

Université de Montréal

Modèles de dysfonction érectile chez le rat

par

Frédéric Mampouma Mantsouaka

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en pharmacologie

Avril 2009,

© Frédéric Mampouma Mantsouaka, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Modèles de dysfonction érectile chez le rat

présenté par
Frédéric Mampouma Mantsouaka

a été évalué par un comité de jury composé par des personnes suivantes :

Maja Krajinovic, présidente-rapporteuse
Denis deBlois, directeur de recherche
Mohamed Benderdour, membre du jury

Résumé

Des modèles de dysfonction érectile (DE) ont été développés et étudiés chez le rat. Cependant, peu de choses sont connues dans certains modèles présentant des facteurs de risque de la DE, en l'occurrence le rat soumis à une diète riche en glucose, le rat avec une restriction de croissance intra-utérine (RCIU) et le rat avec l'infusion continue de l'angiotensine (Ang) II en ce qui concerne l'évaluation de la fonction érectile *in vivo*. C'est ainsi que nous nous sommes proposés cette étude. La fonction érectile a été mesurée par la stimulation électrique du nerf caverneux à des cohortes de rats mâles Sprague-Dawley de différents âges comme suit: 1) des rats jeunes de 12 semaines d'âge, adultes reproducteurs à la retraite d'environ 30 semaines d'âge et des rats de 27 et 29 semaines soumis à une diète riche en glucose par l'eau de breuvage (10%) à court (1 semaine), moyen (6 semaines) et long (12 ou 13 semaines) termes; 2) des rats jeunes âgés de 12 semaines recevant une infusion soit de l'Ang II (200ng/kg/min) soit de la saline par mini-pompes osmotiques sous-cutanées pendant 1 et 2 semaines; et 3) des rats adultes âgés de 36 semaines avec une RCIU. La fonction érectile a été représentée par des courbes de variations de pression intracaverneuse (PIC) et d'aire sous la courbe (ASC) normalisées avec la pression artérielle moyenne (PAM) en réponse à la stimulation nerveuse à différents volts. À la fin des expériences, les animaux ont été sacrifiés, le sang recueilli pour le dosage de la glycémie et de l'insulinémie; le pénis, l'aorte thoracique et le cœur prélevés à des fins d'analyses protéique et histologique. La diète riche en glucose à court terme a eu un effet néfaste sur la fonction érectile chez le jeune rat mais bénéfique chez le rat adulte reproducteur; de même que pour les études à long terme, la diète riche en glucose a amélioré ou renversé la DE associée au vieillissement. Les rats avec RCIU ont exhibé une baisse très significative de la fonction érectile. Ces détériorations ou améliorations de la fonction érectile avec le glucose ou dans la RCIU ont été principalement associées à des modifications de l'expression de l'Akt, en plus d'une augmentation de l'insuline sérique dans les groupes avec le glucose. L'Ang II a entraîné une baisse de la fonction érectile, statistiquement très significative après 1 semaine et maintenue après 2 semaines de traitement, sans causer des changements morphologiques au cœur et à l'aorte thoracique. En conclusion : l'atteinte du système érectile se fait précocement dans les complications cardiovasculaires liées à l'activation du SRA, l'implication de l'Akt dans la modulation de la fonction érectile dépend de type de vieillissement et de la diète, le RCIU est un facteur de risque pour la DE.

Mots-clé : DE, Ang II, glucose, RCIU, vieillissement

Abstract

Rat is a most rodent used for erectile function studies, and many erectile dysfunction (ED) rat models have been developed and studied. However, according to our knowledge, erectile function has never been studied in high-glucose fed rat model, intrauterine growth restriction rat model (IUGR) and continuous angiotensin (Ang) II infusion rat model. In this context, we set up this study. We measured simultaneously mean arterial pressure (MAP), intracavernosal pressure (ICP), area under the curve (AUC); and erectile function was obtained by variations of the ratio ICP/MAP and AUC/MAP in response to electrical stimulation of cavernosal nerve (0.89 – 6.50 Volts) in male Sprague-Dawley rats in different protocols as follow: 1) young (12 week old), procreator adult (~30 week old) and adult (27 and 29 week old) rats randomized and fed with high-glucose diet in water (10%) or simple water for a short (1 week), middle (6 weeks) and long (12 and 13 weeks) terms; 2) adult (36 week old) IUGR rats; 3) young (12 week old) rats randomized and received a chronic infusion of AngII (200 ng/kg/min) or saline by osmotic minipumps for 1 and 2 weeks. At the end of procedures, blood for measuring serum glucose and insulin in rats with chronic high-glucose diet was obtained, the heart was excised and left ventricle was weighed. Aorta and penis were excised, cleaned and a section of each was formalin fixed for histological studies and the rest snap frozen for protein studies. The short term high-glucose diet impacted negatively in young rats but positively in procreator adult rats; also, the erectile function was improved or reversed by chronic high-glucose diet in adult rats. We also observed a diminished erectile function in RCIU. The improvement or deterioration of erectile function was associated with changes in Akt expression, besides an increased insulin serum in rats with high-glucose diet. A diminished erectile function was observed after 1 week continuous Ang II infusion and was maintained after 2 week infusion without detectable structural changes on heart and aorta. In conclusion: this study suggests that erectile system is a precece cible of cardiovascular complications of renin-angiotensin system. High-glucose diet deteriorates erectile function but masks the ageing induced-ED, RCIU is associated with ED in later life. Akt involvement in erectile function modulation depends on aging type and the diet.

Key-words : ED, Ang II, glucose, IUGR, aging

Table des matières

Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 La dysfonction érectile.....	2
1.1.1 Définition.....	2
1.1.2 Rappel sur la structure pénienne.....	2
1.2 Mécanisme de l'érection : relaxation du muscle lisse pénien.....	4
1.2.1 Régulation centrale.....	5
1.2.2 Régulation périphérique.....	6
1.2.2.1 Voie de signalisation par NO/ GMPc/ PKG.....	6
1.2.2.2 Autres composants.....	8
1.3 Contraction du muscle lisse pénien : flaccidité.....	10
1.3.1 Noradrénaline.....	12
1.3.2 Endothéline-1.....	13
1.3.3 Voie de la RhoA/Rho kinase.....	14
1.3.4 Angiotensine II.....	17
1.3.5 Voie des MAP kinases.....	18
1.3.6 Autres molécules vasoconstrictrices.....	19
1.4 Épidémiologie de la DE.....	20
1.4.1 Prévalence et incidence.....	20
1.4.2 Causes et facteurs de risque.....	20
1.4.2.1 Diabète.....	22
1.4.2.2 Hypertension.....	28
1.4.2.3 Vieillesse physiologique.....	29
1.4.2.4 Restriction de croissance intra-utérine et petit poids à la naissance.....	30
1.5 Traitements actuels de la DE.....	33
1.5.1 Approche pharmacologique.....	34
1.5.2 Approche thérapeutique par des facteurs de croissance.....	34
1.5.3 Approche thérapeutique par des gènes.....	35
1.5.4 Approche thérapeutique par médecine régénérative.....	35
Chapitre 2 But et Hypothèses.....	36
Chapitre 3 Méthodologie.....	37
3.1 Animaux et traitements.....	37
3.2 Mesure de la fonction érectile.....	38

3.3	Évaluation de l'indice de l'hypertrophie cardiaque.....	40
3.4	Mesure de la glycémie et de l'insuline à jeun.....	41
3.5	Évaluation d'expressions protéiques par Western Blot.....	41
3.5.1	Extraction et dosage des protéines.....	42
3.5.2	Immunobuvardage de type Western.....	42
3.5.3	Quantification d'expressions protéiques sur des tissus péniens.....	43
3.6	Analyses statistiques.....	43
Chapitre 4	Résultats.....	45
4.1	Effet d'une diète riche en glucose sur la fonction érectile, sur des expressions protéiques dans les tissus péniens et sur le ratio PVG/PC.....	45
4.1.1	Après 1 semaine chez le rat jeune et chez le rat adulte reproducteur à la retraite.....	45
4.1.2	Après 6, 12 et 13 semaines chez le rat adulte	47
4.2	Influence de la RCIU sur la fonction érectile et sur des expressions protéiques.....	52
4.3	Effet inhibiteur de l'Ang II sur la fonction érectile après 1 et 2 semaines de traitement.....	54
Chapitre 5	Discussion.....	58
Chapitre 6	Conclusion.....	62
Chapitre 7	Bibliographie.....	63

Liste des tableaux

Chapitre 4. Résultats

Tableau 1 Poids corporel et prise de poids, glucose et insuline sériques après 6, 12 et 13 semaines de diète riche en glucose	52
--	----

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1.1 Illustration de l'anatomie du pénis chez l'homme.....	3
Figure 1.2 Représentation schématique de la voie de signalisation principale aboutissant à l'érection.....	7
Figure 1.3 Représentation schématique du mécanisme moléculaire par lequel la noradrénaline et l'endothéline-1 induisent la contraction du muscle lisse pénien.....	13
Figure 1.4 Représentation schématique expliquant la voie de la RhoA/Rho kinase dans le maintien de la contraction du muscle lisse.....	16
Figure 1.5 Représentation schématique suggérant le rôle d'ERK 1/2 dans la régulation de l'érection pénienne.....	19
Figure 1.6 Représentation schématique illustrant la transduction du signal à partir de l'IGF-1 conduisant à la synthèse du NO	25
Figure 1.7 Représentation schématique montrant des changements structurels et fonctionnels par lesquels les facteurs de risque de la DE induisent la DE.....	33

Chapitre 3. Méthodologie

Figure 3.1 Représentation schématique illustrant le montage expérimental utilisé dans l'évaluation de la réponse érectile induite par la stimulation nerveuse <i>in vivo</i> dans un modèle de rat.....	40
--	----

Chapitre 4. Résultats

Figure 4.1.1. A et B. Fonction érectile chez le rat jeune et chez le rat adulte reproducteur après 1 semaine de diète riche en glucose.....	45,6
Figure 4.1.1.C. Expressions protéiques dans les tissus pénien après 1 semaine de diète riche en glucose chez le rat jeune.....	47
Figure 4.1.2 A, B et C. Fonction érectile chez le rat adulte après 6, 12 et 13 semaines de diète riche en glucose.....	48,9

Figure 4.1.2.D. Expressions protéiques dans les tissus péniens après 12 semaines de diète riche en glucose chez le rat adulte	50
Figure 4.1.2.E. Ratio PVG/PC après 6, 12 et 13 semaines de diète riche en glucose chez le rat adulte	51
Figure 4.2.1 Fonction érectile chez le rat adulte avec une RCIU.....	52
Figure 4.2.2. Expressions protéiques dans les tissus péniens des rats adultes avec une RCIU.....	53
Figure 4.3.A et B. Effet inhibiteur de l'Ang II sur la fonction érectile après un traitement de 1 et 2 semaines.....	54,5
Figure 4.3.C. Ratio PVG/PC après 1 et 2 semaines d'infusion chronique d'Ang II chez le rat jeune.....	56
Figure 4.3.D. Aire de section et nombre de cellules sur des coupes de l'aorte thoracique après 1 semaine d'infusion d'Ang II.....	57

Liste des abréviations

AC : adénylate cyclase

AGE : produit terminal de la glycation avancée

AMP(c) : adénosine monophosphate (cyclique)

Ang II : angiotensine II

ASC : aire sous la courbe

DE : dysfonction érectile

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ET-1 : endothéline 1

GC(s) : guanylate cyclase (cyclique)

GEF : guanosine exchange factor

GM(T)P(c) : guanosine mono(tri)phosphate (cyclique)

JNK : c-jun N-terminal kinase

MAP : mitogen activated protein

MLC(P,K) : (phosphatase,kinase de la) chaîne légère de myosine

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NA : noradrénaline

NO : monoxyde nitrique

(e,n)NOS : monoxyde nitrique synthase (endothéliale,neuronale)

$O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde

$ONOO^-$: peroxydinitrite

PAM : pression artérielle moyenne

PDE : phosphodiesterase

PG : prostaglandine

PI3(ou IP₃)K : phosphatidylinositol 3 (ou inositol triphosphate) kinase

PC : poids corporel

PIC : pression intracaverneuse

PK : phospho kinase

PVG : poids du ventricule gauche

RCIU : restriction de croissance intra-utérine

ROS : espèce réactive d'oxygène

SRA : système rénine-angiotensine

STZ : streptozocine

VIP : polypeptide intestinal vasoactif

Remerciements

J'aimerais, avant tout, remercier mon directeur de recherche, Docteur Denis deBlois, de m'avoir accepté afin d'étudier et d'évoluer dans son laboratoire. Je tiens à souligner son sens de responsabilité, sa participation active dans ma formation. Dr deBlois a été un pédagogue qui m'a encadré avec une intelligence remarquable tout le long de mes études et mes recherches de maîtrise. Il est, pour moi, un exemple à suivre. J'aimerais aussi remercier Docteur Serge Carrier, pour m'avoir transmis ses connaissances précieuses dans les techniques utilisées. Son enseignement a été d'une grande importance dans la réalisation de ces travaux. Sans oublier, Dre Michèle Brochu pour le développement du modèle de rats avec une restriction de croissance intra-utérine utilisé.

Je tiens aussi à dire merci à tous les membres du laboratoire du Docteur deBlois qui m'ont assisté et soutenu dans la réalisation de ce projet de recherche, plus particulièrement à Taben Hale pour ses suggestions judicieuses et son expertise ; à Sonia Deschênes pour sa patience et son aide sans cesse, sans oublier Julie-Émilie Huot-Marchand. Merci à Michelle Gagné et Eman Abdou pour leur soutien moral et aide. Merci à Houda Tahiri pour des travaux complémentaires.

Pour terminer, j'aimerais également remercier ma famille et mes proches, en l'occurrence Xiaoling Li, Christian Mampouma, Nabassnogo Ouédraogo, Mbuyi Kabongo, Anaëlle Atti pour m'avoir épaulé et offert le support dans les moments les plus difficiles. Sans oublier ma fille Natacha Mampouma-Li, qui est pour moi une source de joie et d'encouragement. Ma réussite ne peut être dissociée de vous.

Chapitre 1

Introduction

La dysfonction érectile (DE) est un problème de la santé publique qui affecte sérieusement la qualité de vie des patients et de leurs partenaires (NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence 1993). Il est connu qu'elle peut entraîner de la frustration, la perte de la confiance en soi et de l'estime de soi, de la dépression, bref tout problème influençant le bon fonctionnement de l'organisme. Elle est devenue, depuis un certain temps, une préoccupation du fait de l'évidence grandissante de son association à des maladies coronariennes ; et aujourd'hui, l'on s'accorde de plus en plus au fait qu'elle serait un marqueur précoce des maladies cardiovasculaires. Des études épidémiologiques montrent que presque 75% des hommes avec la maladie coronarienne ont aussi de la DE (Solomon, Man, and Jackson 2003; Kloner et al. 2003), et que des troubles vasculaires dépendants ou non de l'endothélium sont présents chez les hommes avec la DE sans histoire de maladies cardiovasculaires (Kaiser et al. 2004) ou en l'absence de l'atteinte de la circulation coronarienne (Bocchio et al. 2004). Ce qui mène à dire que devant un cas de DE, pratiquer la prévention cardiaque à long terme serait vraisemblablement aussi sinon plus importante que traiter la DE.

Chez l'animal, plusieurs modèles de DE ont été développés et fait l'objet d'études. Cependant, très peu de choses sinon rien n'est connu dans certains modèles présentant des facteurs de risque de la DE, à savoir le modèle de rat avec infusion continue de l'angiotensine (Ang) II, le modèle de rat soumis à une diète riche en glucose et le modèle de rat avec restriction de croissance intra-utérine (RCIU) en ce qui concerne l'évaluation de la fonction érectile *in vivo*.

C'est ainsi que nous nous sommes proposés cette étude qui vise à développer des modèles de rat avec des facteurs de risque de la DE et d'en évaluer la fonction érectile.

1.1 Dysfonction érectile

1.1.1 Définition

La présence de la dysfonction érectile (DE) demeure quelque peu subjective et ambiguë. En effet, la DE reflète souvent l'absence des performances sexuelles d'un homme pour faire face à ses propres attentes qui sont, en retour, influencées par des facteurs culturels et sociaux (Mulhall et al. 2001). Néanmoins, on s'accorde sur la définition recommandée en 1993 par la *NIH Consensus Development Panel*, qui considère la DE comme étant l'incapacité persistante à accomplir ou maintenir une érection suffisante pour satisfaire des relations sexuelles (NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence 1993). Il est suggéré que cela doit durer pendant au moins 3 mois pour établir ce diagnostic, excepté les cas de DE induite par trauma ou intervention chirurgicale.

