

## Activité aromatasase dans les cellules germinales mâles : quelle signification fonctionnelle ?

S. CARREAU, J. LEVALLET

CNRS EP 9 Université, 14032 Caen Cedex.

### RESUME

La capacité de la gonade mâle à convertir les androgènes en oestrogènes est bien établie : cette transformation est catalysée par l'aromatase composée d'une glycoprotéine enzymatique microsomiale, le cytochrome P450 aromatasase (P450arom) et d'une réductase ubiquitaire. Dans les cellules testiculaires du rat mature, le P450arom a été immunolocalisé principalement dans les cellules de Leydig mais également dans les cellules germinales chez la souris, l'ours brun et le coq alors que chez l'homme, le porc et le cheval, l'aromatase est principalement localisée dans les cellules de Leydig. L'activité aromatasase a été mesurée dans les cellules de Leydig du rat immature et mature, mais aussi dans les cellules de Sertoli : cette activité varie en fonction de l'âge. Par RT-PCR, nous avons amplifié un fragment de 289 pb du messenger de l'aromatase qui présente 100% d'homologie avec la séquence de l'aromatase d'ovaire de rat, et qui est détectable non seulement dans les cellules de Leydig et de Sertoli mais aussi dans les spermatoocytes pachytènes, les spermatides rondes et les spermatozoïdes testiculaires. Avec un anticorps anti-cytochrome P450arom humain nous avons démon-

tré l'existence d'une protéine de 55 kDa dans les tubes séminifères et dans une suspension hétérogène de cellules germinales (spermatoocytes pachytènes et spermatides rondes). Nous avons comparé la quantité d'ARNm du cytochrome P450arom dans les cellules germinales avec celle des cellules de Leydig et de Sertoli à l'aide de la RT-PCR quantitative. Dans les cellules de Leydig purifiées du rat âgé de 90 jours, la quantité d'ARNm codant pour l'aromatase est de  $36 \times 10^{-3}$  amoles/ $\mu$ g d'ARN et 10 fois supérieure à celui des cellules de Sertoli. Dans les cellules germinales, le taux d'ARNm dans les spermatoocytes pachytènes est de  $367 \times 10^{-3}$  amoles/ $\mu$ g d'ARN et cette valeur est 3 fois supérieure à celle des spermatides rondes; dans les spermatozoïdes ce taux est inférieur à  $10^{-3}$  amoles/ $\mu$ g d'ARN. Après incubation avec de l'androstènedione tritiée, les activités aromatasases des fractions microsomiales sont de 0,62 ; 0,46 et 2,96 pmoles/mg de protéine/h respectivement dans les spermatoocytes, les spermatides et les spermatozoïdes (pour les cellules de Leydig cette activité est de 5 pmoles). En conclusion, nous avons démontré la présence d'une aromatasase fonctionnelle dans les cellules germinales du rat mâle, la maturation du messenger (comparaison taux d'ARNm et activité enzymatique)

**semble être progressive depuis le stade spermatocyte pachytène jusqu'au spermatozoïde ce qui est en accord avec les données rapportées chez la souris. En somme, les observations rapportées dans la littérature et nos résultats, plaident fortement en faveur d'un rôle nouveau mais encore mal connu pour les oestrogènes testiculaires dans le développement du tractus génital mâle puis la mise en place et le maintien de la spermatogenèse. Ainsi compte tenu des anomalies rencontrées dans la spermatogenèse chez des animaux déficients en récepteur aux oestrogènes et chez l'homme porteur de tumeurs testiculaires, les oestrogènes (et/ou le rapport androgènes/oestrogènes) pourraient représenter un nouveau marqueur de l'infertilité et/ou de l'hypofertilité masculine.**

*Mots clés : Aromatase, oestrogènes, RT-PCR, Quantification, Cellules Germinales, Rat.*

## INTRODUCTION

Dans le développement du testicule et la mise en place de la spermatogenèse, un rôle majeur est joué par les gonadotrophines, les androgènes, en particulier la testostérone, et de nombreux facteurs paracrines et /ou autocrines, notamment des facteurs de croissance [3, 9-10, 30]. Bien que les oestrogènes soient considérés comme hormones typiquement femelles, dans le fluide du rete testis du rat et dans la tête de l'épididyme, les concentrations en oestrogènes sont plus élevées que dans le sang [18, 26]. Ces données sont donc en faveur d'une source testiculaire d'oestrogènes et de fait il est bien établi que le testicule des mammifères transforme les androgènes (androstènedione et testostérone) en oestrogènes (oestrone et oestradiol-17 $\beta$ ) : cette réaction est catalysée par l'aromatase, composée d'une glycoprotéine enzymatique microsomiale spécifique appartenant à la superfamille des

