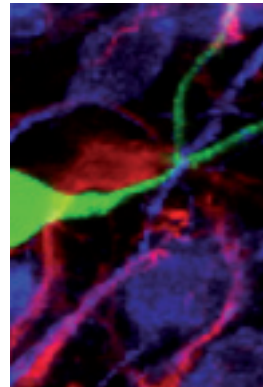


mTORC1 et sirolimus

Un lien avec la fertilité

Pauline Tartarin, Pascal Froment

► La protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est une kinase très conservée au cours de l'évolution. Elle intègre plusieurs signaux liés à la disponibilité en acides aminés et à la voie de signalisation de l'insuline, à travers deux complexes multiprotéiques : mTORC1 et mTORC2. mTOR est donc sensible à la disponibilité en énergie (ATP) et en nutriments présents dans la cellule, ce qui confère aux complexes mTORC1 et mTORC2 un rôle de senseurs métaboliques importants des êtres vivants. Le complexe mTORC1 est sensible à un médicament, la rapamycine ou sirolimus, une molécule aux propriétés antiproliférative et immunosuppressive, prescrite à la suite de greffes d'organes. Toutefois, quelques études ont montré que ce traitement peut conduire à des effets secondaires sur la fertilité. Cette revue décrit les rôles potentiels de la protéine mTOR aux différents niveaux de l'axe reproducteur. ◀



Unité physiologie
de la reproduction
et des comportements,
UMR 6073 Inra-CNRS-université
F. Rabelais de Tours,
37380 Nouzilly, France.
tartarin@gmail.com
pfroment@tours.inra.fr

mTORC1 et mTORC2 selon les sous-unités régulatrices qui les constituent (sous-unité raptor [*regulatory associated protein of TOR*] et sous-unité rictor [*rapamycin-insensitive companion of TOR*], respectivement). Cette sérine/thréonine kinase est conservée au cours de l'évolution puisqu'elle est également présente chez la levure, les plantes, et les insectes, reflétant son rôle primordial. L'inhibition de mTOR par la rapamycine s'effectue via la fixation d'un complexe rapamycine/immunophiline/FK506-binding protein 12 (FKBP12) à mTOR. Chez la souris, l'inactivation de mTOR est létale dès 6,5 jours *post-coitum* (jpc), avec une réduction de la taille embryonnaire et une désorganisation des tissus dès 5,5 jpc [4]. L'équipe du Pr David Sabatini (Cambridge, États-Unis) a également développé des lignées de souris invalidées pour chaque sous-unité des complexes mTORC1 et 2 [5]. Les embryons murins invalidés pour la protéine raptor ne sont pas capables de se développer après leur implantation utérine (6,5 jpc), démontrant l'importance du complexe mTORC1 dès les stades précoces du développement. Les embryons invalidés pour la protéine rictor (complexe mTORC2) sont eux capables de se différencier, mais ils présentent un retard important de taille et des défauts du développement vasculaire, conduisant à une létalité embryonnaire (10,5 jpc).

Sirolimus : origine, propriétés et cibles

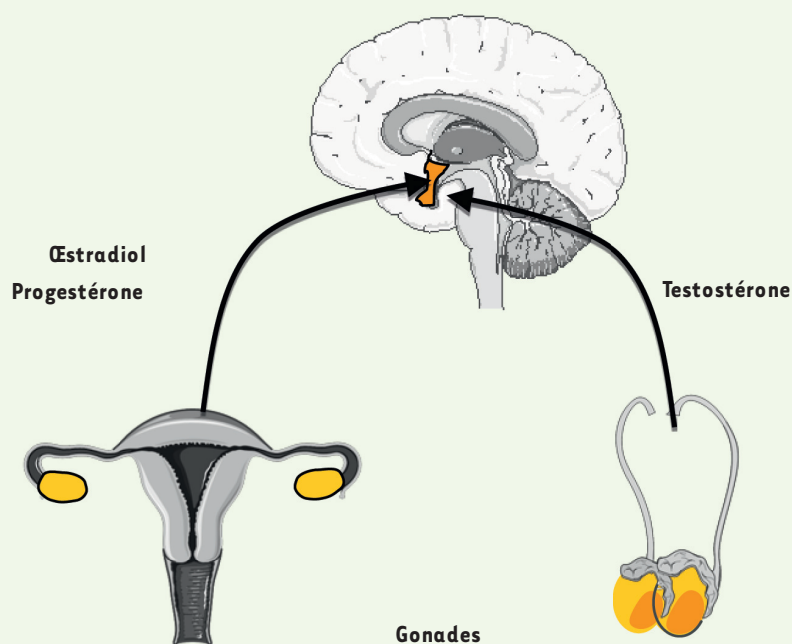
En 1964, la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* est isolée à partir de prélèvements de sol de l'île de Pâques. Elle sécrète un macrolide aux propriétés antifongiques, appelé rapamycine, en référence à Rapa Nui, l'ethnie polynésienne autochtone de l'île [1, 31]. À la fin des années 1990, une autorisation de mise sur le marché (AMM) est délivrée à la molécule pour ses propriétés immunosuppressives, qui est exploitée sous le nom de sirolimus ou rapamune.