L'érection est un processus biologique complexe qui comporte plusieurs composants et qui fait intervenir des mécanismes centraux qui régulent le désir sexuel et l'excitabilité, ainsi que des mécanismes locaux produisant la tumescence du pénis, sa rigidité, l'orgasme et l'éjaculation. L'érection pénienne normale nécessite des processus physiologiques incluant, entre autres, une augmentation du flux artériel pénien par médiation neurologique, une relaxation du muscle lisse caverneux et une restriction du flux veineux pénien (Giuliano et al. 1995).

1.1.2 Rappel sur la structure pénienne

Le corps cylindrique du pénis est constitué de trois cylindres : un au centre, le corps spongieux, et un de chaque côté latéral pour un total de deux, les corps caverneux. Chez l'homme, les deux corps caverneux, gauche et droit, sont séparés par le septum. Au centre des corps caverneux se trouve l'artère caverneuse. Le pénis est enveloppé de trois couches de tissus superposées qui sont de l'intérieur vers l'extérieur: 1) la tunique élastique ou le fascia du pénis, 2) la tunique musculaire constitué de fibres musculaires lisses et contenant les artères et les nerfs dorsaux profonds ainsi que la veine dorsale profonde et 3) la peau qui recouvre, à la partie superficielle et dorsale, la veine dorsale superficielle. Le tissu érectile, le

corps caverneux, est composé de muscle lisse qui tapisse les espaces lacunaires (sinusoïdes) qui, eux, sont tapissés par l'endothélium (Figure 1.1).

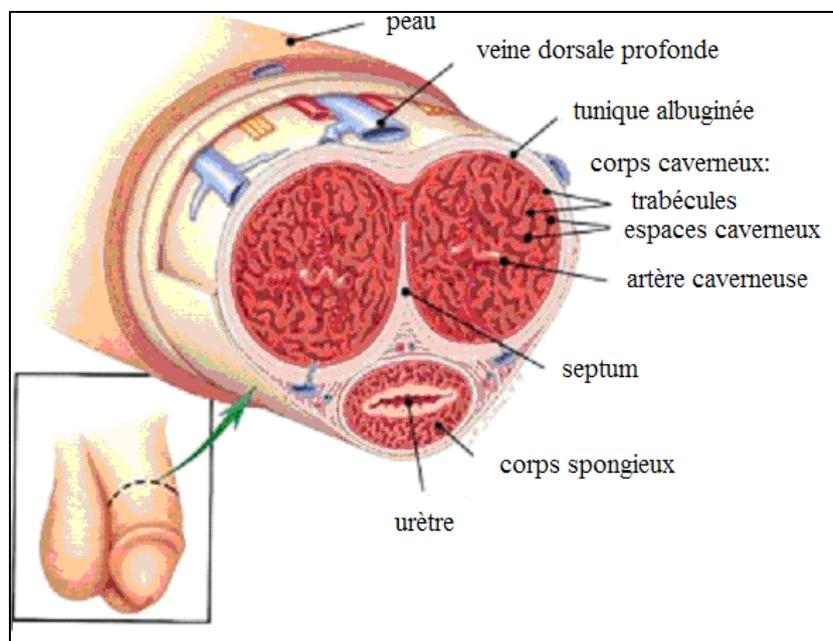


Figure 1.1 Illustration de l'anatomie du pénis chez l'homme. Ici on peut voir les structures importantes du pénis : les corps caverneux (trabécules et espaces caverneux), le corps spongieux, l'artère caverneuse, la veine dorsale profonde, la tunique albuginée. Tiré et adapté de (<http://www.penishints.com/assets/images/penis-anatomy.jpg>).

Le pénis reçoit l'innervation motrice des systèmes sympathique et parasympathique, qui constituent le système nerveux végétatif ou autonome. L'innervation sympathique provient de la moelle épinière dorsolombaire (thoracolombaire chez le rat). Les fibres sympathiques pré-ganglionnaires parviennent au pénis via les nerfs splanchniques lombaires ou via la chaîne sympathique paravertébrale. Les fibres sympathiques post-ganglionnaires parviennent au pénis par l'intermédiaire de diverses voies. L'une d'elles commence avec le nerf hypogastrique, qui s'étend jusqu'au plexus pelvien, d'où prend naissance le nerf caverneux qui s'étend au pénis ; une autre voie est la chaîne sympathique paravertébrale qui se lie au plexus pelvien via le nerf pelvien et au pénis via le nerf caverneux ; et la dernière part de la chaîne sympathique paravertébrale et parvient au pénis via le nerf pudendal (Giuliano and Rampin 2004). La compréhension de ces voies est importante d'autant plus que le processus

de l'érection fait impliquer ces voies, en l'occurrence celle à partir du nerf caverneux. En effet, la stimulation électrique du ganglion pelvien ou du nerf caverneux, une technique qui est largement utilisée pour évaluer la fonction érectile chez l'animal anesthésié, peut entraîner une augmentation de la pression intracaverneuse qui peut être mise en évidence par la canulation intracaverneuse et enregistrée sous forme de courbe sur un écran lié à un système de transducteurs et logiciel approprié. Le système nerveux sympathique est impliqué dans la détumescence et peut contribuer au maintien du pénis dans l'état flaccide; alors que le système parasympathique, lui, est impliqué dans le processus de l'érection. Sous la stimulation, les terminaisons des fibres parasympathiques libèrent l'acétylcholine, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) et le monoxyde nitrique (NO) (Andersson 2001). Ces vasodilatateurs sont à l'origine de la relaxation du muscle lisse pénien qui aboutit à l'érection.

1.2 Mécanisme de l'érection : relaxation du muscle lisse pénien

L'érection est un mécanisme neurovasculaire qui est sous la modulation des facteurs psychologique et hormonal. D'une vue globale, le mécanisme de l'érection normale peut se présenter comme suit : sous la stimulation sexuelle, il y a libération de neurotransmetteurs vasodilatateurs à partir des terminaisons nerveuses au niveau des corps caverneux pénien et à partir de l'endothélium des sinusoides de ces corps caverneux. Ces vasodilatateurs relaxent les artères et artérioles du tissu pénien d'une part, et le muscle lisse trabéculaire d'autre part. La relaxation des artères et artérioles augmente le flux sanguin pénien et celle du muscle lisse trabéculaire la compliance des sinusoides. Ainsi, l'érection a lieu avec la dilatation des artères pénien et la relaxation du tissu pénien. De plus, le tissu érectile est encapsulé dans un tissu difficilement relaxable, la tunique albuginée, faisant de sorte que l'augmentation du flux sanguin au niveau du pénis augmente non seulement le volume pénien mais aussi la pression intrapénienne. Cette dilatation artérielle cause la compression mécanique des veines, empêchant la fuite du sang et entraînant ainsi la rigidité pénienne. La détumescence survient à la suite de la cessation de la libération des neurotransmetteurs, le clivage des seconds messagers ou la décharge sympathique durant l'éjaculation. La contraction du muscle lisse trabéculaire restaure l'évacuation du sang stocké dans le pénis à partir des veines, le sang se vide progressivement et c'est le retour du pénis à son état de flaccidité (Saenz de Tejada 2000).

L'érection est accomplie par la relaxation du muscle lisse caverneux. Qu'importe le contexte dans lequel elle se produit, l'érection normale résulte de l'augmentation de l'activité de la voie parasympathique et de la diminution de l'activité de la voie sympathique. Et tout facteur qui contribue à l'augmentation de l'activité sympathique va avoir un effet néfaste sur la fonction érectile contribuant ainsi au développement de la DE.

1.2.1 Régulation centrale

L'érection subit le contrôle du système nerveux central. Cependant, les cascades des mécanismes moléculaires en jeu ne sont pas aussi documentées de façon détaillée comme dans le cas de la régulation périphérique développée plus bas. Une variété de neurotransmetteurs; dont les plus importants incluant dopamine, noradrénaline et adrénaline, sérotonine et ocytocine; ont été identifiés dans la région préoptique médiale et dans des régions paraventriculaires de l'hypothalamus. Le rôle de la région préoptique médiale est de reconnaître les stimuli sensoriels à partir des centres cérébraux plus hauts et de les intégrer avec la motivation sexuelle et les programmes moteurs de copulation. Le noyau paraventriculaire joue un rôle clé dans la réponse érectile, la stimulation pharmacologique et électrique de ce noyau entraîne une décharge séminale chez les rats non anesthésiés, l'érection et l'éjaculation chez les rats anesthésiés (Stief 2003). Les signaux érectiles quittent le système nerveux central à partir de ces deux centres, et l'information est ainsi transférée via les neurones autonomes à la périphérie (Stief 2003). Alors que les récepteurs dopaminergiques et adrénergiques peuvent promouvoir l'excitation sexuelle, les récepteurs sérotoninergiques, quant à eux, l'inhibent (El-Sakka and Lue 2004; Giuliano and Rampin 2000). L'érection peut être induite par une variété de stimuli (tactile, visuel et olfactif) qui agissent sur les récepteurs sensoriels extéroceptifs et qui sont intégrés dans la moelle épinière ou dans des structures cérébrales plus hautes chez l'animal comme chez l'homme (Giuliano and Rampin 2004). La moelle épinière contient les trois groupes de motoneurones (sympathique thoracolombaire, parasympathique sacré et pudendal sacré) qui sont anatomiquement liés avec le pénis et fonctionnellement liés avec l'érection (Giuliano and Rampin 2004). L'érection a probablement lieu quand la convergence de l'information périphérique et supraspinale sur la moelle épinière entraîne une diminution de l'activité de la voie anti-érectile sympathique thoracolombaire d'une part, et une augmentation de la voie pro-érectile parasympathique

sacrée et de la voie pudendale d'autre part (Giuliano and Rampin 2004). Dans des modèles animaux, plusieurs études ont été faites pour approfondir les connaissances sur le contrôle central de l'érection. On a pu documenté que la microstimulation de la racine sacrée S1 de la moelle épinière entraînait des changements de pression du sinus caverneux chez le chat (Tai et al. 1998); que l'injection intrathécale de l'ocytocine au niveau de la moelle épinière lombosacrée chez le rat anesthésié entraînait des épisodes d'augmentation de la pression intracaverneuse (Giuliano et al. 2001); pour n'en citer que deux.

1.2.2 Régulation périphérique

1.2.2.1 Voie de signalisation par NO/ GMPc/ PKG

L'érection physiologique, induite sexuellement, est principalement médiée par la voie de NO/GCs (guanylate cyclase soluble)/GMPc (guanosine-3',5'-monophosphate cyclique)/PKG (phospho kinase G) et la détumescence survient principalement avec la dégradation de nucléotides cycliques, principalement le GMPc, par des phosphodiésterases (PDE), principalement la PDE5 (Lin, Lin, and Lue 2005). Le NO est un gaz qui diffuse dans les tissus cibles au sein desquels il active la GC et catalyse la formation du GMPc à partir du guanosine-5'-triphosphate, GTP (Verratti et al. 2007). Les nucléotides cycliques, AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et GMPc, sont d'importants seconds messagers intracellulaires impliqués dans la médiation de la relaxation du muscle lisse de divers organes, incluant le corps caverneux. L'activation de la GC engendre l'accumulation de GMPc; et celle de l'adénylate cyclase (AC), l'accumulation de l'AMPc. Alors que le GMPc active principalement la PKG mais aussi la phospho kinase A (PKA), l'AMPc active principalement la PKA et très médiocrement la PKG. Une fois activées, ces deux protéines stimulent la pompe à calcium se trouvant à la membrane du réticulum sarcoplasmique présent dans le cytoplasme de la cellule. Celle-ci s'ouvre et laisse entrer le calcium dans le réticulum sarcoplasmique. La réduction des concentrations de Ca²⁺ intracytoplasmique qui s'en suit a pour conséquence la relaxation du muscle lisse (Sazova et al. 2002). La PKG peut phosphoryler et activer la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) réduisant ainsi la sensibilité du tissu pénien au Ca²⁺, et elle peut également phosphoryler et inhiber la RhoA (Prieto 2008). Tout cela joue en faveur de l'érection. Dans le cas du processus de l'érection, le NO stimule la GC intracellulaire et déclenche la cascade d'événements comme suit (Fig. 1.2).

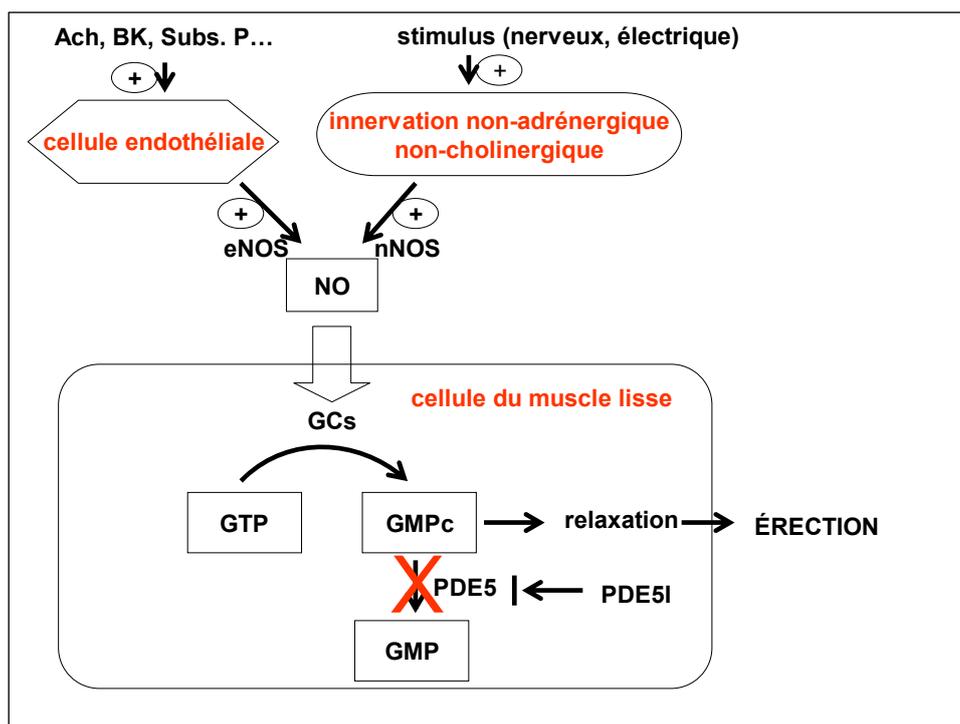


Figure 1.2 Représentation schématique de la voie de signalisation principale aboutissant à l'érection. *Ach*, acétylcholine; *BK*, bradykinine; *Subs. P*, substance P; *PDE5I*, inhibiteur de la phosphodiésterase de type 5. Sous la stimulation endothéliale ou nerveuse, il y a activation de la NOS endothéliale ou neuronale qui conduit à la formation du NO. Le NO est libéré et parvient dans la cellule du muscle lisse pénien, où il va stimuler la guanylate cyclase soluble (GCs). Celle-ci va catalyser la formation du GMPc à partir du GTP. Le GMPc va provoquer la relaxation du muscle lisse et l'érection subséquente. Le GMPc est progressivement dégradé par la PDE5. Les inhibiteurs de la PDE5 bloquent cette dégradation, maintenant ainsi le GMPc et prolongeant de ce fait l'érection.

Au niveau du pénis, le NO peut être synthétisé par les monoxyde nitrique synthases (NOS) neuronale ou endothéliale. La NOS neuronale (nNOS) est à l'origine de l'initiation de l'érection alors que la NOS endothéliale (eNOS), dont la phosphorylation et l'activation dépendent étroitement de la PI3K / PKG (encore appelé Akt), est à l'origine du maintien de l'érection (Hurt et al. 2002).