cytochromes P450 (P450arom : produit du gène CYP19) et d'une réductase ubiquitaire [voir pour revue : 53]. En utilisant des anticorps anti-aromatase placentaire humains, le P450arom a été immunolocalisé principalement dans les cellules de Leydig des rongeurs mais également dans les cellules germinales chez la souris, l'ours brun et le coq alors que chez l'homme, le porc, le bélier et le cheval, l'aromatase est essentiellement localisée dans les cellules de Leydig (Tableau 1). A partir des études réalisées chez le rat immature avec FSH ou LH d'une part [47-48] et la mesure de l'activité aromatase dans les cellules de Leydig du rat immature et mature, mais aussi dans les cellules de Sertoli d'autre part [43], les résultats obtenus suggèrent que cette activité enzymatique varie en fonction de l'âge. En outre, non seulement la distribution de l'aromatase varie selon les espèces mais dans les études in vitro, des différences ont été observées et certaines d'entre elles peuvent s'expliquer en tenant compte des interactions cellules-cellules (absence de régulations endocrine et paracrine). En ce qui concerne l'aromatase, des interactions négatives ont été démontrées entre les cellules péricubulaires et les cellules de Sertoli [57] et des modulations positives entre les tubes séminifères (cellules de Sertoli associées aux cellules germinales) et les cellules de Leydig ont été aussi décrites [6, 8]. Par ailleurs le rôle négatif exercé par les cellules germinales sur l'activité aromatase sertolienne du rat et de l'homme a été bien démontré [5, 17, 31]. Compte tenu de ces données bibliographiques et de nos travaux antérieurs [8, 43, 45], nous avons 1) examiné la distribution et quantifié le messenger du cytochrome P450arom dans les cellules germinales purifiées du rat adulte en utilisant la RT-PCR 2) recherché l'existence de la protéine (P450arom) par Western Blot et 3) mesuré son activité enzymatique (production d'eau tritiée) dans les cellules somatiques et germinales chez l'animal mature.

**Tableau 1 : L'aromatase dans les cellules testiculaires des mammifères (quelques repères bibliographiques).**

---

### **Activité Enzymatique**

- **Rat** : cellules de Sertoli (Dorrington, 1975 ; cellules de Leydig et Sertoli (de Jong, 1974 ; Rommerts, 1982 ; Tsai-Morris, 1985 ; Papadopoulos, 1986)
- **Ecureuil** : cellules de Sertoli (Pudney, 1985)
- **Souris** : cellules de Leydig et cellules germinales (Nitta, 1993), spermatozoïde épидидymaire (Janulis, 1996)
- **Coq** : spermatozoïde épидидymaire (Kwon, 1995)
- **Porc** : cellules de Leydig (Saez, 1989 ; Conley, 1996)
- **Bélier** : cellules de Leydig (Bilinska, 1996)
- **Homme** : cellules de Leydig (Payne, 1976 ; Papadopoulos, 1987 ; Inkster, 1995) ; cellules de Sertoli (Foucault, 1994 ; Carreau, 1996)
- **Singe** : testicule (Martel, 1994)

---

### **Immunolocalisation**

- **Coq** : cellules germinales (Kwon, 1995)
- **Rat** : cellules de Leydig (Kurosumi, 1985)
- **Souris** : cellules de Leydig et Sertoli, cellules germinales : spermatozoïde épидидymaire (Janulis, 1996)
- **Ours** : cellules Leydig et germinales (Tsubota, 1993)
- **Bélier** : cellules de Leydig (Bilinska, 1996)
- **Porc** : cellules de Leydig (Conley, 1996)
- **Cheval** : cellules de Leydig (Almadhidi, 1995)
- **Homme** : cellules de Leydig (Inkster, 1995)
- **Singe** : cellules germinales (Bahr, non publié)

---

### **ARNm du cytochrome P450**

- **Souris** : cellules de Leydig et germinales : spermatocytes et spermatides (Nitta, 1993 ; Janulis, 1996)
- **Porc** : cellules de Leydig (Conley, 1996)
- **Homme** : cellules de Leydig (Lejeune, 1994)