En parallèle, des propriétés antiprolifératives de la rapamycine ont été démontrées, faisant de cette molécule un régulateur important de la croissance cellulaire [32]. Deux gènes homologues cibles, appelés *target of rapamycin 1* et 2 (*TOR1* et *TOR2*), ont d'abord été identifiés chez la levure [2]. Chez les mammifères, un seul gène, appelé *mTOR* pour *mammalian TOR* [3], a été isolé en 1994. mTOR est une kinase intégrée dans deux complexes appelés

Sirolimus : cibles cellulaires gonadiques et centrales

Les complexes mTORC régulent la croissance et la prolifération cellulaires, notamment en fonction de la disponibilité des nutriments et de l'état de l'environnement, via des messagers hormonaux et de stress. Les gonades sont des tissus où la prolifération et l'apoptose ont une place primordiale, notamment pour gérer la population de cellules germinales. Par exemple, chez l'homme, la production journalière de spermatozoïdes est d'environ 100 millions par testicule. Au contraire, le stock d'ovocytes est d'environ 400 dans l'ovaire, et 99 % des follicules qui entrent en croissance vont régresser, conduisant à la perte

Vignette (Photo © Inserm - Vincent Prévot).

**Diminution**

Taille de l'ovaire (rat, *in vivo*)
 Follicules ovulés (souris, *in vivo*)
 Croissance folliculaire (femme, *in vitro*)
 Prolifération de la thèque (rat, *in vivo*)
 Prolifération de la granulosa (rat, *in vitro*)
 Activité aromatasase (rat, *in vivo*)

Augmentation

Kystes ovariens (femme, *in vivo*)
 Aménorrhées (femme, *in vivo*)

Pas de modification

Œstradiol (rat, *in vitro* ; femme, *in vivo*)

Diminution

Testostérone (homme, *in vivo*)
 Protéine c-kit (souris, *in vitro*)
 Spermatozoïde (homme, *in vivo*)
 Stimulation de la FSH (rat, *in vitro*)
 Synthèse protéique (rat, *in vitro*)

Augmentation

Protéine Star (rat, *in vitro*)

Figure 1. Représentation schématique des actions de la rapamycine dans les gonades. La nomenclature *in vitro* fait référence à des expériences en système cellulaire.

de leurs cellules germinales [6]. Ces régulations du cycle cellulaire font intervenir des facteurs locaux et endocriniens, ainsi que le statut physiologique de l'organisme. Ainsi, dès le début des années 1990, le rôle important de la voie de l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*)/insuline dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire a été établi [7]. En 2000, plusieurs travaux ont montré l'influence majeure du métabolisme énergétique sur les fonctions de reproduction [8, 9]. Dans ces deux cas, les complexes protéiques impliquant la kinase mTOR interviennent. D'ailleurs, l'impact des traitements immunosuppresseurs (sirolimus/rapamycine) sur les taux de paternité [10] ou maternité [11], que traduisent des anomalies hormonales, séminales, ou morphologiques (kystes), est un outil d'alerte épidémiologique important.

mTORC1 et mTORC2 : structures, régulations et fonctions

La protéine mTOR (également appelée FRAP ou RAFT) appartient à la famille des phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-related kinase (PIKK). Elle est composée de plusieurs domaines, dont deux domaines HEAT (abréviation de *Huntingtin*, *EF3*, *A subunit of PP2A*, *TOR1*) qui permettent son interaction avec raptor ou rictor, et un domaine FRB (FKBP12/*rapamycin binding domain*) qui lie le complexe FKBP12-*rapamycine*. La rapamycine (ou sirolimus) agit en se liant à la protéine FKBP12 qui inhibe l'activité sérine/thréonine kinase de la protéine mTOR sur son domaine FRB.