1.2.2.2 Autres composants

D'autres molécules vasodilatatrices du système nerveux non adrénérique non cholinérique, l'acétylcholine (ACh) et le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), peuvent déclencher la relaxation du muscle lisse pénien aboutissant à l'érection. L'ACh est nécessaire pour la transmission ganglionnaire (par les récepteurs nicotiques) et la relaxation du muscle lisse vasculaire (par les récepteurs muscariniques). Les nerfs cholinériques ainsi que les terminaisons nerveuses contenant des vésicules cholinériques ont été identifiés dans le corps caverneux et artères au niveau du pénis chez l'humain (Steers, McConnell, and Benson 1984; El-Sakka and Lue 2004). Il agit en activant l'endothélium qui, à son tour, libère le NO. Cette propriété a été exploitée et est largement utilisée dans l'évaluation de la fonction endothéliale dans le système isométrique de bains à organes isolés. Le VIP, un peptide endogène largement distribué partout à travers le corps humain, a un rôle fonctionnel dans le mécanisme de l'excitation sexuelle mâle même s'il n'est pas le principal médiateur non adrénérique non cholinérique de la tumescence et rigidité pénienne chez l'homme (Becker et al. 2002). Au niveau du pénis, des fibres nerveuses immunoréactives de VIP ont été identifiées dans le trabécule caverneux et les artères pénienne avoisinantes; par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste au VIP ou du sérum anti-VIP a inhibée la relaxation du muscle lisse induite par la neurostimulation (Ottesen et al. 1984; Kim et al. 1995; El-Sakka and Lue 2004). Contrairement au NO, l'effet vasorelaxant du VIP nécessite sa liaison avec un récepteur. Après la libération dans le corps caverneux, le VIP se lie d'abord à ses récepteurs pour ensuite stimuler l'activité de l'AC, dont l'accumulation entraîne celle de l'AMPC, ce qui active la PKA conduisant à la fermeture des canaux calciques et l'ouverture des canaux potassiques ; ce qui induit la relaxation du muscle lisse avec dilatation pénienne subséquente (Shen et al. 2005). Alors que la concentration de VIP dans le sang prélevé dans le corps caverneux montre une augmentation très significative, jusqu'à 20 fois plus élevée, durant la tumescence ; elle est diminuée dans le pénis des hommes avec la DE. Le VIP peut agir avec le NO comme un co-médiateur de l'érection. En dehors de la relaxation du muscle lisse caverneux par activation de l'AC ; le VIP aurait, par ailleurs, un effet probable sur le mécanisme veino-occlusif (Dinsmore et al. 1999).

Les phosphodiésterases (PDE) constituent une superfamille d'enzymes qui sont responsables de l'hydrolyse des enzymes impliquées dans la relaxation du muscle lisse, à savoir l'AMPC et

de la GMPc. De ces familles d'enzymes, aujourd'hui identifiées au nombre de 11, les PDE5, -6, -9 ont une grande sélectivité pour le GMPc; les PDE1, -2, -11 présentent la même affinité pour le GMPc que pour l'AMPc ; et les PDE3 et -10 sont sensibles au GMPc mais sélectifs pour AMPc (Wilkins et al. 2008). La régulation de l'activité et/ou de l'expression de ces PDE, principalement la PDE5, dans le pénis joue un rôle clé dans le processus du maintien de l'érection. La PDE5 régule la contraction du muscle lisse vasculaire via la régulation de la GMPc comme susmentionné; et deux tissus de l'organisme dans lesquels ce rôle est évident sont le poumon et le pénis (Bender and Beavo 2006). En inhibant sélectivement la PDE5 spécifique au GMPc, les inhibiteurs de la PDE5 comme le sildénafil et le vardénafil, compensent à la réduction de la biodisponibilité du NO, à la production du GMPc et à la mauvaise perfusion pénienne dans la DE, parvenant ainsi au maintien de l'érection (De Young et al. 2008).

Un des mécanismes par lequel se fait la relaxation du muscle lisse est l'ouverture des canaux potassiques (K^+) par hyperpolarisation des cellules. L'hyperpolarisation des cellules du muscle lisse via l'induction de la fermeture des canaux calciques (Ca^{2+}) voltage-dépendants ou via l'ouverture des canaux potassiques joue un rôle clé dans la circulation sanguine dans le pénis, constituant ainsi un composant important de la capacité érectile (Maggi et al. 2000; Melman and Gingell 1999). L'ouverture des canaux K^+ peut être provoquée par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (la PKA), par la protéine kinase dépendante du GMPc (la PKG) ou par le GMPc lui-même. L'hyperpolarisation cause la fermeture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, réduisant ainsi l'entrée du calcium à partir du compartiment extracellulaire. Une diminution de la concentration du calcium libre intracellulaire et une relaxation subséquente du muscle s'en suivent. Le NO semblerait être capable de stimuler directement l'ouverture des canaux K^+ et la pompe sodium ($Na^+-K^+-ATPase$), constituant ainsi un mécanisme de relaxation indépendant des nucléotides cycliques (Saenz de Tejada 2000).

Une oxygénation adéquate est une condition nécessaire pour la survie et le bon fonctionnement tissulaire, et le processus de l'érection n'en fait pas exception. L'oxygène est impliqué dans le mécanisme de l'érection pénienne via la régulation de la synthèse du NO dans le tissu caverneux et via la régulation d'autres substances vasoactives (Kwon et al. 1990; Verratti et al. 2007). La pression en oxygène, qui augmente pendant l'érection même en l'absence de la stimulation comme dans le cas des érections nocturnes par exemple, a un rôle important dans le maintien de l'intégrité du tissu caverneux (Moreland 1998). De plus, la

synthèse du NO médiée par l'eNOS nécessite la L-arginine et l'oxygène ; et celle des prostanoïdes vasodilatateurs, comme la PGE1 et la PGE2, par la cyclo-oxygénase dépend étroitement de la $[O_2]$. Alors qu'une augmentation de la pression en O_2 est associée à une élévation de PGE2 et une suppression de la synthèse du collagène induite par le *transforming growth factor* (TGF)- β 1 dans le corps caverneux chez l'humain comme chez l'animal, une baisse de la pression en O_2 peut diminuer le contenu du muscle lisse trabéculaire caverneux et conduire à une fuite veineuse diffuse (Dean and Lue 2005).

1.3 Contraction du muscle lisse pénien : flaccidité

Le pénis demeure à l'état flaccide la majorité du temps, un état caractérisé par la contraction du muscle lisse caverneux et par la diminution du flux sanguin dans le pénis. D'une manière générale, c'est la concentration du calcium intracellulaire et cytoplasmique qui contrôle le tonus des fibres musculaires ; augmenter cette concentration, en libérant le calcium des réserves intracellulaires et/ou en facilitant son entrée dans la cellule à partir du milieu extracellulaire, conduit à la contraction (Giuliano and Rampin 2004). Et le mécanisme à la base est le glissement des filaments musculaires fins, constitués principalement de l'actine, par rapport aux filaments musculaires épais, constitués principalement de la myosine. C'est le mouvement de ces protéines contractiles les unes à travers les autres et la mise en place des ponts actine-myosine qui constituent la propriété contractile du muscle.

Comme dans le cas de la relaxation du muscle lisse pénien ; la régulation d'un certain nombre de facteurs, incluant niveaux adéquats d'agonistes (neurotransmetteurs, hormones et dérivés endothéliaux), expression adéquate de récepteurs, intégrité des mécanismes de transduction, homéostasie du calcium, interaction entre les protéines contractiles et communication intercellulaire efficace entre les cellules du muscle lisse, est nécessaire pour maintenir le pénis flaccide (Christ 1995).

Le mécanisme intracellulaire de la régulation de la contractilité du muscle lisse pénien est associé à l'augmentation de la concentration des ions calciums libres intracellulaires ($[Ca^{2+}]_i$) d'une part et l'augmentation de la sensibilité au calcium sans changement de $[Ca^{2+}]_i$ d'autre part. L'augmentation de Ca^{2+} peut être due à une modification du potentiel membranaire

(initiation électromécanique) qui va provoquer l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et permettre l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire. Elle peut également résulter de la liaison d'un agoniste à un récepteur spécifique (initiation pharmacomécanique), ce qui augmente le taux de Ca^{2+} par la libération du calcium des réservoirs intracellulaires. D'abord, sous l'effet d'un stimulus, il y a l'activation de divers mécanismes de signalisation, tels que la PLC et le PI3, conduisant à la libération du calcium à partir des réserves intracellulaires telles que le réticulum sarcoplasmique et/ou l'ouverture des canaux calciques se trouvant sur la membrane des cellules du muscle lisse. Ceci entraîne l'entrée de calcium dans la cellule à partir de l'espace extracellulaire. L'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, habituellement transitoire, est suivie d'un retour de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à des niveaux proches de ceux de base alors que l'activité contractile est toujours présente. Cette augmentation transitoire conduit à l'activation de la kinase du complexe calcium-calmoduline des chaînes légères de la myosine (MLCK) qui initie la contraction du muscle lisse par la phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC). Ce mécanisme prend fin quand la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ retourne à des niveaux basaux alors que les voies de signalisation menant à la sensibilité du calcium prennent le dessus. Ces voies de l'augmentation de la sensibilité de calcium sans changement de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ impliquent la RhoA, qui active la Rho kinase. Ceci conduit au maintien du tonus musculaire (Somlyo and Somlyo 2000; El-Sakka and Lue 2004) dont les mécanismes seront détaillés plus bas.

Pour résumer, un certain nombre de molécules extracellulaires, à savoir la noradrénaline, l'endothéline et l'angiotensine II, sont principalement responsables du maintien de la contraction du muscle lisse caverneux. Ces molécules peuvent, via la liaison avec leurs récepteurs correspondants présents au niveau de la membrane cellulaire, activer la voie de signalisation faisant impliquer le calcium et la calmoduline (Figure 1.3). Elles peuvent aussi engendrer la contraction sans faire intervenir le calcium ni la calmoduline ; elles se lient alors à leurs récepteurs correspondants, cette fois-ci, au niveau de la membrane cytoplasmique et activent le *guanine exchange factor* (GEF) (Figure 1.4). Une fois activé, le GEF convertit le RhoA-GDP en RhoA-GTP. Le RhoA-GTP, qui est la forme active, déclenche une cascade de mécanismes via l'activation de la Rho kinase aboutissant à la contractilité pénienne (Lin et al. 2008). De ce fait, la voie de RhoA/Rho kinase, aujourd'hui bien documentée, constitue une voie d'une grande importance dans le maintien de la contractilité pénienne comme mentionné plus haut et détaillé plus bas.

1.3.1 Noradrénaline

La noradrénaline (NA), libérée à partir des nerfs sympathiques, agit sur les récepteurs post-synaptiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ pour causer la vasoconstriction ; et sur les récepteurs présynaptiques $\alpha 2$ pour causer la diminution de sa propre libération et celle du NO (Prieto 2008). La contraction des artères et du muscle lisse trabéculaire péniens est largement médiée par les récepteurs adrénergiques $\alpha 1$. La contraction médiée par les récepteurs $\alpha 2$ dépend de l'entrée du calcium du compartiment extracellulaire alors que l'activation des récepteurs $\alpha 1$ provoque initialement la libération du calcium intracellulaire avec l'entrée subséquente du calcium à partir de l'espace extracellulaire pour le maintien de la contractilité (El-Sakka and Lue 2004).

L'initiation de la contraction pénienne commence avec la libération de la NA à partir des nerfs sympathiques et la NA serait le principal neurotransmetteur de la contractilité du muscle lisse et des artères péniens (El-Sakka and Lue 2004). Une fois libérée, la NA se lie au récepteur adrénergique dans la membrane cytoplasmique des cellules du muscle lisse caverneux. Le récepteur adrénergique, dans son état de liaison avec le GTP active la PLC- β , qui entraîne la scission de l'inositol (4,5) biphosphate en PI3 et diacylglycérol (DAG). La liaison du DAG avec la PKC conduirait à la contraction du muscle lisse caverneux. Quant au PI3, sa liaison avec son récepteur dans le réticulum sarcoplasmique déclenche la libération du calcium à partir de celui-ci. Le calcium ainsi libéré se lie à la cadmoduline. Ce complexe calcium-cadmoduline se lie, à son tour, à la MLCK et conduit à l'activation de cette dernière. La MLCK phosphoryle la MLC. La MLC se lie à l'actine et l'active, ce qui entraîne la contraction (Lin et al. 2008) (Figure 1.3).

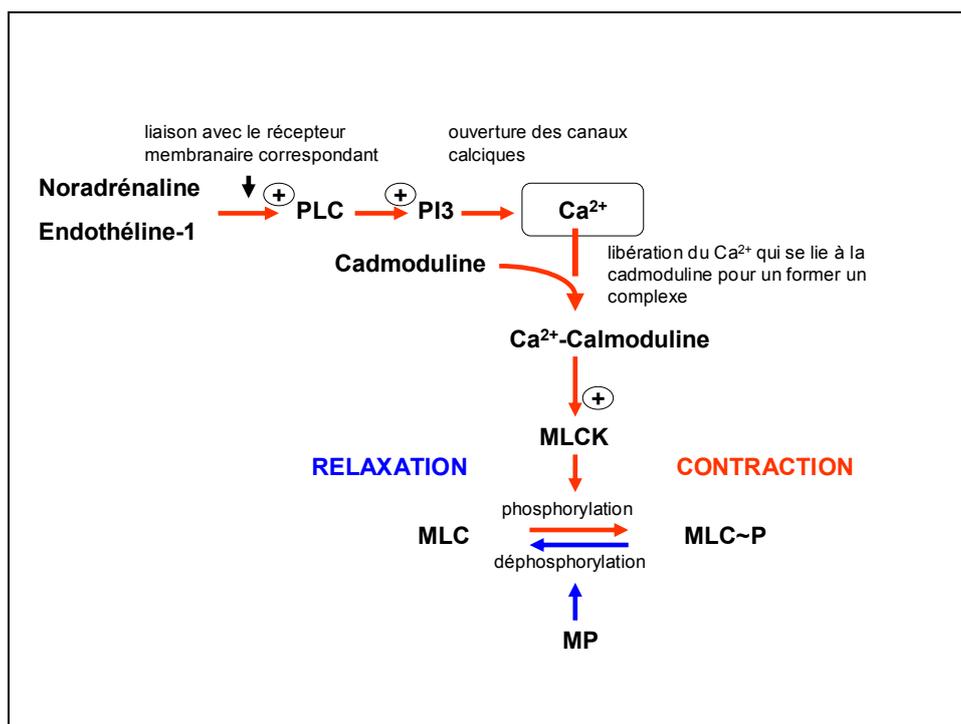


Figure 1.3 Représentation schématique du mécanisme moléculaire par lequel la noradrénaline et l'endothéline-1 induisent la contraction du muscle lisse pénien. *PLC*, phospholipase C ; *PI3*, inositol (1,4,5) triphosphate ; *MLC(K)*, (kinase de la) chaîne légère de la myosine ; *MP*, myosine phosphatase ; (+) = activation.

1.3.2 Endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) peut contribuer au tonus du muscle lisse vasculaire du pénis, agissant ainsi à l'encontre de l'érection pénienne. L'endothélium du corps caverneux du pénis peut synthétiser et libérer l'ET-1, et ses récepteurs ont été retrouvés dans le tissu caverneux aussi bien chez l'humain (Saenz de Tejada et al. 1991) que chez l'animal (Dai et al. 2000). Au niveau du tissu caverneux pénien, l'ET-1 peut se lier à deux types majeurs de récepteurs, ET_A et ET_B. Alors que le récepteur ET_B médie la vasorelaxation via l'eNOS, le récepteur ET_A est responsable de la vasoconstriction pénienne (Carneiro et al. 2008). Ainsi, la contraction du muscle lisse pénien par l'ET-1 se fait via le récepteur ET_A. Le mécanisme conduisant à la contraction pénienne est tel que la liaison de l'ET-1 au récepteur ET_A au niveau des cellules du muscle lisse entraîne une cascade d'événements, incluant entre autres, activation du

métabolisme de l'inositol phosphatase, élévation de niveaux de Ca^{2+} intracellulaires, activation de la PKC (Figure 1.3). L'ET-1 peut, par ailleurs, via l'activation de la voie de signalisation de la RhoA/Rho kinase, contribuer à la contractilité pénienne (Lin et al. 2008).