---

## **MATERIEL ET METHODES**

### **1. Purification des cellules testiculaires**

Des testicules de rats Sprague Dawley âgés de 80-100 jours ont été prélevés puis soumis à un traitement enzymatique en présence de collagénase-dispase dans du milieu Ham F-12/DME (1:1, v/v) pendant 10 min à 32°C et les cellules de Leydig ont été purifiées sur gradient de Percoll [42]. Les cellules de Sertoli ont été préparées selon la méthode décrite par Foucault et al [17] et mises en culture dans du milieu Ham F12/DME supplémenté en sérum de

rat (5%) et antibiotiques. Le milieu est changé au jour 2 et remplacé par du milieu sans sérum; à J4, les cellules germinales restantes sont éliminées par traitement hypotonique. Parallèlement, les cellules germinales ont été obtenues après traitement enzymatique (trypsine-DNase) des testicules et purifiées soit par élutriation [37] soit par sédimentation à gravité unitaire sur gradient de PBS-BSA (Sta-Put; [2]). La pureté et la viabilité des fractions cellulaires ont été examinées par microscopie et à l'aide de marqueurs spécifiques (3 $\beta$ -hydroxystéroïde deshydrogénase [42] pour les cellules de Leydig et recherche du messageur d'un marqueur sertolien, l'androgen

binding protein ou ABP, pour apprécier la pureté des cellules germinales [7, 33]).

## 2. Polymérisation en chaîne et transcription inverse (RT-PCR)

L'ARN total est extrait par une méthode dérivée de la technique de Chomczynski et Sacchi [11] (RNAXEL, Eurobio, France), dosé et rétro-transcrit en ADNc grâce à une amorce oligo dT (12-18). L'amplification se déroule sur 35 cycles en présence de dNTP, de TAQ polymérase (Eurobio, France) et de 1  $\mu$ M d'amorces. L'amorce 5'-ARO est localisée sur l'exon 8 du gène de l'aromatase en position 1555-1577, l'amorce 3'-ARO est complémentaire de la séquence 1821-1844 située dans la région d'aromatation de l'exon 9; ce couple permet d'amplifier un fragment de 289 pb. Les produits amplifiés sont séquencés par la méthode de Sanger [52] avec le kit Sequenase Version 2 (USB, Cleveland, USA).

## 3. Préparation de l'ARN standard par délétion du fragment natif.

Une RT-PCR est réalisée avec le couple d'amorce 5'-STD, 3'-STD. L'amorce 5'-STD est constituée de :

- la séquence complémentaire du promoteur de la T7 ARN polymérase,
- la séquence de l'amorce 5'-ARO (souligné) et
- une séquence de 27 pb située à 29 pb de l'extrémité 3' de l'amorce 5'-ARO dans la région 1607 à 1634 (souligné deux fois).

L'amorce 3'-STD représente l'association d'une séquence poly dT(17) avec l'amorce 3'-ARO (souligné).

5'STD:5'-TAATACGACTCACTATAGGGA-GAGCTTCTCATCGCAGAGTATCC  
GGCACACTGTTGTTGGTGACAGAGACA-TA-3'

3'STD : 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-  
CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG-3'

Le brin contenant l'amorce 5'-STD est

transcrit en ARN en présence de T7 ARN polymérase; l'ADNc est éliminé par incubation (Promega., France), puis l'ARN standard est extrait et redissout dans de l'eau traitée au DEPC contenant 0,1 mg/ml d'ARNt.

Pour vérifier la qualité et la taille du standard, une RT-PCR a été réalisée avec les amorces 5'-ARO et 3'-ARO sur une série de dilutions du standard (100 à 10<sup>-5</sup> amoles). La limite de détection du standard est de 10<sup>-4</sup> amoles, et sa taille est bien de 260 pb.

## 4. Recherche de la protéine aromatase par Western blot et mesure de l'activité enzymatique

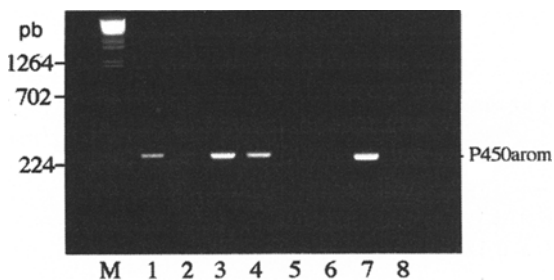
Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur nitrocellulose et révélées en présence d'un anticorps anti-aromatase placentaire humain (gracieusement fourni par F.Labrie & V. Luu-The, Québec); les complexes antigène-anticorps ont été visualisés en utilisant des IgG de lapin couplées à la peroxydase.

Pour la mesure de l'activité enzymatique, nous avons utilisé la méthode de l'eau tritiée [54]: brièvement des microsomes obtenus à partir des fractions cellulaires ont été incubés en concentrations croissantes avec de l'androstènedione marquée et des cofacteurs pendant 1h à 37°C puis la radioactivité est comptée après un traitement au charbon de 10 min.