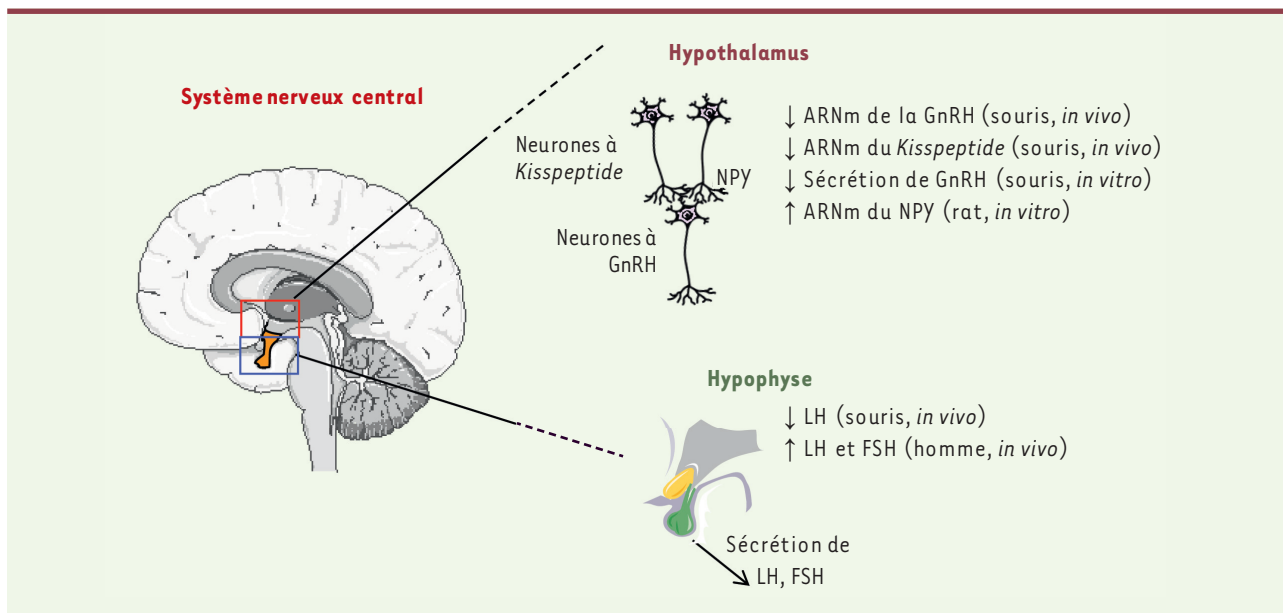


Figure 2. Représentation schématique des actions de la rapamycine au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La nomenclature *in vitro* fait référence à des expériences en système cellulaire.

Le complexe mTORC1 désigne l'association de la protéine mTOR et de plusieurs protéines régulatrices : raptor, mLST8 (*mammalian lethal with sec13 protein 8*), deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) et PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40-kDa*). Le complexe mTORC2 est constitué des protéines mTOR, rictor, Sin1 (*stress-activated map kinase-interacting protein 1*), protor (*protein observed with rictor*) et mLST8.

Les premières études ont montré que seul le complexe mTORC1 est inhibé par la rapamycine alors que le complexe mTORC2 est dit résistant. Récemment, plusieurs travaux ont indiqué que le complexe mTORC2 est également inhibé lors d'une exposition prolongée à la rapamycine [12]. Toutefois, il semblerait que cette sensibilité du complexe mTORC2 soit dépendante du type cellulaire étudié.

L'activation du complexe mTORC1 peut s'effectuer de différentes façons : (1) par les voies de signalisation impliquant PI3K/Akt/TSC1-TSC2 (*tuberous sclerosis protein 1 and 2*) et Ras/Raf/ERK (*extracellular regulated kinase*), qui sont souvent associées aux récepteurs à activité tyrosine kinase (par exemple le récepteur de l'IGF-1, de l'insuline et de l'EGF [*epidermal growth factor*]); (2) par la disponibilité de la cellule en certains acides aminés, comme la leucine ou l'arginine. À l'inverse, un déficit énergétique (manque d'ATP) active la protéine AMPK (*AMP activated kinase*) qui phosphoryle le complexe mTORC1 et l'inhibe.