En plus d'induire la vasoconstriction, l'ET-1 stimule aussi la production de facteurs de croissance (GF), le dépôt de composants de la matrice extracellulaire, l'induction des espèces réactives d'oxygène (ROS), et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. Par ailleurs, elle active aussi des facteurs de transcription responsables d'une augmentation de la coordination de beaucoup de cytokines et enzymes ; cette augmentation accentue l'inflammation et les dommages tissulaires (Carneiro et al. 2008). Il a été montré que les taux plasmatiques d'ET-1 dans les sangs veineux et caverneux étaient plus élevés chez les patients avec la DE organique et psychogénique que chez les témoins sains. Un fait encore plus intéressant, ces taux sont plus élevés chez les patients avec la DE organique que chez les patients psychogéniques (Carneiro et al. 2008). D'ailleurs, les taux élevés d'ET-1 sont considérés comme l'un des meilleurs facteurs prédictifs indépendants de la DE (Bocchio et al. 2004).

1.3.3 Voie de la RhoA/Rho kinase

La voie de signalisation par la RhoA/Rho kinase est impliquée de façon remarquable dans le maintien de la contraction du muscle lisse caverneux, voire responsable (Jin and Burnett 2006).

La RhoA, *Ras homolog gene family, member A*, une protéine de petit poids moléculaire, fait partie de la famille de Rho qui appartient à la superfamille des Ras des GTPases. Elle est connue pour son rôle important dans la médiation de la contraction du muscle lisse, en plus de son implication à la régulation de divers processus cellulaires tels que la formation des fibres de stress, la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose cellulaires. La RhoA fonctionne comme un échangeur moléculaire entre son état de liaison avec le GDP (RhoA-GDP) qui est inactif et son état de liaison avec le GTP (RhoA-GTP) qui est actif. L'activité de la RhoA est étroitement régulée par trois protéines : RhoGEF (*guanine nucleotide exchange factor*), RhoGAP (*GTPase activating protein*) et RhoGDI (*GDP dissociation inhibitor*). Dans son état inactif, le RhoGDI se lie au RhoA-GDP pour former un complexe. Le RhoA-GDP se trouve

stabilisé par cette molécule inhibitrice et le complexe est séquestré dans le cytosol. Le RhoGEF, une fois activé, va faciliter le changement de la molécule de GDP sur la RhoA en GTP et la dissociation du RhoA-GDI. Le RhoA-GTP se déplace du cytosol à la membrane plasmique et se lie à elle via la généranylgénéralylation pour initier la transduction de signalisation. Le RhoGAP accélère l'activité intrinsèque de la GTPase de la RhoA et promeut l'hydrolyse du GTP sur le RhoA-GTP inactivant ainsi la RhoA. Subséquemment, le RhoA-GDP se réassocie avec le RhoGDI pour se localiser à nouveau dans le cytosol. La RhoA active se lie à ses cibles en aval pour ainsi initier les réponses cellulaires. Et l'un des effecteurs les plus étudiés de la RhoA est la Rho kinase, une sérone/thréonine kinase qui possède un site de liaison avec la RhoA. La liaison de la RhoA à la Rho kinase cause un changement de conformation de la Rho kinase et son autophosphorylation subséquente, ce qui augmente son activité. La Rho kinase activée va, à son tour, phosphoryler et inactiver la MLCP, permettant ainsi aux chaînes légères de myosine de demeurer phosphorylées et par conséquent contractées par l'actine (Jin and Burnett 2006; Lin et al. 2008). Ainsi dans le muscle lisse, la Rho kinase induit la vasoconstriction via la phosphorylation de la MLCP. Ceci maintient l'état contractile du tissu. Cependant, dans l'état non phosphorylé, la MLCP est capable d'ôter le groupement phosphate de MLC et promeut ainsi la relaxation du muscle lisse (Mills et al. 2003) (Figure 1.4).

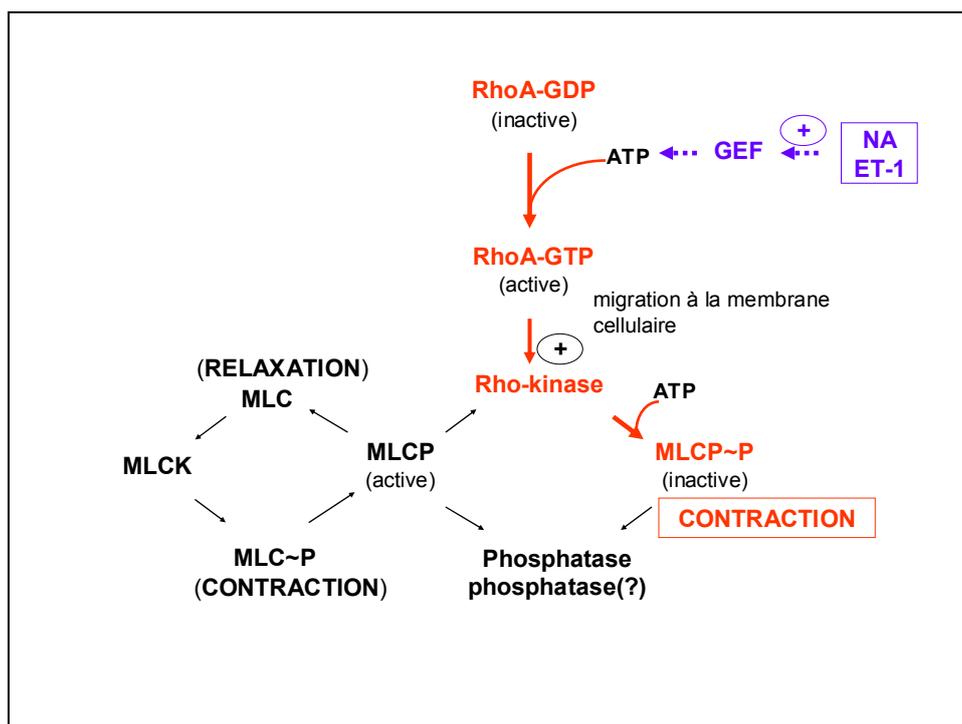


Figure 1.4 Représentation schématique expliquant la voie de la RhoA/Rho kinase dans le maintien de la contraction du muscle lisse. *MLC(K/P)*, (kinase/phosphatase de la) chaîne légère de la myosine ; *~P*, phosphorylation ; (+) = activation ; *NA*, noradrénaline ; *ET-1*, endothéline-1 ; *GEF*, *guanine exchange factor*. La RhoA est activée quand elle se lie avec le GTP, elle subit la géranylgéranylation et migre à la membrane cellulaire. La RhoA activée active la Rho kinase qui catalyse la phosphorylation (et l'inactivation) de la MLCP. Et quand celle-ci est dans sa forme active, elle catalyse la déphosphorylation de la MLC promouvant ainsi la relaxation du muscle lisse.

En outre, comme mentionné plus haut, l'activation de la voie de signalisation de la RhoA/Rho kinase peut aussi médier l'effet contractile engendré par l'ET-1 et par les agonistes adrénergiques (Lin et al. 2008).

1.3.4 Angiotensine II

L'Angiotensine (Ang) II, un puissant vasoconstricteur, son récepteur AT₁ et le système rénine-angiotensine (SRA) présent au niveau des organes reproducteurs, sont impliqués dans la régulation du tonus du muscle lisse caverneux et de l'érection pénienne (Park et al. 1997). Le SRA médie une partie de ses actions physiologiques et pathophysiologiques via la génération de ROS et la stimulation de l'inflammation (Schiffrin and Touyz 2003). L'Ang II; en plus d'exercer des actions pléiotropes contribuant au dommage vasculaire en modulant la libération de cytokines pro-inflammatoires et facteurs de transcription (tel que le facteur nucléaire Kappa B) qui régulent en retour l'expression de molécules d'adhésion (De Ciuceis et al. 2005); peut, via le récepteur AT₁, stimuler la PKC, la PLD (phospholipase D) ou Src et activer la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAD(P)H) oxydase. En retour, l'anion superoxyde (O₂⁻) généré par la NAD(P)H oxydase va stimuler les MAP kinases JNK (*c-jun N-terminal kinase*) et p38, qui vont médier les effets de l'augmentation des radicaux libres d'oxygène (Schiffrin and Touyz 2003). Ces mécanismes entraînent ensemble des dommages vasculaires conduisant à l'athérosclérose.

Il est documenté que l'Ang II peut être produite et sécrétée pas les cellules de l'endothélium et du muscle lisse péniens et que les concentrations d'Ang II circulant dans le tissu pénien sont plus élevées pendant la flaccidité que pendant l'érection pénienne (Becker et al. 2001). Dans une étude, un bloqueur du récepteur de l'Ang, le losartan, a restauré la capacité érectile chez le rat âgé normotendu (Park et al. 2005). Dans une autre étude, celle-ci se basant sur la comparaison de deux classes d'antihypertenseurs différentes, le valsartan qui est un bloqueur des récepteurs de l'Ang et le spironolactone qui est un diurétique antagoniste de l'aldostérone; le valsartan a amélioré significativement la fonction érectile chez le rat diabétique, alors que cet effet n'a pas été observé avec le spironolactone (Chen et al. 2007). Ces observations témoignent de l'importance du rôle de la voie de signalisation impliquant le SRA dans le processus de l'érection.

En dehors des bloqueurs des récepteurs de l'Ang, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang qui font aussi intervenir le SRA sont connus pour améliorer la fonction érectile dans l'hypertension (Dorrance, Lewis, and Mills 2002; Hale et al. 2002). Cependant, à notre connaissance, rien n'est connu en ce qui concerne l'évaluation de la fonction érectile *in vivo*

dans le modèle de l'hypertension induite par l'activation du SRA par l'infusion chronique de l'Ang II. C'est ainsi que nous nous sommes proposés cette étude.

1.3.5 Voies des MAP kinases

Les *Mitogen-activated protein* (MAP) kinases sont d'importants médiateurs de la transduction de signaux et jouent un rôle clé dans la régulation de beaucoup de processus cellulaires, tels que la croissance et la prolifération, la différenciation, et l'apoptose cellulaires. Chez les cellules des mammifères, trois groupes majeurs de MAP kinases ont été identifiés: *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), JNK, et p38 MAP kinase. Il est bien documenté que ERK est typiquement stimulé par des signaux associés à la croissance, alors que les cascades impliquant JNK et p38 MAP kinase sont activées par divers stimuli de stress (Kyosseva 2004; Valjent, Caboche, and Vanhoutte 2001).

Peu de choses sont connues en ce qui concerne l'implication des MAP kinases dans la régulation de l'érection. Cependant, une équipe de chercheurs a montré l'existence d'une forte expression des protéines ERK 1/2 et Akt/PKB au niveau de l'endothélium des sinus et des vaisseaux caverneux et au niveau des fibres nerveuses caverneuses (Sommer et al. 2002). Alors que l'activation de la voie de signalisation d'Akt/PKB conduit à l'augmentation de la libération du NO médié par l'eNOS, l'activation d'ERK 1/2 conduit à la réduction de l'activité de l'eNOS via un processus de phosphorylation qui reste à documenter. La MAP kinase ERK 1/2 peut, via phosphorylation, inhiber l'eNOS au niveau de l'endothélium et joue, de ce fait, un rôle de régulateur négatif de l'activité de l'eNOS dans le tissu caverneux (Sommer et al. 2002) (Figure 1.5). Une autre étude a montré une augmentation de l'expression d'ERK 1/2 phosphorylé dans le muscle lisse caverneux chez les patients avec la DE (Bernier, Haldar, and Michel 2000). Par ailleurs, l'inhibition de p38, dans une étude, a prévenu le développement des atteintes de la conduction nerveuse chez le rat diabétique (Price et al. 2004) et a corrigé l'atteinte de la relaxation dépendante du NO des corps caverneux chez la souris diabétique (Nangle, Cotter, and Cameron 2006). Ces observations témoignent de l'implication plausible de la voie des MAP kinases dans la régulation de l'érection pénienne ; tel est ainsi, l'augmentation des taux des MAP kinases ou leur suractivation, en l'occurrence ERK 1/2 et p38, pourrait aussi constituer un marqueur de la DE.

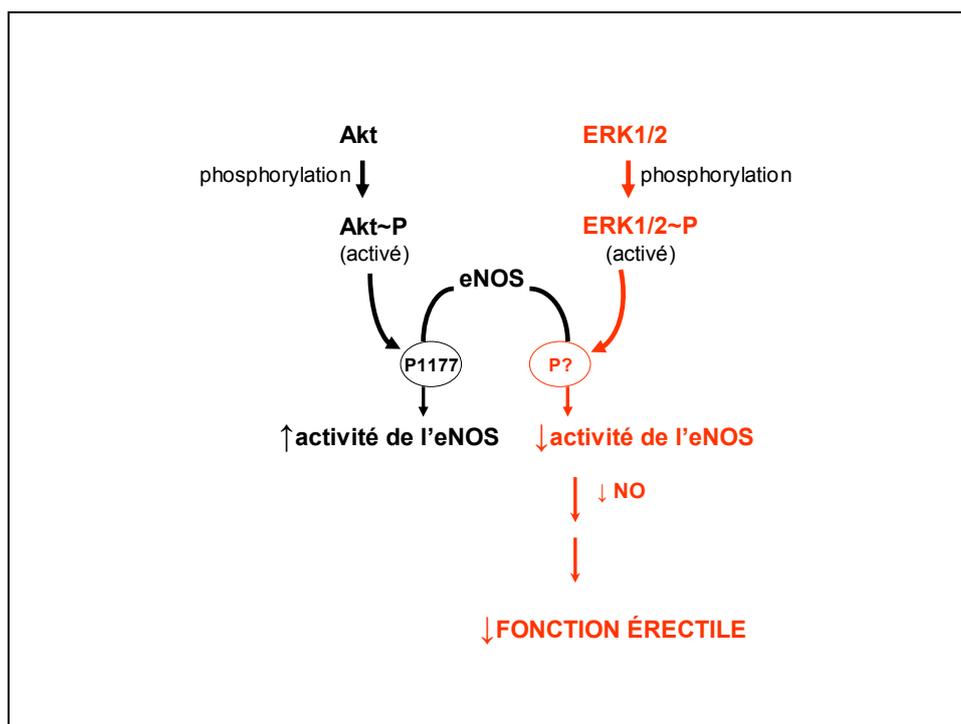


Figure 1.5 Représentation schématique suggérant le rôle d'ERK 1/2 dans la régulation de l'érection pénienne. Après phosphorylation, ERK 1/2 devient actif et, par un mécanisme qui reste à documenter, diminue l'activité de l'eNOS, induisant subséquemment une diminution du NO et par conséquent une atteinte de la fonction érectile.

1.3.6 Autres molécules vasoconstrictrices

La plupart des prostanoïdes (PGH₂, PGF₂ α , thromboxane A₂) sont connus pour leur propriété vasoconstrictrice et sont impliqués dans la médiation de la contraction pénienne (Andersson 2003).

Le neuropeptide Y est libéré en même temps que la NA à partir des nerfs sympathiques et agit sur les récepteurs post-synaptiques Y₁ et Y₂ pour renforcer les contractions générées par la NA, sur les récepteurs présynaptiques Y₂ pour limiter la libération de la NA et sur les récepteurs endothéliaux Y pour relaxer le muscle lisse (Prieto 2008).

La voie sérotoninergique périphérique semble avoir un rôle dans le processus érectile via les activités contractile médiée par le récepteur 5-HT_{2A} et relaxante médiée par le récepteur 5-HT₃ (Lau et al. 2007).

1.4 Épidémiologie de la DE

1.4.1 Prévalence et incidence

La sexualité subit des influences socio-économique et culturelle. Plusieurs études épidémiologiques à l'échelle mondiale ont été menées pour évaluer la prévalence et l'incidence de la DE. Des résultats obtenus présentent une très grande variation selon que les méthodes de recueil des données, la définition de la DE, la durée de la DE, les pays dans lesquels les études ont été faites ou les populations envisagées, la taille de l'échantillon étudié et d'autres paramètres d'études différaient.

Ainsi, on peut observer, dans la littérature, une prévalence de la DE allant de 12 à 82%, selon que les conditions d'études diffèrent (Lyngdorf and Hemmingsen 2004; Lewis et al. 2004). Cependant malgré l'existence de cette discordance sur les chiffres obtenus, il y a une forte corrélation entre l'âge et les taux de prévalence de la DE dans la presque totalité de ces études. Une étude très récente menée en 2007 a estimé qu'environ 18% ou 18 millions d'hommes aux États-Unis avaient la DE et que le taux de prévalence était nettement augmenté chez les hommes hypertendus ou diabétiques (Selvin, Burnett, and Platz 2007).