## RESULTATS

### 1. Mise en évidence du messager du cytochrome P450 aromatase (P450 arom) dans les cellules germinales du rat

L'ARN total extrait des cellules a été soumis à une RT-PCR avec le couple d'amorce 5'-ARO et 3'-ARO (Figure 1). Chez le rat adulte, un produit d'amplification, correspondant à la taille attendue (289 pb) est présent non seulement dans les cellules de



**Figure 1 : Amplification du messenger du cytochrome P450 aromatase (P450arom) dans les cellules testiculaires purifiées du rat adulte. Les produits d'amplifications sont déposés sur un gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium. La RT-PCR est réalisée avec 250 ng d'ARN de : cellules de Leydig (dépôt 1), cellules de Sertoli (dépôt 2), spermatoocytes pachytènes (dépôt 3), spermatoïdes ronds (dépôt 4), spermatozoïdes (dépôt 5). Les dépôts 6 et 7, contiennent respectivement 250 ng d'ARN extrait du muscle jambier de rat (témoin négatif) et 40 ng d'ARN d'ovaire de rat (témoin positif). Le dépôt 8 représente un contrôle interne (ARN remplacé par de l'eau) et M correspond au marqueur de taille 1/Hind III (Appligène).**

Leydig et de Sertoli mais également dans les trois catégories de cellules germinales (spermatoocytes pachytènes, spermatoïdes ronds et spermatozoïdes testiculaires) ainsi que dans l'ovaire de rat adulte, mais il est absent dans le muscle (témoin négatif). Le séquençage du fragment présent dans les cellules testiculaires ainsi que celui de l'ovaire montrent 100% d'homologie avec la séquence de l'ADN d'ovaire de rat publiée par Hickey et al [21].

En utilisant la RT-PCR quantitative nous avons pu comparer la quantité d'ARNm du cytochrome P450arom dans les cellules germinales avec celle des cellules de Leydig et de Sertoli chez le rat (Tableau 2). Dans les cellules de Leydig purifiées du rat âgé de 20 et 90 jours, le taux d'ARNm de l'aromatase est identique ( $36 \times 10^{-3}$  amoles/ $\mu\text{g}$  d'ARN) contrairement aux cellules de Sertoli où le taux d'ARNm chez l'immaturo est de  $72 \times$

$10^{-3}$  amoles/ $\mu\text{g}$  d'ARN (résultats non montrés), ce taux est 20 fois supérieur à celui des cellules de Sertoli de rat mature. Dans les cellules germinales, le taux d'ARNm dans les spermatoocytes pachytènes est de  $367 \times 10^{-3}$  amoles/ $\mu\text{g}$  d'ARN et cette valeur est 3 fois supérieure à celle des spermatoïdes ronds ; dans les spermatozoïdes ce taux est inférieur à  $10^{-3}$  amoles/ $\mu\text{g}$  d'ARN (limite de détection de notre méthode).

## 2. Mise en évidence de la protéine (cytochrome P450 arom) et mesure de l'activité enzymatique

En utilisant un anticorps anti-cytochrome P450arom humain, nous avons démontré l'existence d'une protéine de poids moléculaire voisin de 55 kDa dans les tubes séminifères ainsi que dans une suspension hétérogène de cellules germinales (spermatoocytes pachytènes et spermatoïdes ronds) du rat mature (résultats non montrés).

Après incubation avec de l'androstènedione tritiée, les activités aromatasés des fractions microsomiales sont de 0,62 ; 0,46 et 2,96 pmoles/mg de protéine/h respectivement dans les spermatoocytes, les spermatoïdes et les spermatozoïdes ; dans les cellules de Leydig l'activité aromatase se situe aux environs de 5 pmoles (Tableau 2). Il est à noter que ces valeurs sont mille fois inférieures à celle du placenta humain pris comme témoin positif.

## DISCUSSION

Chez le rat adulte, nous avons démontré la capacité des cellules germinales et des cellules de Leydig et de Sertoli à exprimer le gène de l'aromatase et ainsi confirmé les données précédentes obtenues chez la souris [24, 41]. En utilisant une méthode très sensible, la RT-PCR quantitative, nous avons observé que le niveau basal d'expression de l'aromatase dans les cellules de Leydig n'évolue pas quel que soit l'âge, alors qu'il diminue fortement dans les cel-

**Tableau 2 : Activité aromatasase et taux d'ARNm du cytochrome P450 aromatasase dans les cellules testiculaires du rat mature.**