Impact du sirolimus sur la fonction testiculaire

Quelques années après la mise sur le marché du sirolimus (ou rapamycine) comme immunosuppresseur, plusieurs études ont décrit son impact sur la fertilité des patients traités. Chez l'homme, il s'agit d'une baisse significative du taux de testostérone plasmatique ainsi que d'une augmentation des sécrétions des hormones gonadotropes

LH (*luteinizing hormone*) et FSH (*follicle-stimulating hormone*), dont l'intensité est fonction de la dose et de la durée du traitement [13]. Une baisse de la quantité de sperme [14], voire une absence de production de spermatozoïdes [15], ont été également rapportées. Chez l'homme, certains cas d'infertilité induite par le sirolimus ont été réversibles après l'arrêt du traitement [15]. Toutefois le petit nombre de cas décrits ne permet pas d'affirmer la restauration d'une spermatogenèse normale après l'arrêt du traitement par des inhibiteurs de mTOR.

Chez le rat, le sirolimus administré par voie orale ou intraveineuse est retrouvé dans les testicules. Cette molécule pourrait donc jouer un rôle direct sur les cellules souches germinales, mais également sur les cellules de Sertoli qui sont les cellules nourricières et protectrices des cellules germinales. Ainsi, le traitement de cultures primaires de spermatogonies de souris par la rapamycine réduit l'activation de la voie de signalisation du récepteur c-kit [16], dont le ligand SCF (*stem cell factor*) est un régulateur bien connu de la prolifération et de la maturation des cellules germinales souches dans les tubes séminifères. La stimulation de la multiplication des cellules souches germinales par des facteurs de croissance comme le SCF, mais aussi le PLZF, (*promyelocytic leukemia zinc finger*), pourrait donc être dérégulée si le complexe mTORC1 est soit hyperactivé, soit inhibé.

Par ailleurs, les cellules de Sertoli seraient elles aussi sensibles à cet inhibiteur, puisque, dans des cultures

primaires de cellules de Sertoli de rats prépubères traitées par la FSH, la stimulation de la machinerie de traduction qui en résulte est transmise (en partie) par l'activation de mTORC1 [17, 33]. Par exemple, dans ces cultures primaires, la rapamycine bloque la stimulation de la synthèse de la transferrine induite par l'interleukine 1 β . La transferrine est nécessaire au transport du fer de la circulation sanguine vers les cellules germinales *via* les cellules de Sertoli, mais également à la régulation de la spermatogenèse *via* le mécanisme de phagocytose. Ainsi, la baisse de son expression induit une augmentation de la phagocytose sertolienne, corrélée à une oligospermie sévère [18].

Chez les patients traités par la rapamycine, la baisse de testostérone qui est observée ne semble pas liée à une action directe sur les cellules testiculaires de Leydig qui produisent les androgènes. En effet, le prétraitement par la rapamycine de cultures primaires de cellules de Leydig de rat stimulées par la LH augmente principalement l'expression de la protéine StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) - qui transporte le cholestérol dans la mitochondrie - ce qui n'est pas observé lors d'une stimulation par la LH seule [19].

Impact du sirolimus sur la fertilité chez la femelle

Données cliniques

Chez la femme comme chez l'homme, plusieurs études ont montré qu'un traitement immunosuppresseur basé sur du sirolimus aurait un impact sur la fertilité notamment en dérégulant le cycle œstrien [20]. En effet, des épisodes d'oligoménorrhée ou d'aménorrhée, et/ou des kystes ovariens sont détectés chez près de 50 à 60 % des patientes traitées par du sirolimus, mais seulement 20 à 30 % des individus sains. Dans le cadre d'une greffe, une combinaison d'immunosuppresseurs est utilisée associant sirolimus et analogues de la rapamycine, tels que le tacrolimus ; tous les deux se lient aux immunophilines comme FKBP12. Toutefois, cette association d'immunosuppresseurs (tacrolimus et sirolimus) n'est pas complètement spécifique de mTORC1, ce qui rend plus difficile la distinction des effets propres de l'inhibition de mTORC1 sur l'appareil reproducteur chez la femme. Cependant, dans le traitement de la maladie autosomique dominante polykystique des reins (ADPKD), seul le sirolimus est prescrit et les femmes traitées souffrent aussi d'une dérégulation de leurs cycles œstriens (52 % des patients de la cohorte) associée à une augmentation de la fréquence des kystes ovariens (57 %) [21, 34]. Le complexe mTORC1 semble donc être impliqué dans la fonction ovarienne, mais à quels niveaux et dans quels types cellulaires ?