Les taux d'incidence reportés dans la littérature connaissent, eux aussi, des chiffres variables. Ils atteignent 25-30 sur 1000 personnes par an et ces taux augmentent considérablement avec chaque décade d'âge (Moreira et al. 2003).

1.4.2 Causes et facteurs de risque

Les causes de la DE peuvent être organiques ou psychogéniques. De nos jours, il est accepté que les causes psychologiques et organiques peuvent coexister et que les facteurs psychologiques contribuent à l'aggravation de la DE organique. Même si le pourcentage

occupé par ces causes psychologiques ou organiques peuvent différer selon le groupe d'âge considéré ; on convient que les causes organiques sont responsables de la grande majorité des cas, allant jusqu'à 80% de tous les cas de la DE (Caskurlu et al. 2004). En ce qui concerne la DE psychogénique, deux mécanismes ont été proposés pour expliquer cette inhibition de l'érection, à savoir l'inhibition du centre de l'érection au niveau de la moelle épinière par le cerveau comme une exagération de l'inhibition supra-sacrée normale d'une part ; et la décharge sympathique excessive ou l'augmentation de taux de catécholamines périphériques, qui peut augmenter le tonus du muscle lisse pénien pour empêcher la relaxation nécessaire pour l'érection, d'autre part (Dean and Lue 2005). Dans la DE organique on distingue la DE vasculogénique et la DE neurogénique ; et le facteur pathophysiologique le plus fréquent est l'anomalie vasculaire pénienne affectant environ 60-80% des patients (Hafez and Hafez 2005; Gonzalez-Cadavid and Rajfer 2004).

En ce qui concerne la DE d'origine vasculaire, dépendamment de l'étiologie en cause, le mécanisme peut être l'atteinte de la relaxation du muscle lisse des corps érectiles pouvant aboutir à une compression inadéquate des veines péniennes, ce qui cause la dysfonction veino-occlusive ou fuite veineuse pénienne (Siroky and Azadzoï 2003) ; ou encore la dysfonction endothéliale, et la réduction résultante de la libération du NO à partir de l'endothélium pendant l'excitation sexuelle contribue de façon importante dans la pathophysiologie de la DE vasculaire (Sommer and Schulze 2005).

La DE neurogénique résulte de la perturbation de la neurotransmission au muscle lisse ; et dans la majorité des cas, c'est souvent associé à la dysfonction veino-occlusive cavernreuse comme le résultat d'une atrophie relative du muscle lisse trabéculaire (Hafez and Hafez 2005; Gonzalez-Cadavid and Rajfer 2004).

Plusieurs conditions médicales peuvent être à l'origine de la DE. Selon l'ordre d'importance, les hommes diabétiques sont à un risque plus élevé de développer la DE (avec un ratio de probabilité (RP) de 3,00) que ceux avec l'hyperlipidémie (RP = 2,29), l'hypertension (RP = 2,05), le stress psychologique (RP = 1,68) ou une activité physique basse (RP = 1,35) (Ponholzer et al. 2005). En dehors des causes suscitées, le vieillissement physiologique, le tabagisme (Greenfield and Donatucci 2007; He et al. 2007), l'hypogonadisme (Diaz-Arjonilla et al. 2009; Hwang and Lin 2008), l'ethnicité et la race (Saigal et al. 2006) et certaines classes

de médicaments (Kubin, Wagner, and Fugl-Meyer 2003; Hafez and Hafez 2005) sont associés au développement de la DE.

Ici, j'envisagerai juste le diabète, l'hypertension et le vieillissement physiologique qui sont des modèles de la DE impliqués dans mes travaux de recherche. Je vais, par ailleurs, explorer la possibilité d'un lien entre la RCIU et le développement de la DE. En effet, jusqu'à présent, la littérature ne dispose pas de recherches ni de données en ce qui concerne l'association entre la RCIU ou le petit poids à la naissance et la DE.

1.4.2.1 Diabète

Ici, j'entends par diabète le diabète sucré qui est différent du diabète insipide. En effet le diabète insipide est caractérisé par l'excrétion de grandes quantités d'urine très diluée, qui ne peuvent être réduites par une réduction de l'apport de liquides. Le diabète sucré, une maladie chronique qui apparaît quand le pancréas ne sécrète pas ou pas assez d'insuline ou quand l'organisme utilise mal l'insuline qu'il produit, est un facteur de risque bien connu pour la DE. Dans le diabète sucré, on distingue le diabète de type 1 ou insulino-dépendant et le diabète de type 2 ou non insulino-dépendant. Mes travaux de recherche sont orientés vers le diabète de type 2, qui est causé par une combinaison de la résistance à l'insuline et du trouble de la sécrétion de l'insuline (Ranke 2005). Le diabète est une condition qui est devenue de plus en plus prévalente. Si on tient compte des estimations de l'OMS, 150 millions de gens dans le monde en souffraient en 2007 et on s'attend à ce que ce chiffre double d'ici 2025 (Musicki and Burnett 2007). Les hommes diabétiques développent la DE à un âge plus jeune, avec une prévalence significativement élevée se rangeant de 20 à 85% (Tefekli et al. 2006). La DE pourrait même être la présentation initiale chez 12% des patients qui seront subséquemment diagnostiqués diabétiques (Bivalacqua et al. 2005).

Il y a quatre principales hypothèses qui expliqueraient les mécanismes par lesquels l'hyperglycémie induit des dommages, à savoir l'augmentation du flux de la voie de signalisation du polyol, l'augmentation de la formation des produits terminaux de la glycation avancée (AGE), l'activation des isoformes de la PKC et l'augmentation du flux de l'hexosamine (Brownlee 2001).

L'étiologie de la DE induite par le diabète est multifactorielle. C'est à la fois une atteinte nerveuse et une atteinte vasculaire. Certaines études montrent que la neuropathie, plutôt que la vasculopathie, contribuerait de façon significative au développement de la DE par la dégénération nitrergique sélective qui aboutit à la baisse de l'activité de la nNOS et, par conséquent, du NO (Hecht et al. 2001). En ce qui concerne les présentations de l'atteinte nerveuse, une étude moléculaire sur le nerf sympathique dans le modèle animal diabétique induit par l'administration de la STZ (streptozotocine) a montré des changements incluant, entre autres, dilatation et expansion des terminaisons nerveuses et accumulation de microfilaments, mitochondries, vésicules et couches de membranes (Morrison et al. 2007). D'autres études penchent vers la dysfonction endothéliale plutôt que nerveuse en se basant sur le fait que la dysfonction endothéliale serait le dénominateur commun des troubles associés au diabète à savoir hyperglycémie, excès d'acides gras libres et résistance à l'insuline ; elle serait ainsi une cause majeure de la DE associée au diabète (Musicki and Burnett 2007). Les facteurs associés à la dysfonction endothéliale dans le diabète incluent défauts de l'expression et de l'activité de la NOS endothéliale ; augmentation du stress oxydant ; diminution ou perturbation de la production et/ou de l'action d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines ; et augmentation de la génération et de l'activité de vasoconstricteurs opposants tels que la RhoA/Rho kinase (Musicki and Burnett 2007).

D'un point de vue moléculaire plus approfondie, les mécanismes envisagés dans la DE induite par le diabète incluent, entre autres, l'augmentation des AGEs et des taux de radicaux libres d'oxygène, la perturbation de la synthèse du NO, la diminution et la perturbation de la PKG-1, l'augmentation des sites de liaison des récepteurs à l'endothéline et des changements ultrastructuraux, la régulation en aval de la voie RhoA/Rho kinase et la dégénération du nerf nitrergique sélectif dépendant du NO (Moore and Wang 2006). Par ailleurs, la diminution de l'expression protéique de l'IGF-1 (Pu et al. 2007), la réduction de l'expression et de la signalisation du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ont aussi été envisagées dans la pathophysiologie de la DE associée au diabète (Jesmin et al. 2003).

Le mauvais contrôle de l'hyperglycémie a des effets néfastes et contribue au développement de la DE chez le diabétique. Il y a une corrélation positive entre l'hémoglobine glyquée HbA1c, marqueur du contrôle de la glycémie en chronique, et la fonction érectile. Il a été montré que des taux élevés d'HbA1c augmentaient la sévérité de la DE (Rhoden et al. 2005).

Par ailleurs, dans une étude menée par Mensah-Brown et son équipe chez le rat diabétique induit par l'administration de la STZ, les concentrations de NA dans le corps caverneux pénien étaient extrêmement augmentées, de l'ordre d'environ 350% des valeurs de celles des rats témoins et cette augmentation était maintenue pendant plus de 30 semaines (Morrison et al. 2007). Ceci serait une explication plausible du développement de la DE dans le diabète.

La résistance à l'insuline est comprise comme un état d'une mauvaise régulation de l'homéostasie glucose-insuline dans lequel la capacité de l'insuline à stimuler la capture du glucose dans les tissus périphériques est réduite (Wheatcroft et al. 2003). Les hommes avec la DE ont une incidence élevée de la résistance à l'insuline (Bansal et al. 2005). Les états de résistance à l'insuline sont caractérisés par la synthèse défectueuse du NO vasculaire et la perturbation de la vasodilatation induite par l'insuline (Cook and Scherrer 2002). En effet, l'insuline agit via son récepteur pour activer la voie de signalisation dépendante de la PI3K pour promouvoir la libération du NO liée à la NOS (Wheatcroft et al. 2003). Elle stimule l'eNOS via la régulation de la phosphorylation dépendante du calcium ; et le déclin de l'eNOS dans les états de la résistance à l'insuline s'explique par la voie du récepteur à l'insuline, via la voie de signalisation de PI3K/Akt, ou par l'induction par la NOS inducible (iNOS) qui inhibe la vasodilatation liée à l'eNOS par une rétroaction négative (Trussell and Legro 2007). Ainsi, en présence d'une perturbation de la fonction normale de l'insuline, il y a des mécanismes qui peuvent s'installer au détriment du bon fonctionnement de la fonction érectile.

L'IGF-1 est un polypeptide avec une homologie structurale à la proinsuline, une molécule précurseur de l'insuline. Ses effets biologiques sont médiés principalement via l'activation du récepteur de type 1 à l'IGF, et son activité est modulée par ses protéines de liaison en affectant le '*turnover*' de l'IGF-1 et en restreignant sa diffusion (Bochinski et al. 2004). Les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 présentent des similarités structurelles. Ce qui fait que l'insuline comme l'IGF-1 peut se lier à l'un ou l'autre des récepteurs et déclencher les cascades de signalisation intracellulaire qui aboutissent aux différentes fonctions, telles que les effets métaboliques (transport du glucose, la synthèse protéique), la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose cellulaires (Ranke 2005). Une fois lié avec le récepteur, le complexe formé par l'IGF-1 et son récepteur va activer la PI3K, qui active à son tour la voie de signalisation d'Akt (Isenovic et al. 2002) (Figure 1.6). De plus, l'IGF-1 est impliqué et joue un rôle clé dans la régénération des fibres nerveuses contenant la NOS dans

les nerfs dorsal et intracaverneux. On a documenté que son administration facilitait la régénération des fibres nerveuses contenant la NOS dans le tissu pénien et contribuait à la restauration de la fonction érectile après la cryoablation bilatérale du nerf caverneux (Bochinski et al. 2004).

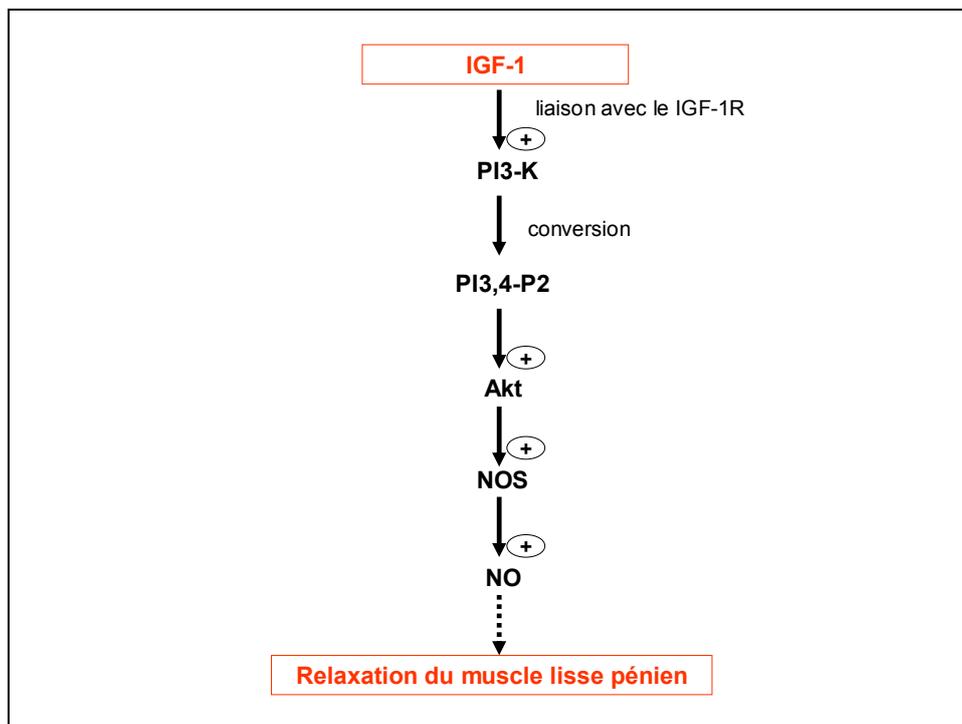


Figure 1.6 Représentation schématique illustrant la transduction du signal à partir de l'IGF-1 conduisant à la synthèse du NO et, par conséquent, à l'érection par relaxation du muscle lisse pénien. L'IGF se lie à son récepteur IGF-1R, ceci cause la phosphorylation de la PI3K, qui convertit le PI3 en phosphatidylinositol 3,4-diphosphate (PI3,4-P2). Ce messager active la sérine/thréonine kinase Akt, qui phosphoryle la NOS constitutive, conduisant à la production du NO. Le NO déclenche, à son tour, la cascade conduisant à la relaxation du muscle lisse pénien (Conti et al. 2004).

La DE a été associée au taux de l'IGF-1. Des recherches récentes ont montré une baisse de la régulation de l'expression protéique de l'IGF-1 dans le corps caverneux pénien chez les rats diabétiques avec la DE; et le transfert du gène de l'IGF-1 a augmenté significativement la fonction érectile chez ces rats diabétiques induits par la STZ (Pu et al. 2007). De même,

l'injection intracaverneuse de l'IGF-1 a amélioré des réponses érectiles chez des rats âgés et les auteurs pensent que la restauration des réponses érectiles par l'IGF-1 serait probablement causée par l'augmentation de l'intégrité musculaire du muscle lisse et de l'activité dans le pénis. L'IGF-1 peut, par ailleurs, inhiber la dysfonction endothéliale observée chez le rat âgé en interagissant avec les sites de liaison de l'endothélium qui conduisent à la production du NO, en promouvant la sensibilité à l'insuline et en ouvrant les canaux potassiques (Conti et al. 2004). De plus, la coexistence de l'hyperinsulinémie et des taux élevés d'IGF-1 libre sanguin est rare (Cordain, Eades, and Eades 2003). Cela accentue l'association entre la baisse de taux de l'IGF-1 et la DE, en se basant sur le fait que les états chroniques d'hyperinsulinémie aboutissent à la résistance à l'insuline, qui va engendrer, à son tour, des déficits de la fonction érectile. D'autres rôles de l'IGF-1 ont été documentés ; il protège contre la dysfonction endothéliale, le développement des plaques athérosclérotiques, le syndrome métabolique, l'instabilité clinique et les dommages ischémiques du myocarde (Conti et al. 2004).

Dans l'hyperglycémie, les AGEs résultent des réactions non enzymatiques entre le glucose d'une part et les lipides, protéines ou acides nucléiques d'autre part. Les AGEs forment des liaisons covalentes avec le collagène. Ce dernier conduit à l'épaississement vasculaire, la diminution de l'élasticité, la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose. Il y a des études qui montrent une augmentation d'AGEs dans les tissus érectiles des diabétiques, aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Cartledge, Eardley, and Morrison 2001). Les AGEs contribueraient à la DE induite par le diabète en produisant des radicaux libres ; ces radicaux libres produisent un dommage oxydatif aux cellules et affectent le NO, ce qui exacerbe ainsi la diminution de la GMPc et le déficit de la relaxation du muscle lisse caverneux (Bivalacqua et al. 2005; Cartledge, Eardley, and Morrison 2001). En dehors de ce mode d'action, on a aussi documenté que les AGEs agissaient en se liant avec leurs récepteurs. L'effet conjugué de cette liaison augmente l'activité de l'ET-1 dans le corps caverneux promouvant ainsi le développement de la DE (Chen, Shan, and Dai 2008). Cependant, en utilisant des inhibiteurs de la formation d'AGEs et des destructeurs des liaisons des molécules d'AGEs, on a pu prévenir certaines complications, incluant la DE, chez l'animal diabétique (Usta et al. 2006).