	Activité aromatasase	Taux d'ARNm P450arom
Testicule	3,125 ± 0,193	-
Cellules de Leydig	5,075	36,20 ± 3,40
Tubes séminifères	1,250 ± 0,135	-
Cellules germinales	1,533 ± 0,154	-
Spermatocytes pachytènes	0,620 ± 0,109	367,20 ± 76,60
Spermatides rondes	0,467 ± 0,050	117,60 ± 22,00
Spermatozoïdes	2,963 ± 0,695	< 1
Cellules de Sertoli	-	3,60 ± 0,30
Muscle	0,142 ± 0,006	ND
Placenta humain	2403 ± 400	-

ND : non détectable

Activité aromatasase : pmoles / mg protéine / h

ARNm: 10<sup>-3</sup> amoles / µg d'ARN total

lules de Sertoli (résultats non montrés ; [34]). Par contre dans les cellules germinales, l'expression de l'ARNm est 3 fois plus élevée dans les spermatocytes pachytènes par rapport aux spermatides rondes ; ces taux de messager sont par ailleurs 10 à 100 fois plus élevés que dans les cellules somatiques du testicule de même âge. La mesure de l'activité enzymatique et la révélation de la protéine à l'aide d'un anticorps spécifique dans les cellules germinales viennent compléter les résultats sur l'expression du gène de l'aromatase et plaident donc pour l'existence d'un autre lieu de synthèse et d'activité pour cette enzyme dans les cellules germinales du rat, plus précisément les spermatides et les spermatozoïdes [32]. Ces résultats sont d'autant plus plausibles que la présence de récepteurs aux androgènes, substrat nécessaire à l'enzyme, a été rapportée dans les spermatides du rat [58]. La complémentarité de nos observations relatives à l'existence d'une aromatasase biologiquement active dans les cellules germinales du rat est à associer à celles rapportées chez la souris [41], l'ours [56] mais également chez le coq [28].

Si on compare le taux d'ARNm du cytochrome P450arom et l'activité aromatasase dans

les cellules germinales, on constate un décalage entre le niveau d'expression et l'activité biologique. La régulation de l'expression du gène de l'aromatase dans les cellules testiculaires au cours du développement, notamment la maturation du messager du P450arom semble être progressive depuis le stade spermatocyte jusqu'au spermatozoïde ce qui est en accord avec les observations de Hess [20] démontrant que 6 jours s'écoulent entre la synthèse d'ARNm dans les spermatides rondes et le début de l'activité enzymatique qui persistera durant 12 jours en absence de message mesurable. Toutefois, la présence d'une aromatasase biologiquement inactive (non glycosylée) dans les cellules germinales plus jeunes et l'influence de modulateurs paracrine et/ou endocrine sur cette expression peuvent être évoqués.

Si la synthèse testiculaire d'oestrogènes est indiscutable, le mécanisme d'action de ces hormones implique l'existence de récepteurs [40] qui ne sont pour le moment décrits que dans les cellules de Sertoli et de Leydig [25]. Concernant le rôle des oestrogènes dans les cellules germinales bien qu'aucune preuve de récepteur ne soit connue, des évidences très fortes plaident

en faveur d'un contrôle positif puisque chez des souris dépourvues en récepteur aux oestrogènes (ER knock-out), même si le tractus génital se développe normalement, une hypofertilité des souris mâles a été notée en association avec une diminution du nombre et de la motilité des spermatozoïdes [16, 35]. On peut aussi évoquer le rôle paracrine négatif exercé par les cellules germinales sur l'aromatase sertolienne [5, 17, 31] via l'expression du protooncogène *c-fos* largement présent des les cellules de Sertoli et les cellules germinales chez les rongeurs [22, 45].

Ainsi dans le développement et le maintien de la lignée spermatogénétique, en dehors des gonadotropines et de la testostérone, les oestrogènes seraient également impliqués et ceci est en accord avec des observations faites chez le mouton où une corrélation positive entre oestradiol intratesticulaire et nombre de spermatogonies a été observée (M.T.Hochereau-de Reviere, communication personnelle). Enfin au niveau de l'épididyme, il y a 20 fois plus d'oestradiol dans le fluide de la tête epididymaire que dans le sang chez le rat [26] et la présence de récepteurs aux oestrogènes plus spécialement au niveau de la tête, est bien établie [13] ce qui est en rapport avec l'activité aromatisation des spermatozoïdes qui est forte dans la région apicale de cet organe chez la souris [24]. En somme, en dehors des cellules de Leydig et de Sertoli du rat qui conservent la possibilité d'exprimer l'enzyme, une aromatisation fonctionnelle a été décrite dans les cellules germinales comme cela avait été rapporté dans de nombreuses espèces et cette source supplémentaire d'oestrogènes dans le testicule semble importante dans le développement de la lignée germinale tout comme dans le maintien de la fonction epididymaire. Le rôle exact des oestrogènes dans les voies reproductrices du rat mâle ainsi que la régulation de l'expression du gène de l'aromatase pendant le développement testiculaire restent à clarifier.

