 : 137-148.
- CARREAU S., LEVALLET J. : Activité aromatase dans les cellules germinales mâles: quelle signification fonctionnelle? *Andrologie*, 1997; 7(3) : 305-315.
- CHOI I., COLLANTE W.R., SIMMEN R.C.M., SIMMEN F.A.: A developmental switch in expression from blastocyst to endometrial/placental-type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse. *Biol. Reprod.*, 1997; 56 : 688-696.
- CONLEY A.J., CORBIN C.J., HINSELWOOD M.M., LIUZ., SIMPSON E.R., FORD J.J., HARADA N: Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biol. Reprod.*, 1996; 54 : 497-505.
- EDDY E.M., WASHBURN T.F., BUNCH D.O., et al. : Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*, 1996; 137 : 4796-4805.
- FOUCAULT P., CARREAU S., KUCZYNSKI W., et al. : Human Sertoli cells in vitro Lactate estradiol-17 β and transferrin production. *J Androl.*, 1992; 13 : 361-367.
- HARADA N., YAMADA K., SAITO K., KIBE N., DOHMAE S., TAKAGI Y. : Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 166 : 365-372.
- HESS R.A., BUNICK D., BAHR J.M. : Sperm, a source of estrogen. *Environ. Health Perspect.*, 1995; 103 : 59-62.
- HESS R.A., BUNICK D., LEE K.H., et al. : A role for estrogens in the male reproductive tract. *Nature*, 1997a; 390 : 509-512.
- HESS R.A., GIST D.H., BUNICK D., et al. : Estrogen receptor (α & β) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J. Androl.*, 1997b; 18 : 602-611.
- HICKEY G.J., KRASNOW J.S., BEATTIE W.G., RICHARDS J.S. : Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3'5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5'genomic DNA. *Mol. Endocrinol.*, 1990; 4 : 1-12.
- INKSTER S., YUE W., BRODIE A. : Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995; 80 : 1941-1947.
- 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.*, 1996a; 17 : 651-658.
- 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.*, 1996b; 17 : 111-116.
- KORACH K.S. : Insights from the study of animals

- lacking functional estrogen receptor. *Science*, 1994; 266 : 1524-1527.
20. KORACH K.S., COUSE J.F., CURTIS S.W., et al. : Estrogen receptor disruption : molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 1996; 51 : 159-188.
 21. KORACH K.S., LINDZEY J. : Alterations in male reproduction in estrogens receptor knock out mice. *Andrologie*, 1998; sous presse.
 22. KUIPER G.G.J.M., CARLSSON B., GRANDIEN K., et al. : Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 1997; 138 : 863-870.
 23. KUROSUMI M., ISHIMURA K., FUJITA H., OSAWA Y. : Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. *Histochemistry*, 1985; 83 : 401-404.
 24. KWON S., HESS R.A., BUNICK D., et al. : Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biol. Reprod.*, 1995; 53 : 1259-1264.
 25. LEPHART E.D., PETERSON K.G., NOBLE J.F., GEORGE F.W., McPHAUL M.J. The structure of cDNA clones encoding the aromatase P-450 isolated from a rat Leydig cell tumor line demonstrates differential processing of aromatase mRNA in rat ovary and a neoplastic cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1990; 70 : 31-40.
 26. LEVALLET J., CARREAU S. : Expression in vitro du gène de l'aromatase dans les cellules testiculaires du rat. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, 1997; 320 : 123-129.
 27. LEVALLET J., BILINSKA B., MITTRE H., GENISEL C., FRESNEL J., CARREAU S. : Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol. Reprod.*, 1998a; 58 : sous presse
 28. 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 : sous presse.
 29. LI H., PAPADOPOULOS V., VIDIC B., DYM M., CULTY M. : Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol : identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology*, 1997; 138 : 1289-1298.
 30. LUBAHN D.B., MOYER J.S., GOLDING T.S., et al. : Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90 : 11162-11166.
 31. MAHENDROO M.S., MEANS G.D., MENDELSON C.R., SOMPSONE R. : Tissue-specific expression of human P-450 arom. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266 : 11276-11281.
 32. MEANS G.D., MAHENDROO M.S., CORBIN C.J., et al. : Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264 : 19385-19391.
 33. MEANS G.D., KILGORE M.W., MAHENDROO M.S., MENDELSON C.R., SIMPSON E.R. : Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol. Endocrinol.*, 1991; 5 : 2005-2013.
 34. NAKAZUMI H., SASANO H., MAEHARA I., et al. : Estrogen metabolism and impaired spermatogenesis in germ cell tumors of the testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996; 81: 1289-1295.
 35. NAKHALA A.M., MATHER J.P., JANNE O.A., BARDIN C.W. : Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myoid and epithelial cells: effects of time in culture and cell density. *Endocrinology*, 1984; 115 : 121-118.
 36. NELSON D.R., KOYMANS L., KAMATAKI T., et al. : P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996; 6 : 1-42.
 37. NITTA H., BUNICK D., HESS R.A., et al. : Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*, 1993; 132 : 1396-1401.
 38. PAPADOPOULOS V., CARREAU S., SZERMAN-JOLY E. et al. : Rat testis 17 β - estradiol : identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. *J. Steroid Biochem.*, 1986; 24 : 1211-1216.
 39. PAPADOPOULOS V., JIA M.C., CULTY M., HALL P.F., DYM M. : Rat Sertoli cell aromatase cytochrome P450: regulation by cell culture conditions and relationship to the state of cell differentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1993; 29A : 943-949.
 40. SIMPSON E.R., EVANS C.T., CORBIN J.C., POWELL F.E., LEDESMA D.B., MENDELSON C.R. : Sequencing of cDNA inserts encoding aromatase cytochrome P450. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1987; 52 : 267-272.
 41. SIMPSON E.R., MAHENDROO M.S., MEANS G.D. et al. : Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Rev.*, 1994; 15 : 342-355.
 42. SIMPSON E.R., MICHAEL M.D., AGARWAL V.R., HINSHELWOOD M.M., BULUN S.E., ZHAO Y. : Expression of the CYP 19 (aromatase) gene : an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB J.*, 1997; 11 : 29-36.
 43. SHARPE R.M. : Do males rely on female hormones. *Nature*, 1997; 390 : 447-448.
 44. SHETTY G., KRISHNAMURTHY H., KRISHNAMURTHY H.N., BHATNAGAR S., MOUDGAL R.N. : Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1997; 61 (3-6) : 157-166.
 45. SHOZU M., BULUN S.E., ZHAO Y., SIMPSON E.R. : Expression of a novel exon 1 of the aromatase gene: exon I.6. *The Endocrine Society*, 1997, 79th annual mee-