À titre de rappel, de faibles taux de ROS sont importants dans la régulation de la fonction physiologique. Cependant, une production excessive de ROS peut avoir des effets nuisibles sur les mécanismes de défense anti-oxydante de la cellule, ce qui conduit aux changements pathologiques observés dans les maladies vasculaires. En effet, les ROS causent des

dommages vasculaires en promouvant la croissance et la prolifération des cellules du muscle lisse, en augmentant le dépôt protéique de la matrice extracellulaire, en activant les métalloprotéinases de la matrice, en induisant la dysfonction endothéliale et en modifiant le tonus musculaire (Jin and Burnett 2008). Plusieurs systèmes sont capables de générer des ROS, incluant, entre autres, NADPH oxydase, xanthine oxydase, NOS non couplée et chaîne respiratoire mitochondriale; mais la NADPH oxydase semble être la source majeure des ROS dans la paroi vasculaire (Jin et al. 2008; Griendling, Sorescu, and Ushio-Fukai 2000). La dysfonction endothéliale, qui reflète principalement la diminution de la disponibilité du NO endothélial, a lieu en partie à cause de l'augmentation de la production des ROS, en particulier l' $O_2^{\cdot-}$ qui est produit par une variété de cellules incluant celles du muscle lisse vasculaire et de l'endothélium. D'une part, l' $O_2^{\cdot-}$ peut directement inactiver le NO et diminuer sa disponibilité ; d'autre part, il peut réagir avec le NO et former le peroxy-nitrite ($ONOO^-$) qui est une molécule d'une toxicité importante. En effet, l' $ONOO^-$ peut causer des dommages oxydatifs au matériel génétique, promouvoir la libération de vasoconstricteurs, augmenter l'apoptose et causer des lésions tissulaires ; il peut aussi oxyder l'eNOS entraînant le non-couplage de celle-ci. L'eNOS non couplée est associée non seulement à l'augmentation de la formation de l' $O_2^{\cdot-}$ et par conséquent de l' $ONOO^-$ mais aussi à la réduction de la production du NO car il y a un transfert des électrons de la L-arginine à l'oxygène moléculaire (Musicki and Burnett 2006). Ce qui constitue un véritable cercle vicieux. Par ailleurs, en plus de ces effets sur l'eNOS et l'eNO, les ROS activent la voie de RhoA/Rho kinase (Jin, Ying, and Webb 2004).

La grande majorité des études de la fonction érectile dans le modèle diabétique chez l'animal se font sur le modèle de diabète induit par la STZ, c'est-à-dire le modèle de diabète de type 1 ; alors que peu de choses sont connues sur l'évaluation de la fonction érectile dans le modèle animal de diabète de type 2. À notre connaissance, la littérature ne dispose pas à date de données sur l'étude de la fonction érectile *in vivo* chez le rat soumis à une diète riche en glucose. C'est aussi un modèle auquel nous nous sommes intéressés, nous allons ainsi étudier la fonction érectile chez le rat avec une résistance à l'insuline développée à la suite d'un régime riche en glucose.

1.4.2.2 Hypertension

L'hypertension, une condition se définissant par une élévation de la tension artérielle, est à la fois une maladie et un facteur de risque du développement et de l'aggravation d'autres maladies, particulièrement les maladies cardiovasculaires. Elle est la cause majeure de morbidité et mortalité à travers le monde (Liew et al. 2008). En 2000, on a estimé que plus de 970 millions de personnes, soit 15% de la population mondiale, étaient atteintes de l'hypertension; et ce chiffre pourrait atteindre 1559 millions, soit 19,8% de la population mondiale d'ici 2025 (Lenfant 2008).

L'hypertension est caractérisée par l'augmentation de la résistance périphérique causée par des changements au niveau de l'endothélium et du muscle lisse vasculaires et par l'association de la matrice extracellulaire (Musicki and Burnett 2006). En plus de ces changements morphologiques reflétant un remodelage vasculaire, on a observé dans le pénis des rats hypertendus une prolifération du muscle lisse, une augmentation du dépôt de collagène et un rétrécissement de la tunique albuginée (Toblli et al. 2000; Behr-Roussel et al. 2005). Sur le plan de la réactivité vasculaire, l'hypertension est associée à l'augmentation de la réponse vasoconstrictrice et à la diminution de la réponse vasodilatatrice (Chitale et al. 2001). Des études montrent aussi une augmentation de l'activité constrictrice de la Rho kinase dans les vaisseaux des rats hypertendus (Chitale, Weber, and Webb 2001). Par ailleurs, on a observé une augmentation de la peroxydation lipidique et la diminution des taux d'antioxydant, la superoxyde dismutase(SOD), dans le corps caverneux des rats spontanément hypertendus (Ushiyama et al. 2004).

Chez l'animal, de différents modèles animaux d'hypertension ont été développés et les fréquemment utilisés sont le modèle de l'infusion de l'acétate de déoxycorticostérone (DOCA) ou de l'Ang II, en plus du modèle de rat spontanément hypertendu (SHR). Tous ont fait l'objet d'étude de la fonction érectile *in vivo* (Chitale et al. 2001; Carneiro et al. 2008), à l'exception du modèle de l'infusion de l'Ang II. En effet, comme mentionné plus haut dans le sous paragraphe 2.2.4, jusqu'à date, la littérature ne dispose pas de données sur l'étude *in vivo* de la fonction érectile chez le modèle de l'hypertension induite par l'activation du SRA par l'infusion chronique d'Ang II. C'est dans cette optique que nos travaux ont été orientés vers cette voie.

1.4.2.3 Vieillessement physiologique

Le vieillissement est un facteur de risque connu de la DE. Il est bien documenté que la fonction érectile diminue avec l'âge et que la prévalence de la DE augmente avec celui-ci. Elle passe de 5% chez les hommes âgés entre 20-39 ans à plus de 70% chez les hommes âgés de 70 ans et plus (Selvin, Burnett, and Platz 2007). Une publication récente fait état d'un déclin de la fonction érectile chez différentes souches de rats, à savoir le SHR (rat spontanément hypertendu), le Sprague Dawley et le Wistar, dès 15 à 29 semaines d'âge (Hannan, Heaton, and Adams 2007).

Le vieillissement physiologique est un processus très complexe faisant appel à une batterie de mécanismes. De nos jours, les mécanismes moléculaires par lesquels le vieillissement conduit à la DE sont plus ou moins bien documentés. Les quatre causes majeures envisagées sont : 1) une production insuffisante de NO durant la neurotransmission nitreurgique provoquée par la stimulation sexuelle, probablement due à la perte de corps neuronaux et de connexions neuronales allant du ou aboutissant au pénis ou à une diminution de la régulation de l'activité et/ou de l'expression de NOS au niveau des organes respectifs ; 2) une réduction auxiliaire des taux de NO suite à la diminution de la régulation de l'eNOS due au dommage endothélial ; 3) une libération excessive putative des composantes adrénérgiques, en particulier via l'activation de l'endothéline et de la Rho kinase, qui augmentent le tonus du muscle lisse caveux ; 4) une perturbation de la relaxation du muscle lisse cible par des facteurs endogènes, résultant principalement d'une dégradation excessive putative de la GMPc par la PDE5A, ou à partir d'une perte relative des cellules du muscle lisse dans le pénis et leur remplacement par des fibres de collagène (Gonzalez-Cadavid and Rajfer 2004). Dans le même sens d'idées, la diminution ou les troubles de la fonction érectile avec le vieillissement ont été attribués à une réduction des fibres nerveuses non adrénérgiques non cholinergiques dans le pénis, à la réduction de la relaxation caveuse vasculogénique et neurogénique, à la réduction de la biosynthèse du NO causée par la diminution de l'expression de la NOS, à la diminution de l'activité de l'eNOS, à l'augmentation du stress oxydatif, à la perturbation de la phosphorylation de l'eNOS, et de l'augmentation de l'expression/activité de la voie de RhoA/Rho kinase ; en plus de la réduction de l'activité de la protéine kinase G-I par la GMPc et l'augmentation de l'expression de la phosphodiesterase-5 (Musicki and Burnett 2006). Il est, par ailleurs, associé à l'augmentation des ROS. L'endothélium et le muscle lisse

caverneux du pénis des rats âgés produisent des taux élevés d' O_2^- comparé à ceux des rats jeunes et cela sans augmentation concomitante de SOD pour les détoxifier (Bivalacqua et al. 2003) ; et à une augmentation de l'index apoptique dans le muscle lisse trabéculaire et artériel péniens (Ferrini et al. 2004). Chez le rat âgé, il y a un déséquilibre entre la baisse du NO neuronal et l'augmentation de l'activité de la RhoA/Rho kinase qui a été documenté ; ceci serait, ne fut-ce, en partie responsable de la DE associée au vieillissement (Gao et al. 2007). Pour soutenir cette caractéristique, d'autres travaux ont montré que l'activité de la RhoA/Rho kinase était trois fois plus augmentée chez le rat âgé que chez le rat jeune, et les auteurs pensent que c'est probablement à cause de la diminution de la disponibilité du NO engendré par l'activation de cette voie (Jin et al. 2006).

1.4.2.4 Restriction de croissance intra-utérine et petit poids à la naissance

Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), un enfant de petit poids à la naissance est celui qui est né avec un poids <2500 g (Goldenberg and Culhane 2007). Beaucoup d'études dans diverses populations ont été faites sur le devenir de ces enfants nés avec un petit poids en ce qui concerne le développement de certaines pathologies à l'âge adulte ; et plusieurs convergent vers le fait que le petit poids à la naissance est associé à plusieurs maladies chroniques chez les adultes incluant l'hypertension, le diabète sucré, l'obésité, l'hypercholestérolémie. De ce fait, le petit poids à la naissance serait un facteur de risque des maladies cardiovasculaires ; et de nos jours, on accepte plus aisément l'hypothèse des origines fœtales' énoncée il y a des décennies, l'hypothèse selon laquelle les différentes formes des maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 trouvent leur origine à partir de la sous-alimentation pendant la vie fœtale et la période de la petite enfance (Barker 2006; Barker et al. 1993).

Comparés aux enfants de poids normal à la naissance, les enfants avec un petit poids à la naissance ont une susceptibilité plus marquée de présenter une tension artérielle systolique augmentée et de développer l'hypertension artérielle à l'âge adulte (Davies et al. 2006; Gamborg et al. 2007). Une étude récemment publiée a montré qu'une augmentation de 1 kg au poids à la naissance était associée à une baisse de 3 mmHg de la tension artérielle systolique (Barker 2006). Une association qui est bénéfique et qui évolue à l'encontre du développement de ces facteurs de risque. Ces enfants nés avec un petit poids exhibent aussi

une augmentation de l'activité sympathique (RG et al. 2003), une diminution de l'élasticité artérielle (Rondo et al. 2008), une fréquence cardiaque plus élevée (Abe et al. 2007). Tous ces facteurs prédisposent au développement plus précoce des maladies cardiovasculaires à l'adolescence et à l'âge adulte. En ce qui concerne les mécanismes par lesquels le petit poids aboutit à l'hypertension, on envisage la diminution de la néphrogenèse avec un seuil plus élevé pour la natriurèse de pression et une susceptibilité plus élevée de la maladie rénale progressive, des troubles de développement de l'endothélium, et une augmentation de la sensibilité des glucocorticoïdes (Lackland, Egan, and Ferguson 2003).

En dehors de cette susceptibilité à l'hypertension artérielle documentée, les enfants avec un petit poids à la naissance montrent aussi une tendance au diabète de l'enfance qui est moins marquée chez les pairs nés avec un poids normal (Wei et al. 2007). Le poids à la naissance est, par ailleurs, inversement associé au risque de diabète de type 2 (Tian et al. 2006). Dans une étude menée par Cnattingius et son équipe, le taux de diabète de type 2 était augmenté de façon consistante avec la diminution du poids à la naissance, allant de 2.4% parmi les jumeaux avec des poids à la naissance de 3500 g ou plus à 5.3% parmi ceux avec des poids à la naissance de moins de 2000 g (Johansson et al. 2008). Dans le même sens d'idées, une association inverse a été montrée entre l'hémoglobine glyquée totale du nouveau-né et le poids à la naissance (Pfab et al. 2006).

L'association entre le poids à la naissance et le cholestérol total a aussi fait l'objet d'étude. Le cholestérol total été investigué auprès de 25843 hommes et femmes. On a constaté que les hommes nés avec un petit poids avaient des taux plus élevés de cholestérol total que ceux qui étaient nés avec un poids normal ; mais cette association n'a pas été retrouvée chez les femmes (Davies et al. 2004).

Chez l'animal, cette association environnement intra-utérin défavorable et maladies à l'âge adulte a été retrouvée dans différents modèles de RCIU, développés soit en manipulant ou traitant des mères de sorte à perturber la croissance fœtale soit en produisant un stress au fœtus (Battista et al. 2002). On a causé l'hypertension chez la progéniture en réduisant l'apport calorique et protéique des mères gestantes chez le rat (Woodall et al. 1996) ou en réduisant la circulation sanguine utérine chez les cobayes gestantes (Persson and Jansson 1992). De même, chez la rate gestante avec une progéniture avec RCIU, une diminution du volume circulant et une activation plus importante du système rénine-angiotensine-

aldostérone ont été associées avec une diète hyposodée dans la dernière semaine de gestation (Battista et al. 2002).

Même si d'autres évidences s'accumulent associant la RCIU ou le petit poids à la naissance à d'autres pathologies non évoquées ici; présentement, aucune étude dans la littérature actuelle ne mentionne si la RCIU ou le petit poids à la naissance a un lien avec la DE à l'âge adulte. Cependant, en tenant compte de son association à des facteurs de risque de la DE et des troubles vasculaires et hémodynamiques qu'il peut précipiter ; on peut, par ricochet, supposer que ces enfants nés avec un petit poids seraient à plus grand risque de souffrir de la DE et/ou de l'exhiber plus précocement que la population générale.

En résumé en ce qui concerne les mécanismes par lesquels ces facteurs de risque contribuent au développement de la DE, on peut les regrouper en changements structurels et fonctionnels. Sur le plan structurel, il y a athérosclérose, sténose artérielle, fibrose au niveau du pénis ; et sur le plan fonctionnel, il y a dysfonction endothéliale, dysfonction neuronale, dysfonction veino-occlusive (Figure 1.7).

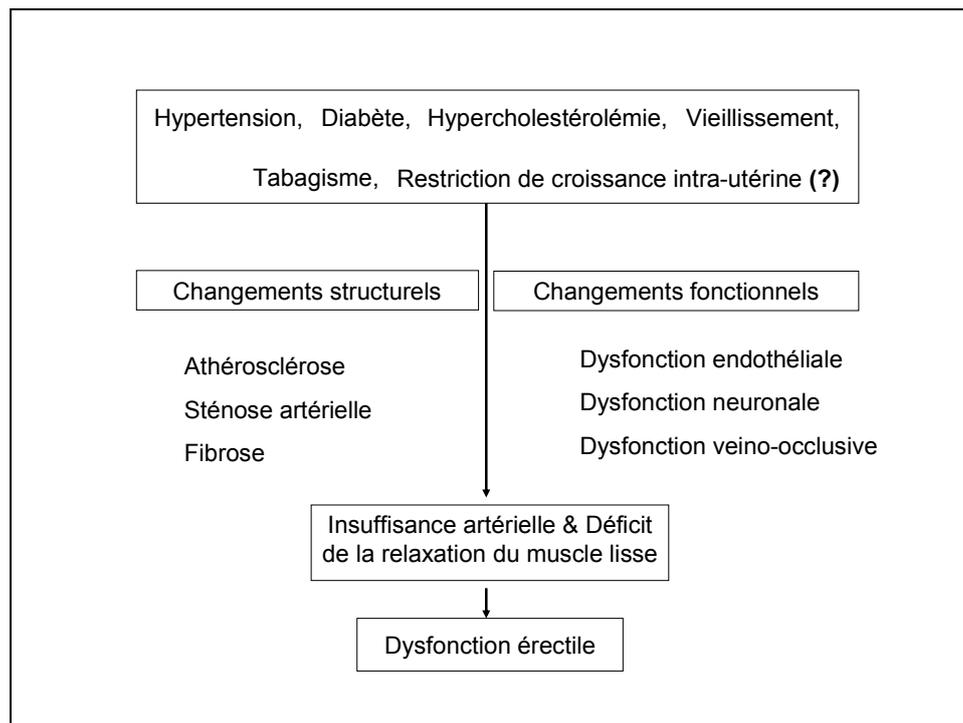


Figure 1.7 Représentation schématique expliquant des changements structurels et fonctionnels par lesquels les facteurs de risque de la DE induisent la DE. Adapté de (Andersson 2003).