Ces résultats et ceux de la littérature mettent donc en évidence l'expression pluricellulaire du gène de l'aromatase dans le testicule du rat mais aussi chez la souris, l'ours, le coq et confirment la synthèse d'oestradiol dans les cellules germinales du mâle, notamment les spermatozoïdes. Même si le rôle de l'aromatase et des oestrogènes reste incertain (on ne connaît pas bien les cibles et peu de données sont disponibles concernant les gènes oestrogène-sensibles dans le tractus génital mâle), il est à noter que dans l'infertilité masculine, la tête epididymaire (cible des oestrogènes) est souvent impliquée [19] ; donc mieux connaître le rôle de ces hormones dans cette région est capital pour la mise au point de futurs traitements, comprendre les effets néfastes des oestrogènes (lésion epididymaire) et développer de nouvelles approches contraceptives. Ces données plaideraient pour l'existence d'un nouveau compartiment endocrine testiculaire, les cellules germinales, et compte tenu des anomalies rencontrées dans la spermatogenèse chez des animaux déficients en récepteur aux oestrogènes et chez l'homme porteur de tumeurs testiculaires, les oestrogènes (et/ou le rapport androgènes/oestrogènes) joueraient un rôle dans le développement testiculaire et pourraient représenter un nouveau marqueur de l'infertilité [36] et/ou de l'hypofertilité [39] masculine.

## REFERENCES

1. ALMADHIDI J., SERALINI, G.E., FRESNEL J., SILBERZAHN P., GAILLARD J.L. : Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. *J. Histochem. Cytochem.*, 1995, 43 : 571-577.
2. BELLVE A.R., CAVICCHIA J.C., MILLETTE C.F. et al. : Spermatogenic cells of the perpubertal mouse. *J. Cell. Biol.*, 1977, 74 : 68-85.
3. BENAHMED M. : Growth factors and cytokines in the testis. Dans : Comhaire F.H., ed. *Male infertility*. Chapman & Hall Medical, 1995 : 55-96.
4. BILINSKA B., LESNIAK M., SCHMLZ B. : Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens ? *Reprod. Fert. Dev.*, sous presse.

5. 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.
6. BOUJRAD N., HOCHEREAU de REVIERS M.T., CARREAU S. : Evidence for a germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat. *Biol. Reprod.*, 1995, 53 : 1345-1352.
7. CARREAU S. : L'Androgen Binding Protein (ABP) chez le rat, le bélier, le taureau et l'homme : analyse comparée. Dans: Forest M.G., Pugeat M., eds. *Protéines de liaison des hormones stéroïdes*. INSERM/J. Libbey, Eurotext Ltd, 1986, 149 : 293-303.
8. CARREAU S., PAPADOPOULOS V., DROSDOWSKY M.A. : Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology*, 1988, 122: 1103-1109.
9. 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.
10. CARREAU S. : Paracrine control of human Leydig cell and Sertoli cell functions. *Folia Histochem Cytobiol*, 1996, 34 (3) : 111-119.
11. CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, 162 : 156-159.
12. CONLEY A.J., CORBIN C.J., HINSHELWOOD M.M. et al. : Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biol. Reprod.*, 1996, 54 : 497-505.
13. 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.
14. De JONG F.H., HEY A.H., Van Der MOLEN H.J. : Oestradiol-17 $\beta$  and testosterone in rat testis tissue : effect of gonadotrophins, localization and production *in vitro*. *J. Endocrinol.*, 1974, 60 : 409-419.
15. DORRINGTON J.H., ARMSTRONG D.T. : Follicle stimulating hormone stimulates oestradiol-17 $\beta$  synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72 : 2677-2681.
16. 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.
17. FOUCAULT P., DROSDOWSKY M.A., CARREAU S. : Germ cell and Sertoli cell interactions in human testis : evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Human Reprod.*, 1994, 9 : 2062-2068.
18. FREE M.J., JAFFE R.A. : Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biol. Reprod.*, 1979, 20 : 269-278.
19. HENDRY W.F., PARSLow J.M., STEDRONSKA J. : Exploratory scrotomy in 168 azoospermic males. *Br. J. Urol.*, 1983, 55 : 785-791.
20. HESS R.A., BUNICK D., BAHR J.M. : Sperm, a source of estrogen. *Environ. Health Perspect.*, 1995, 103 : 59-62.
21. 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 region. *Mol. Endocrinol.*, 1990, 4 : 1-12.
22. HYDERS.M., STANCEL G.M., LOOSE-MIRCHELL D.S. : Presence of an estradiol response region in the mouse *c-fos* oncogene. *Steroids*, 1991, 56 : 498-504.
23. INKSTER S., YUE W., BRODIE A. : Human testicular aromatase : immunocytochemical and biochemical studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 80 : 1941-1947.
24. 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.
25. KORACH K.S. : Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 1994, 266 : 1524-1527.
26. KUMARI G.L., ALLAG I.S., DAS R.P., DATTA J.K. : Regional differences in steroidogenesis and hormone levels in the epididymis and vas deferens of adult rats. *Int. J. Androl.*, 1980, 3 : 267-281.
27. KUROSUMI M., ISHIMURA K., FUJITA H., OSAWA Y. : Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. *Histochemistry*, 1985, 83 : 401-404.
28. 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.
29. LEJEUNE H., SANCHEZ P., SAEZ J.M. : Enhancement of long-term testosterone secretion, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450 side chain cleavage, 17 $\alpha$  hydroxylase and aromatase mRNAs in normal human Leydig cells by coculture with human Sertoli cell-enriched preparations. 8th European Testis Workshop, de Panne, 1994, A 36.