Données expérimentales *in vitro*

La protéine mTOR est exprimée dans la plupart des cellules de l'ovaire, avec des niveaux plus élevés dans l'épithélium de surface de l'ovaire, dans les cellules de la granulosa et dans les ovocytes immatures. Il est intéressant de noter que la grande majorité des cancers de l'ovaire sont d'origine épithéliale. Les cellules de la granulosa sont les cellules somatiques qui entourent le follicule ; elles sont stéroïdogènes et permettent la croissance et la maturation folliculaires. Les cellules les plus externes du follicule, les cellules de la thèque, produisent les androgènes, précurseurs de l'œstradiol synthétisé par les cellules de la granulosa.

Chez la rate, la voie mTOR activée stimule la prolifération (induite par la FSH) des cellules de la granulosa [22] et celle des cellules de la thèque (induite par la LH) [23]. L'inhibition de mTORC1 dans des cultures primaires de cellules de la thèque induit une baisse d'expression des marqueurs de prolifération, tels que PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) ou la cycline D3, et ce malgré l'induction de la prolifération par de l'hCG (*human chorionic gonadotropin*) qui mime l'effet de la LH [23]. Par ailleurs, l'injection intrapéritonéale de rapamycine chez la souris entraîne une augmentation des mitoses anormales des cellules de la granulosa des follicules préantraux. La perturbation de la prolifération de ces cellules conduit à une diminution, proportionnelle à la dose, des follicules ovulés. Cependant, ces follicules ne montrent pas d'anomalies fonctionnelles *in vitro*, les ovocytes peuvent être fécondés et se développer jusqu'au stade blastocyste [24]. La culture de bandes de cortex ovarien chez la femme est également sensible à la rapamycine [25]. En effet, l'ajout de rapamycine pendant les six jours de culture inhibe la croissance des follicules et augmente le nombre de follicules de petite taille, voire dépourvus d'ovocyte. Cette inhibition n'est pas corrélée à une augmentation de l'apoptose, mais bien à une baisse de la multiplication cellulaire.

En 2004, Alam *et al.* [26] démontrent que la différenciation des cellules de la granulosa, induite par la FSH, implique la voie PI3K/mTOR. En effet, l'ajout de rapamycine à des cultures primaires de cellules de granulosa de rates prépubères inhibe l'expression de protéines caractéristiques des cellules différenciées de la granulosa : l'inhibine α , le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et le récepteur de la LH. Par la suite, de nombreux travaux ont complété cette étude démontrant l'implication de la voie mTOR dans la stéroïdogénèse (induite par la combinaison FSH + TGF β 1) de cellules de la granulosa de rates cultivées *in vitro*. Cependant, dans cette dernière étude, mTOR ne semble pas être impliquée dans la synthèse d'œstradiol déclenchée par une simple stimulation par la FSH. Chez la femme comme chez les rongeurs, Cure *et al.* [20] ne mettent pas en évidence de modification de la synthèse d'œstradiol suite à un traitement par du sirolimus et du tacrolimus.

L'utilisation de modèles animaux a permis d'améliorer la compréhension du mode d'action du sirolimus *in vivo* puisqu'en 2011, Shivaswamy *et al.* [27] ont montré qu'une injection de sirolimus en sous-cutané à des rates pubères dérégulait le cycle œstrien : durée du cycle augmentée ; ovaire de plus petite taille, mais avec des traces de corps jaunes, indicatrices de cycles

ovulatoires. La production de testostérone n'est pas modifiée par l'injection de sirolimus (2 mg/kg/jour), mais entraîne une baisse de l'expression de l'aromatase, enzyme qui transforme les androgènes en œstrogènes, suggérant une hyperandrogénie chez ces femelles [27].