1.5 Traitements actuels de la DE

Le traitement de la DE a connu des progrès remarquables depuis ces dernières décennies, surtout avec l'arrivée de la nouvelle classe des inhibiteurs de la PDE5 qui l'a révolutionné. Ceci se doit aux efforts et travaux qui ont mené à approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires de l'érection. En clinique, plusieurs thérapies ont été proposées et sont utilisées dans le traitement de la DE. Même si elles peuvent présenter des variations selon que l'origine de la DE diffère, on considère aujourd'hui que les inhibiteurs de la PDE5 constituent le traitement de 1^{ère} ligne, les pompes péniennes (*vacuum constriction devices*) et les injections intracaverneuses comme le traitement de la 2^{ème} ligne, et les prothèses péniennes comme le traitement de 3^{ème} ligne (Burnett 2008).

Les traitements actuels de la DE envisagés dans ce mémoire font allusion aux percées thérapeutiques et des approches à venir dans ce domaine.

1.5.1 Approche pharmacologique

Les stratégies thérapeutiques pharmacologiques utilisées sont à grande échelle locales, en faisant référence au système neurologique. Certaines de ces stratégies visent à supprimer des mécanismes anti-érectiles incluant des antagonistes des récepteurs α -adrénergiques, de l'endothéline, de l'angiotensine (Andersson 2001); et des inhibiteurs de la voie de la RhoA/Rho kinase (Rajasekaran et al. 2005; Park et al. 2006). D'autres, quant à elles, sont centrées sur la promotion des mécanismes pro-érectiles incluant des effecteurs de la voie de signalisation du NO, des inhibiteurs de la PDE, des prostanoïdes, des agonistes des récepteurs cholinergiques, des peptides vasoactifs, des molécules induisant l'ouverture des canaux potassiques (Andersson 2001).

Quant à l'approche pharmacologique centrale, les mécanismes en jeu sont plutôt complexes. Cependant, plusieurs systèmes neurochimiques au niveau spinal et supraspinal ont montré leur implication dans des réponses érectiles, les plus dominants incluent la sérotonine, la dopamine, l'ocytocine et le NO (Burnett 2008).

1.5.2 Approche thérapeutique par des facteurs de croissance

Plusieurs études menées principalement sur des modèles de rongeurs montrent que diverses neurophines telles que *nerve growth factor*, *acidic fibroblast growth factor*, *brain-derived neurotrophic factor*, *growth differentiation factor-5*, aussi bien que des facteurs neurotrophiques atypiques tels que *growth hormone*, *cytokine-hormone erythropoietin* exercent des rôles majeurs dans les fonctions neuronales péniennes. Ces études ont montré que ces agents neurotrophiques protégeaient et facilitaient le recouvrement des nerfs péniens autonomes, amoindrissant en retour l'importance de la dégénérescence du tissu érectile pénien et promouvant le recouvrement de la fonction érectile. Cette percée semble prometteuse bien qu'il n'y ait pas encore de publications sur l'efficacité prouvée de cette thérapie au niveau des essais cliniques (Yamanaka et al. 2005; Fandel et al. 2008; Burnett 2008).

1.5.3 Approche thérapeutique par des gènes

Elle fait allusion à l'inoculation du matériel génétique dans les cellules, humaine ou animale, soit pour restaurer ou supplémente la fonction cellulaire normale qui est défectueuse soit pour antagoniser des effets fonctionnels de l'expression du phénotype génétique mutant. Les modes de livraison du gène incluent le vecteur viral (ex, adénovirus), le vecteur non viral (ex, liposome) et d'autres modes basés sur la cellule (ex, cellules endothéliales). Le pénis, à cause de la localisation externe et l'accessibilité pour la manipulation, est un organe idéal pour la gènothérapie (Burnett 2008). Chez l'homme, les cellules du muscle lisse caverneux en culture ont exprimé des facteurs de croissance angiogénique VEGF, IGF-1, IGF IR, des protéines et gènes *flt1* (Rajasekaran et al. 2003). C'est dans cette optique que plusieurs études précliniques sur l'approche thérapeutique par gène pour le pénis dans des pathologies induisant la DE dans des modèles animaux ont été menées et les résultats s'avèrent très intéressants et promoteurs. La fonction érectile a été significativement améliorée voire restaurée (Christ et al. 2004; Yamanaka et al. 2005; Bennett et al. 2005; Shen et al. 2005). Présentement il y a des études cliniques qui sont en cours et tout récemment un essai clinique de phase I dans lequel le gène *maxi-K* administré par le plasmide d'ADN a montré des résultats intéressants sur la sécurité et probablement avec des bénéfices sur l'efficacité (Melman et al. 2006). En effet, comme mentionné plus haut, les canaux potassiques ont un mécanisme important dans la régulation du tonus des cellules du muscle lisse caverneux ; et bien qu'il en existe plusieurs sous-types au niveau du pénis, ce sont ceux avec une grande conductance et sensibles aux ions Ca^{2+} , à savoir *maxi-K* (codé par le gène *Slo*), qui jouent clairement un rôle prédominant dans la régulation du tonus des cellules du muscle lisse du corps caverneux et ainsi dans la capacité pénienne (Christ et al. 2008).

1.5.4 Approche thérapeutique par la médecine régénérative

Elle constitue aussi une autre approche dans le traitement de la DE basée sur la reconstruction. La médecine régénérative du pénis implique des techniques se rangeant de la construction tissulaire à la thérapie par des cellules souches et conçues pour la reconstitution tissulaire utile pour la réponse érectile depuis le nerf pénien jusqu'au corps caverneux pénien lui-même. Sur ce point, il y a des études aussi bien précliniques que cliniques qui ont donné des résultats encourageants (Burnett and Lue 2006).

Chapitre 2

But et hypothèses

Cette étude a pour but, dans un premier temps, de développer de nouveaux modèles de DE par une diète riche en glucose, par une infusion continue d'Ang II. Nous allons, par ailleurs, explorer un modèle de rat avec RCIU. L'eNOS étant capitale dans le maintien de l'érection comme expliqué plus haut dans l'introduction, nos études seront, par la suite, orientées vers la modulation des voies qui la contrôlent (Akt et ERK) en fonction des changements de la fonction érectile dans les différents modèles.

En outre, nous allons plus particulièrement tester l'hypothèse telle que le vieillissement et le diabète étant tous deux des facteurs de risque de la DE, une association de ces deux facteurs conduirait à une aggravation de la DE. En d'autres termes, on s'attend à ce qu'une diète riche en glucose aggrave la DE observée chez le rat âgé.

Chapitre 3

Méthodologie

3.1 Animaux et traitements

Des cohortes de rats mâles Sprague-Dawley jeunes âgés de 12 semaines et adultes âgés d'environ 30 semaines dits reproducteurs à la retraite, correspondant à des rats ayant été servis de procréateurs et mis hors usage par la suite, ont été procurés du fournisseur Charles River (St-Constant, Québec) et hébergés pendant 2 jours avant toute manipulation et tout traitement. L'hébergement et le vieillissement des rats s'étaient faits dans les mêmes conditions et selon le même rythme de vie avec l'alternance de 12 heures de jour et de 12 heures de nuit à l'animalerie de l'université de Montréal. Tous les processus de manipulation ont été accomplis en conformité avec les clauses du comité local de la protection des animaux.

□- Un modèle de la résistance à l'insuline (diabète de type II) a été développé à partir d'une diète riche en dextrose (10%, Sigma) dans l'eau (El Midaoui and de Champlain 2005). Les rats témoins recevaient de l'eau simple. La veille des expériences, on retirait la nourriture (*rat chow*) des deux groupes et l'eau glucosée des rats du groupe avec du dextrose que l'on remplaçait par de l'eau simple. De ce fait, les 2 groupes de rats restaient à jeun jusqu'au lendemain au moment du test.

□- Le modèle de rats avec RCIU utilisé dans ces travaux a été développé par Dre Michèle Brochu, chercheure à l'hôpital Ste-Justine. En résumé, après accouplement, les rats femelles ont été soumises à une diète hyposodée à la dernière semaine de gestation et ont donné naissance à des ratons dont les poids étaient moins que ceux des ratons normaux (Roy-Clavel et al. 1999). Ces rats, âgés de 36 semaines au moment des tests, ont été transférés au site de l'expérience, l'université de Montréal, quelques semaines avant d'être testés. Je tiens à mentionner que l'âge considéré ici a été une pure coïncidence.

□- Un modèle d'hypertension a été développé à partir de l'infusion continue d'Ang II. Dans cette série d'expériences, des rats ont été randomisés pour recevoir soit l'Ang II (200ng/kg/minute; Sigma) soit la saline (placebo) par des minipompes osmotiques (Alzet)

implantées en sous-cutanée pendant 1 et 2 semaines. Pour le processus de l'implantation des pompes, les rats étaient endormis avec un mélange de kétamine (50mg/kg; MTC Pharmaceuticals), de xylazine (5mg/kg ; Bayer) et d'acépromazine (0,25 mg/kg ; Ayerst). Une incision cutanée était pratiquée sur le dos du rat pour permettre l'implantation sous-cutanée de la minipompe préalablement remplie soit d'Ang II soit de saline. Au terme de cette petite chirurgie, deux à trois points de suture étaient faits au site de l'incision. Le rat était ensuite retourné au lieu d'hébergement pour attendre le jour du test.

3.2 Mesure de la fonction érectile

La fonction érectile était mesurée par la stimulation électrique du nerf caverneux chez le rat anesthésié avec l'euthanyl (0,1ml/100g, intrapéritonéal, Sigma) dilué dans de la saline à 1 :4. D'abord, après avoir endormi le rat, la carotide gauche a été isolée et exposée; de même que la crura droite. La cavité abdominale a été ouverte par incision verticale au niveau de la ligne blanche de sorte à exposer la vessie et la prostate. Le nerf caverneux droit a été isolé sur le lobe latéral de la prostate du même côté. Ensuite un cathéter constitué de tube PE 100 (Scientific commodities incorporation) rempli de la solution saline héparinisée (1/1000, Sigma) a été introduit dans la carotide et un autre de même type de tube muni d'une aiguille à son extrémité dans la crura. L'héparine a été utilisée afin de prévenir la coagulation sanguine. Ces deux cathéters avaient été préalablement reliés chacun à un transducteur de pression (Harvard apparatus). Ces deux transducteurs ont été ensuite connectés à un système d'acquisition de données (Biopac systems model MP100) qui était, lui-même, relié à un ordinateur muni d'un logiciel approprié (acqknowledge) pour le traitement et la conversion des données en tracés quantifiables. Le montage expérimental est représenté dans la figure 3.1. La stimulation s'est faite au moyen d'un stimulateur (Austin Electronic) muni des électrodes et alimenté par une pile alcaline Energizer (6 volts, Canadian Tire). Le stimulateur pouvait être calibré de sorte à avoir un grand éventail de voltage, ainsi on a pu obtenir des courbes volt-réponse de 0,89 à 6,50 volts. En effet, à chaque point de stimulation qui durait 1 minute, on pouvait obtenir des variations de pression intracaverneuse (PIC) et d'aire sous courbe (ASC) et de pression artérielle moyenne (PAM) systémique en réponse à la stimulation nerveuse. On laissait s'écouler 3 minutes entre deux stimulations consécutives du nerf afin de lui permettre de récupérer. Afin d'éviter que l'animal à tester ne soit déshydraté, une quantité

de saline était administrée au site de l'incision pour la carotide; et qu'il ne soit refroidi, il était mis sur un tapis chauffant durant toute la manipulation. Les résultats des variations de PIC et de PAM ont été exprimés en millimètres de mercure (mm Hg); la fonction érectile pour chaque groupe de rats a été représentée par des courbes volt-réponse exprimant les variations de PIC et d'ASC normalisées avec la PAM, c'est-à-dire par les ratios de PIC/PAM et ASC/PAM. Tous les calculs ont été obtenus à l'aide du logiciel. Ceci nous a permis d'obtenir deux indices de l'évaluation de la fonction érectile.

À la fin des expériences, du sang a été recueilli à partir du cathéter implanté dans la carotide. Le pénis, l'aorte thoracique, le cœur ont été prélevés à des fins d'analyses histologiques et d'expression protéique. Le sang recueilli a été d'abord laissé à la température ambiante pour ensuite être centrifugé (2000 tours/minute, 4 °C, 20 minutes; GPR Centrifuge, BECKMAN) afin d'obtenir du sérum qui a été aliquoté et gardé à -80 °C jusqu'au jour du dosage de la glycémie et l'insulinémie. Une fois recueillis, les organes ont été d'abord rincés avec de la saline. Le pénis a été sectionné à la base, une coupe destinée à l'analyse histologique a été faite à la partie distale du corps pénien et incubée dans du formol pendant 14-16 heures, transférée dans du PBS avant de les inclure dans de la paraffine. La partie restante a été débarrassée de tout tissu conjonctif et de l'urètre, gelée avec de l'azote liquide et gardée à -80 °C. Le cœur et l'aorte ont été prélevés après l'ouverture de la cage thoracique. Pour le cœur, après avoir débarrassé les oreillettes et le ventricule droit, il a été pesé avant d'en faire une section médiane à des fins histologiques; la partie restante a été, elle aussi, gelée et gardée comme dans le cas du pénis. De même que pour l'aorte, après nettoyage une section a été faite entre la 3^e et la 4^e intercostale pour des études histologiques, et le reste a été conservé pour l'étude protéique.

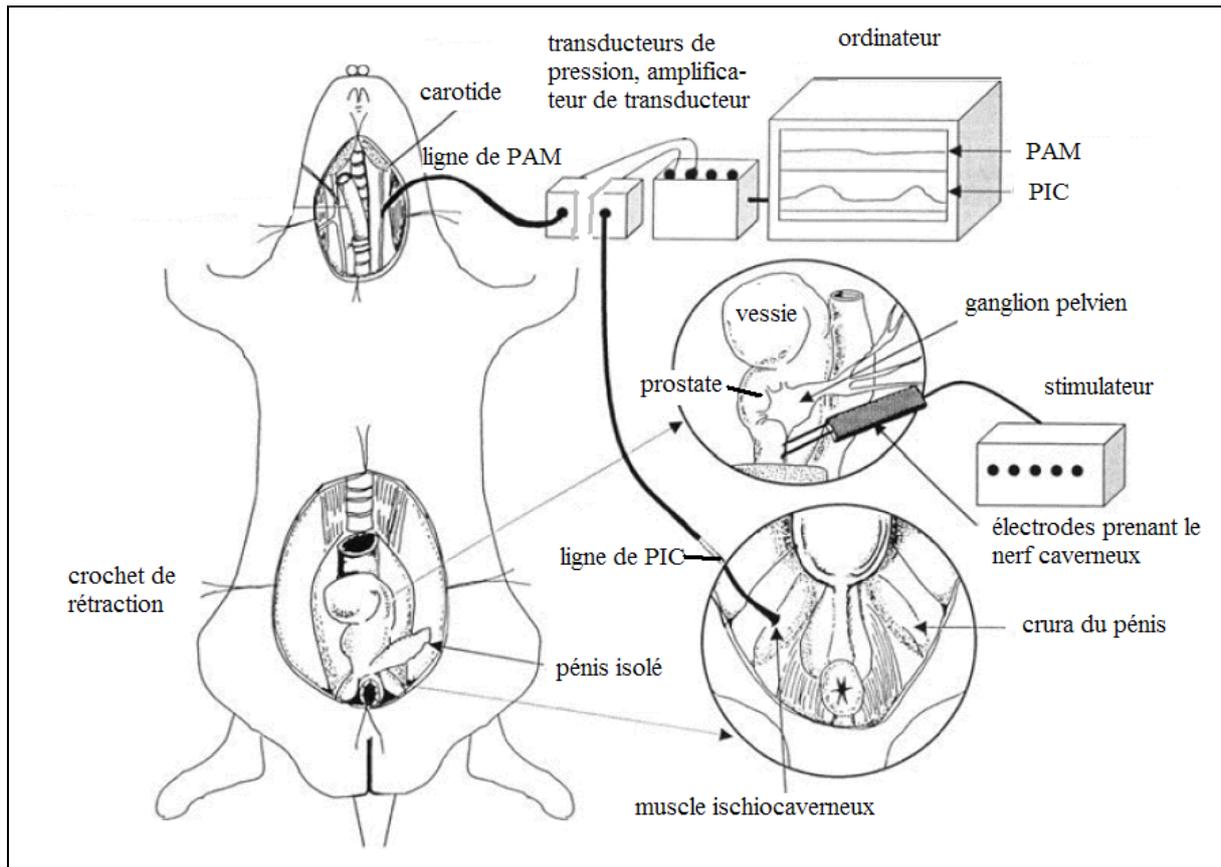


Figure 3.1 Représentation schématique illustrant le montage expérimental utilisé dans l'évaluation de la réponse érectile induite par la stimulation nerveuse *in vivo* dans un modèle de rat. *PAM*, pression artérielle moyenne; *PIC*, pression intracaverneuse. Adapté de (Mehta, Sikka, and Rajasekaran 2008)

3.3 Évaluation de l'indice de l'hypertrophie cardiaque.