30. LEJEUNE H., JEGOU B., CARREAU S., SAEZ J.M. : Régulation paracrine et autocrine des fonctions testiculaires. In: Belaish J., Drosdowsky M.A., Vermeulen A., Eds. *Endocrinologie sexuelle de l'homme*. Doin-Paris, 1996, 7 : 77-103.
31. Le MAGUERESSE B., JEGOU B. : Possible involvement of germ cells in the regulation of oestradiol-17 $\beta$  and ABP secretion by immature rat Sertoli cells (in vitro studies). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 141 : 861-869.
32. LEVALLET J., MITTRE H., SERALINI G.E., LEYMARIE P., CARREAU S. : L'aromatase testiculaire chez le rat: apport de la RT PCR dans l'étude de la localisation cellulaire de l'enzyme. *Ann. Endocrinol.*, 1995, 56 (4) : 280.
33. LEVALLET J., MITTRE H., CARREAU S. : Germ cells and somatic cells of adult rat testis express functional P450 aromatase. *Mol. Cell. Endocrinol.* (soumis pour publication).
34. LEVALLET J., CARREAU S. : Expression du gène de l'aromatase dans les cellules testiculaires du rat. *C. R. Acad. Sc.* (soumis pour publication).
35. LUBAHN D.B., MOYER J.S., GOLDING T.S., COUSE J.F., KORACH K.S., SMITHIES O. : 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.
36. MARIE E., VENDRELY E., de REVIERS M., CARREAU S. : Stéroïdes plasmatiques et intratesticulaires : existe-t-il des corrélations avec la spermatogenèse chez l'homme fertile et infécond. *Ann. Endocrinol.*, 1995, 56 (4) : 337.
37. MEISTRICH M.L., LONGTIN J., BROCK W.A., GRIMES S.R., MACE M.L. : Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol. Reprod.*, 1981, 25 : 1065-1077.
38. MARTEL C., MELNER M.H., GAGNE D., SIMARD J., LABRIE F. : Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase (3 $\beta$ -HSD), 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase and aromatase activities in the Rhesus monkey. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1994, 104 : 103-111.
39. NAKAZUMI H., SASANO H., MAEHARA I., OZAKI M., TEZUKA F., ORIKASA S. : Estrogen metabolism and impaired spermatogenesis in germ cell tumors of the testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996, 81 : 1289-1295.
40. 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 : 121-128.
41. NITTA H., BUNICK D., HESS R.A. et al. : Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*, 1993, 132 : 1396-1401.
42. PAPADOPOULOS V., CARREAU S., DROSDOWSKY M.A. : Effects of phorbol ester and phospholipase C on LH-stimulated steroidogenesis in purified rat Leydig cells. *FEBS lett.*, 1985, 188 : 312-316.
43. PAPADOPOULOS V., CARREAU S., SZERMAN-JOLY E., DROSDOWSKY M.A., DEHENNIN L., SCHOLLER R. : Rat testis 17 $\beta$ -estradiol : identification by gas chromatography - mass spectrometry and age-related cellular distribution. *J. Steroid Biochem.*, 1986, 24 : 1211-1216.
44. PAPADOPOULOS V., DROSDOWSKY M.A., CARREAU S. : On the existence of two Leydig cell populations in aged human testis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 513 : 356-359.
45. 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.
46. 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.
47. POMERANTZ D.K. : Effects of in vivo gonadotropin treatment on estrogen levels in the testis of the immature rat. *Biol. Reprod.*, 1979, 21 : 1247-1255.
48. POMERANTZ D.K. : Developmental changes in the ability of follicle stimulating hormone to stimulate estrogen synthesis in vivo by the testis of the rat. *Biol. Reprod.*, 1980, 23 : 948-954.
49. PUDNEY J., CANICK J.A., CLIFFORD N.M., KNOPP J.B., CALLARD G.V. : Location of enzymes of androgen and estrogen biosynthesis in the testis of the ground squirrel. *Biol. Reprod.*, 1985, 33 : 971-980.
50. ROMMERTS F.F.G., de JONG F.H., BRINKMANN A.O., Van Der MOLEN H.J. : Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J. Reprod. Fert.*, 1982, 65 : 281-288.
51. SAEZ J.M., SANCHEZ P., BERTHELON M.C., AVALLET O. : Regulation of pig Leydig cell aromatase activity by gonadotropins and Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, 1989, 41 : 813-820.
52. SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 1977, 74 : 5463-5467.