Inhibiteurs de mTOR et cancer ovarien

L'utilisation d'inhibiteurs de mTOR de dernière génération, combinés ou non à d'autres traitements hormonaux, est néanmoins prometteurs dans le traitement des cancers de l'ovaire [35]. En effet, la voie PI3K/Akt/mTOR est fréquemment hyperactivée dans les cancers ovariens, ce qui augmente l'agressivité de ces cancers. L'utilisation de la rapamycine dans les cultures de cellules de cancer ovarien diminue la prolifération cellulaire et l'activation des cibles de mTORC1, dont la phosphorylation de la protéine S6 qui est impliquée dans la synthèse protéique. L'administration d'un dérivé de la rapamycine, l'évérolimus, à une lignée de souris transgéniques qui développent spontanément des cancers épithéliaux de l'ovaire, retarde l'apparition de ces tumeurs et en réduit le nombre [28]. Un nouveau traitement prometteur - de type BEZ235 -, qui cible le complexe mTOR ainsi que le complexe PI3K, est en cours de développement. Chez la souris, ce traitement réduit plus fortement la croissance tumorale au niveau de l'ovaire que les analogues de la rapamycine, *via* une expression accrue de protéines inhibitrices du cycle cellulaire, telles que p27 [29]. De même, il a été montré que la rapamycine agit en synergie avec l'hormone anti-mullérienne pour inhiber le cancer ovarien, aussi bien chez la souris que chez la femme.

Action du sirolimus au niveau du système nerveux central

Enfin, la voie mTOR contrôlerait également la reproduction par son action au niveau hypothalamique, puisque l'injection intracérébroventriculaire de rapamycine à des rates pubères entraîne une diminution de moitié de la concentration plasmatique de LH 1 h après injection, et de 10 fois 3 h après injection [30]. Cette baisse est corrélée à une baisse des ARN messagers codant pour la GnRH dans l'hypothalamus, mais également pour le *Kisspeptide* (une neurohormone stimulant la sécrétion du GnRH) [30]. La même injection à des rats prépubères induit un retard de puberté aussi bien chez le mâle que la femelle, ainsi qu'une diminution du poids de l'épididyme, des vésicules séminales et de la prostate sept jours après injection [30]. Les expériences *in vitro* sur une lignée de cellules hypophysaires de souris ont montré que la stimulation de la synthèse protéique induite par la GnRH était inhibée par la rapamycine.

À l'inverse, l'injection intracérébroventriculaire de L-leucine (un acide aminé qui active mTORC1) à des rates pubères induit une augmentation de la concentration plasmatique de LH de plus de quatre fois 15 min après l'injection, et d'environ deux fois 1 h après l'injection. L'hypothalamus est une région intégratrice de différents signaux régulant l'appétit, la fertilité et la thermogénèse. À ce niveau, les neurones à NPY (neuropeptide Y) qui interviennent dans la régulation de la prise alimentaire mais inhibent également l'activité des neurones à GnRH, sont sensibles à la voie mTOR. Ainsi, dans des cultures organotypiques

d'explants hypothalamiques, l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine entraîne une augmentation du taux des transcrits de NPY. Il semble donc que, dans les structures centrales régulant le déclenchement de la puberté et/ou la pulsativité des hormones gonadotropes, l'inhibition de mTOR entraîne une dérégulation du système à GnRH.

En conclusion, il semble donc que la voie de signalisation de la protéine mTOR soit impliquée dans la production de gamètes, le fonctionnement des cellules somatiques gonadiques (Figure 1), mais également la régulation de la fertilité au niveau du système nerveux central ou de l'hypophyse (Figure 2). L'accumulation, depuis quelques années, des travaux mettant en évidence les impacts négatifs de la rapamycine sur la fertilité mâle et femelle doit alerter les prescripteurs sur la possibilité de ces effets secondaires, notamment lorsque les patients sont confrontés à des problèmes de procréation, sans toutefois sous-estimer les intérêts évidents de la rapamycine dans la thérapie anticancéreuse, comme dans le cas des cancers ovariens. ♦

SUMMARY

mTORC1 and Sirolimus: a link with fertility

mTOR (mammalian target of rapamycin), a protein kinase highly conserved, is the catalytic subunit of two complexes, mTORC1 and mTORC2. These complexes are regulated by amino acids availability, by insulin and growth factors signaling pathways. Thus, mTORC1 and mTORC2 complexes are essential sensors of the cellular nutrient and energy levels in living organisms. mTORC1 is sensitive to rapamycin (also known as sirolimus), a drug prescribed in case of organ transplantation (kidney) due to its immunosuppressive and anti-proliferative properties. However, some studies have shown that the rapamycin treatment can induce fertility disorders. Thus, this article reviews the mTOR involvement in the male and female reproductive axis. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Dutcher JP. Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 6382S-7S.
2. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991 ; 253 : 905-9.
3. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, et al. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994 ; 78 : 35-43.
4. Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, et al. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 6710-8.