ting, P1-417.

46. STEIMKAMPF M.P., MENDELSON C.R., SIMPSON E.R. : Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P450 of human ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1988; 59 : 93-99.
47. TERASHIMA M., TODA K., KAWAMOTO T., et al. : Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991; 285 : 231-237.
48. TODA K., TERASHIMA M., KAWAMOTO T. et al. : Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Eur. J. Biochem.*, 1990; 193 : 559-565.
49. TODA K., SHIZUTA Y. : Molecular cloning of a cDNA showing alternative splicing of the 5'-untranslated sequence of mRNA for human aromatase P450 gene. *Eur. J. Biochem.*, 1993; 213 : 559-565.
50. TOPPARI J., LARSEN J.C., CHRISTIANSEN P., et al. : Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.*, 1996; 104 : 741-803.
51. TSUBOTA T., NITTA H., OSAWA Y., et al. : Immunolocalization of steroidogenic enzymes P450scc 3 β -HSD P450c17 and P450arom in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) testis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1993; 92 : 439-444.
52. TSUBOTA T., HOWELL-SKALLA L., NITTA H., et al. : Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *J. Reprod. Fertil.*, 1997; 109 : 21-7.
53. YOUNG J., BULUN S.E., AGARWAL V., et al. : Aromatase expression in a feminizing adrenocortical tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996 ; 81 : 3173-3176.

ABSTRACT

**The testicular aromatase :
From the gene to the protein**

S. CARREAU, J. LEVALLET

The cytochrome P450 aromatase (P450arom) is the terminal enzyme responsible for the formation of estrogens from androgens and is present in the endoplasmic reticulum membrane of various tissues. This microsomal protein associated with the ubiquitous reductase catalyzes the aromatization of the A-ring of C19 androgens to estrogens via 3 hydroxylations. P450arom is involved in development, reproduction, sexual differentiation

and behaviour, but also in bone and lipid metabolisms, brain functions and diseases such as breast and testicular tumours. Aromatase belongs to the cytochrome P450 gene superfamily and is encoded by 9 exons from a single gene over 75 kb long. Moreover, this gene also includes 8 non-coding exons, all of them are in 5' under alternative splicing control, after their transcription downstream an equivalent number of tissue-specific promoters. Several sizes of mRNA have been described out of this gene, which could also be submitted to differential regulation. The encoded-protein has a molecular weight around 55kDa and is composed of 503 amino acids in human. In adult rat somatic and germ cells we have amplified, using RT-PCR, specific transcripts for P450arom which showed 100% homology with the corresponding fragments of the rat ovary cDNAs. In purified Leydig cells and pachytene spermatocytes, the amount of P450arom mRNA is 10 fold higher than in Sertoli cells. According to the stage of germ cell maturation, the level of P450arom mRNA transcript decreases, being more elevated in younger than in mature germ cells. By contrast, the aromatase activity in the microsomal fractions is 2-4 fold greater in spermatozoa when compared to the two other enriched-germ cell preparations studied. In parallel by Western blotting, we revealed a 55 kDa protein in a mixed germ cells preparation and we have been able to immunolocalize the P450arom on mature rat testicular slices, namely in Leydig cells and elongated spermatids. These data demonstrate the presence of a functional cytochrome P450arom in the male rat Leydig cells and germ cells. Consequently, the existence of an additional source of estrogens within the genital tract of the mammalian testis is obvious and therefore, a new physiological role for these female hormones in the regulation of testicular functions should be taken into account.

Key words: *Aromatase gene, P450arom mRNA, estrogens, testis, mammals*