53. SIMPSON E.R., MAHENDROO M.S., MEANS G.D. et al. : Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.*, 1994, 15 : 342-355.
54. THOMPSON E.A. Jr., SIITERI P.K. : Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249 : 5364-5372.
55. TSAI-MORRIS C.H., AQUILANO D.R., DUFAU M.L. : Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology*, 1985, 116 : 38-46.
56. TSUBOTA T., NITTA H., OSAWA Y. et al. : Immunolocalization of steroidogenic enzymes, P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -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.
57. VERHOEVEN G., CAILLEAU J. : Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that inhibits induction of aromatase activity in Sertoli cells. *Endocrinology*, 1988, 123 : 2100-2110.
58. 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 : 2307-2316.

## ABSTRACT

### Germ cell aromatase : any relevant physiological role ?

S. CARREAU, J. LEVALET

The ability of the male gonad to convert androgens into estrogens is well known. According to age, aromatase activity has been already measured in immature and mature rat Leydig cells as well as in Sertoli cells. Recently, in different studies, a cytochrome P450<sub>arom</sub> has even been immunolocalized not only in Leydig cells but also in germ cells of mouse, brown bear and rooster whereas in pig, ram and human the aromatase is mainly present in Leydig cells. Our purpose was to investigate the testicular cell distribution of cytochrome P450<sub>arom</sub> mRNA in adult rat using RT-PCR. With

2 highly specific primers located on exons 8 and 9, we have been able to amplify a 289 bp aromatase fragment not only in Leydig cells and Sertoli cells but more importantly in highly-enriched preparations of pachytene spermatocytes, round spermatids and testicular spermatozoa. These amplified products showed 100% homology with the corresponding fragment of the rat ovary cDNA. In parallel, using an anti-human cytochrome P450<sub>arom</sub> antibody we have demonstrated the presence of a 55 kDa protein in seminiferous tubules and crude germ cell (pachytene spermatocytes and round spermatids) preparation of the mature rat. After incubation with tritiated androstenedione, the aromatase activities in the microsomal fractions were  $3.12 \pm 0.19$  pmoles/mg/h in the testis,  $1.25 \pm 0.13$  in the seminiferous tubules and  $1.53 \pm 0.15$  in the crude germ cells. In purified testicular spermatozoa the aromatase activity was  $2.96 \pm 0.69$  pmoles/mg/h and found to be 5-fold higher when compared to that of either purified pachytene spermatocytes or round spermatids. Using a quantitative RT-PCR method with a standard cDNA 29 bp shorter, we have compared the amount of cytochrome P450<sub>arom</sub> mRNA in mature rat Leydig cells and Sertoli cells. In purified Leydig cells from 90 day-old rats the P450<sub>arom</sub> mRNA level was :  $36.2 \pm 3.4 \times 10^{-3}$  amoles/ $\mu$ g RNA whereas in Sertoli cells the mRNA level was 10 fold lower. In pachytene spermatocytes, round spermatids and testicular spermatozoa the P450<sub>arom</sub> mRNA levels were respectively  $367.2 \pm 76.6$ ,  $117.6 \pm 22.0$  and  $<1 \times 10^{-3}$  amole/ $\mu$ g RNA.

In conclusion we have demonstrated that the P450 aromatase is present not only in Sertoli cells and Leydig cells from mature rat testis but a biologically active aromatase exists also in germ

**cells (pachytene spermatocytes, round spermatids and spermatozoa). The existence of an additional source of estrogens within the genital tract of the male is now well documented and**

**that suggests a putative role for these hormones during the male germ cell development.**

*Key words : Aromatase, estrogen(s), RT-PCR, germ cells, rat.*