L'hypertrophie cardiaque a été estimée par le poids du ventricule gauche (PVG) en milligrammes (mg) normalisé en pourcentage avec le poids corporel (PC) en grammes (g) du rat, c'est-à-dire le ratio PVG/PC.

3.4 Mesure de la glycémie et de l'insulinémie à jeun

Les échantillons de sérum obtenus à partir du sang recueilli dans les études impliquant la diète riche en dextrose (10% dans l'eau de breuvage) ont été soumis au test de glycémie via un glucomètre muni de bandelettes (iTest, WaveSense). À titre de rappel, toute source calorique, à savoir la nourriture et l'eau sucrée, a été retirée la veille du test; et le sang a été recueilli après que l'animal avait subi des stimulations nerveuses pour l'évaluation de la fonction érectile. On a ainsi obtenu une glycémie et une insulïnémie à jeun. Les résultats obtenus pour la glycémie ont été exprimés en millimoles par litre (mM) et ceux de l'insulïnémie en nanogrammes par millilitre (ng/ml).

Le dosage de l'insuline sérique a été accompli par radio-immuno-essai à l'aide d'un kit (Rat Insulin Ria Kit, Linco Research). La procédure a été faite en deux jours et peut se résumer comme suit : après décongélation des échantillons, 100 µl de sérum ont été placés dans un tube dans lequel on a ajouté les mêmes quantités de l'insuline marquée avec l'iode radioactif et de l'anticorps couplé à l'insuline. Les tubes ont été ensuite gardés à 4 °C. Le lendemain, le réactif précipitant a été ajouté dans les solutions. Après incubation et centrifugation à 4 °C pendant 20 minutes chacune, les culots ont été soumis au compteur gamma (Perkin Elmer) pour le décompte. À partir de la disquette enregistreuse des données et du programme spécifique (Origin, Origin Software Inc.) on a pu déterminer la quantité d'insuline dans chaque tube. Chaque échantillon a été mesuré en duplicata.

3.5 Évaluation d'expressions protéiques par immunobuvardage de type Western Blot

Des analyses protéiques ont été faites sur les échantillons de pénis recueillis afin de comprendre les voies impliquées dans les résultats obtenus. Nous nous sommes concentrés sur l'Akt, une protéine en amont dans la cascade menant à l'érection; et sur l'ERK 1/2 et la p38, deux protéines de la famille des MAP kinases dont les surexpressions sont associées à la diminution de la fonction érectiles (Bernier, Haldar, and Michel 2000) (Nangle, Cotter, and Cameron 2006). Comme pour toute évaluation protéique par la technique de Western Blot (buvardage), l'extraction protéique, la migration sur des gels et l'utilisation des anti-corps spécifiques ont été nécessaires.

3.5.1 Extraction et dosage des protéines

Les tissus péniens congelés ont été broyés, pesés pour ensuite être pulvérisés dans de l'azote liquide et homogénéisés dans du tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, Titron X-100 1%, PMSF 0,5 mM, Leupeptine 10 µg/mL, DTT 5 mM, NaF 4 mM, β-glycérophosphate 4mM, Na₃VO₄ 200 µM, Benzamidine 10mM) avec un Ultrasonicateur (Sonic Dismembrator, Fisher) à raison de trois cycles de 20 secondes à 20% d'amplitude. Ensuite s'en été suivies une incubation à 4°C et une centrifugation à haute vitesse pendant 15 minutes. Le surnageant liquide contenant des protéines a été prélevé et dosé par la méthode Bradford à la longueur d'onde de 595 nm. À des fins de comparaison des échantillons, il est important de savoir la quantité de protéines migrées sur le gel, qui dans notre cas est celui d'acrylamide. Le tampon d'échantillon (β-mercaptoéthanol 10%, SDS 4%, Glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,002%) a été préparée de façon à avoir 25-30 µg de protéines. Il a été chauffé à environ 100°C durant 4 minutes avant d'être migré sur du gel d'acrylamide.

3.5.2 Immunobuvardage de type Western

La migration des extraits protéiques a été faite sur des gels d'acrylamide (Tris 0,375 M, acrylamide 10%, SDS 1%, APS 0,1%) en condition dénaturante dans le TetraCell de BioRad pendant 15 minutes à 80 volts puis pendant 1 heure à 130 volts. Le transfert semi-sec sur membrane de nitrocellulose (Hybond-c; BioRad) a été effectué au moyen de l'appareil de transfert (Trans-Blot, BioRad) pendant 1 heure à 15 volts. Le blocage des sites de liaison non spécifiques sur les membranes de nitrocellulose avant l'incubation avec les anticorps et la dilution de ces derniers ont été accomplis avec le tampon TBST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) contenant 5% p/v de lait en poudre. L'incubation des membranes avec les anticorps primaires et secondaires a été faite pendant 1 heure à la température ambiante sur un agitateur ou très rarement pendant 14-16 heures à 4 °C pour les anticorps primaires. Les anticorps secondaires ont été couplés à une peroxydase (HRP) capable de réagir avec la solution d'ECL (Enhanced ChemiLuminescent, Amersham) qui devient alors chimiluminescente. Ensuite la réaction de luminescence qui s'en été suivie a été traduite et développée sur un film Kodak dans la chambre noire au moyen du développeur (Kodak X-OMAT 1000A Processor). La densité des bandes obtenues a été analysée avec un lecteur densitométrique, Image J, qui évalue le taux relatif de marquage de chaque bande de protéine.

3.5.3 Quantification d'expressions protéiques sur les tissus péniens

La cascade conduisant à l'érection implique l'activation de l'Akt qui entraîne la phosphorylation d'eNOS qui catalyse la formation du NO. De même, les protéines ERK et p38 de la famille des MAP kinases ont été associées à la fonction érectile. C'est dans cette vision des choses que nous avons évalué la variation de ces protéines. Les immunobuvardages de type Western ont été effectués sur les protéines extraites des tissus selon le protocole décrit plus haut. Deux types d'anticorps primaires spécifiques ont été utilisés, l'un pour détecter la forme phosphorylée et l'autre pour détecter la forme totale de chacune de ces protéines étudiées à des dilutions de 1 : 10 000 pour Akt total et phospho-Akt, 1 : 2000 pour p38 total et phospho-p38, 1 : 20 000 pour ERK total et 1 : 4000 pour phospho-ERK. Deux anticorps secondaires monoclonaux et polyclonaux, tous deux conjugués à HRP et à des dilutions différentes, ont été utilisés. L'un, l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin à des dilutions de 1 : 2000 pour les deux formes de p38, phospho-ERK ; à 1 : 10 000 pour ERK total et à 1 : 4000 pour Akt total ; l'autre, l'anticorps secondaire de souris anti-IgG à la dilution 1 : 10 000 pour phospho-Akt et à 1 : 20 000 pour la β -actine, une protéine invariable utilisée pour normaliser. Après l'exposition des membranes sur le film Kodak et le développement du film, les bandes considérées comme spécifiques à 38 KDa pour p38 et 42-44 KDa pour ERK et à 68 KDa pour l'Akt. Les résultats, après analyse de la densité des bandes, ont été représentés par le signal de la forme phosphorylée ou totale normalisé par le signal de la β -actine d'une part et par le ratio du signal de la forme phosphorylée sur le signal de la forme totale d'autre part.

3.6 Analyses statistiques

En plus de graphiques, les résultats incluant entre autres poids, glycémie, insulïnémie, expressions protéiques, indice de l'hypertrophie cardiaque, aire de section et nombre de cellules sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'erreur type (SEM) ; et la fonction érectile, quant à elle, en courbes de variations de PIC et d'ASC normalisées avec la valeur de PAM. La signification statistique des résultats a été évaluée par l'analyse de variance (ANOVA) à deux voies ou par le test t de Student. Les tests accomplis en utilisant le programme GraphPad

Prism (version, GraphPad Software Inc.) ont considéré une probabilité inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) comme statistiquement significative.

Chapitre 4

Résultats

4.1 Effet d'une diète riche en glucose sur la fonction érectile, sur des expressions protéiques dans les tissus péniens et sur le ratio PVG/PC

4.1.1 Après 1 semaine chez le rat jeune et chez le rat adulte reproducteur à la retraite

À titre de rappel, les rats adultes reproducteurs à la retraite de cette étude sont des rats qui avaient été utilisés pour procréer et mis hors usage par la suite. Ainsi, l'âge n'est pas connu avec précision. Cependant, on croit que ces rats avaient dépassés 30 semaines d'âge.

Fonction érectile

La diète riche en glucose après 1 semaine a eu des effets diamétralement opposés sur la fonction érectile: effet inhibiteur chez le rat jeune et effet stimulant chez le rat adulte. On observe une diminution hautement significative du ratio PIC/PAM chez le rat jeune (***) $p < 0,001$); et une amélioration très significative de PIC/PAM (** $p < 0,01$) et significative de ASC/PAM ($p < 0,05$) chez le rat adulte reproducteur à la retraite (Figures 4.1.1.A et B).

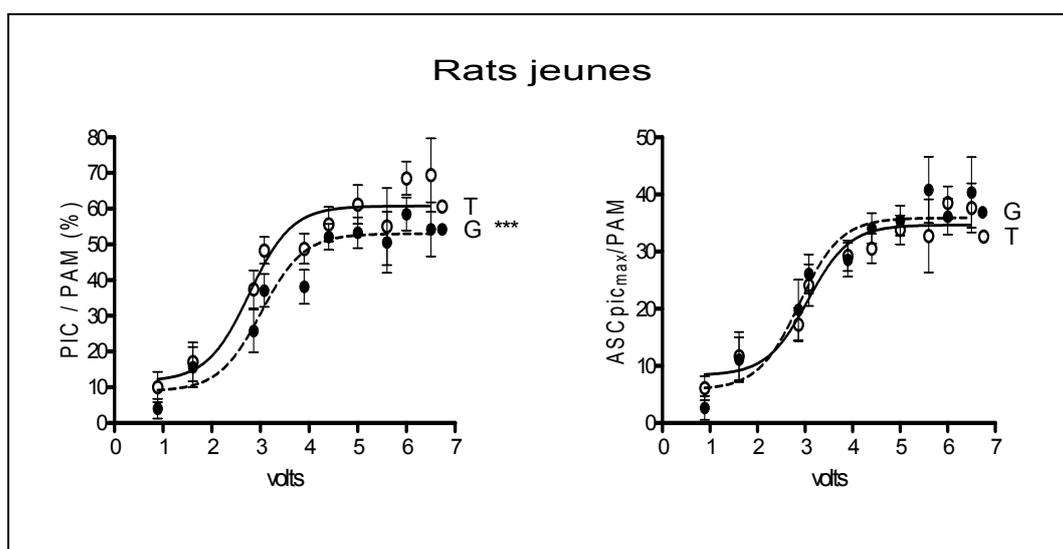


Figure 4.1.1.A

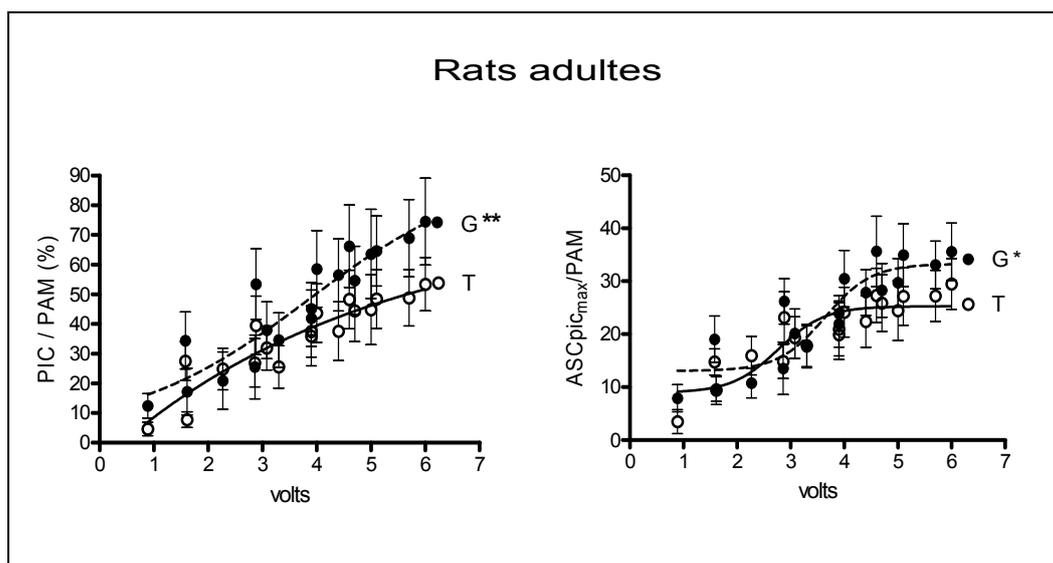


Figure 4.1.1.B

Figure 4.1.1. A et B. Fonction érectile chez le rat jeune (A, 12 semaines d'âge, n = 11/groupe) et chez le rat adulte reproducteur (B, ~ 30 semaines d'âge, n = 6/groupe) après 1 semaine de diète riche en glucose. T = témoins; G = glucose; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Expressions protéiques

La diète riche en glucose après 1 semaine a entraîné une diminution significative de l'expression de la protéine Akt dans sa forme totale ($0,61 \pm 0,06$ vs. $0,19 \pm 0,04$; *** $p < 0,001$) chez le rat jeune. On observe aussi une diminution d'Akt phosphorylé ($0,85 \pm 0,17$ vs. $0,51 \pm 0,20$) bien que non statistiquement significative. Ces résultats supportent la diminution de la fonction érectile observée *in vivo* chez ces mêmes rats (voir Figure 4.1.1.B). Par ailleurs, on note une légère augmentation de l'expression d'ERK phosphorylé ($0,62 \pm 0,07$ vs. $0,66 \pm 0,06$) chez ces rats-là alors que le taux total est diminué ($0,76 \pm 0,07$ vs. $0,55 \pm 0,05$). Cela pourrait être une explication plausible de l'altération de la fonction érectile chez ces jeunes rats après une diète riche en glucose à court terme. En effet, comme susmentionné dans l'introduction, l'activation d'ERK ou la surexpression d'ERK phosphorylé est associée à l'inactivation d'eNOS; entraînant par conséquent une diminution de la production du NO. Autrement dit, quant Akt augmente et/ou eNOS augmente, cela entraîne une augmentation de NO et de la fonction érectile; quant ERK augmente et/ou eNOS diminue, cela entraîne une

diminution de NO et de la fonction érectile. Quant à la protéine p38, pas de changements majeurs n'ont pu être détectés avec la diète.

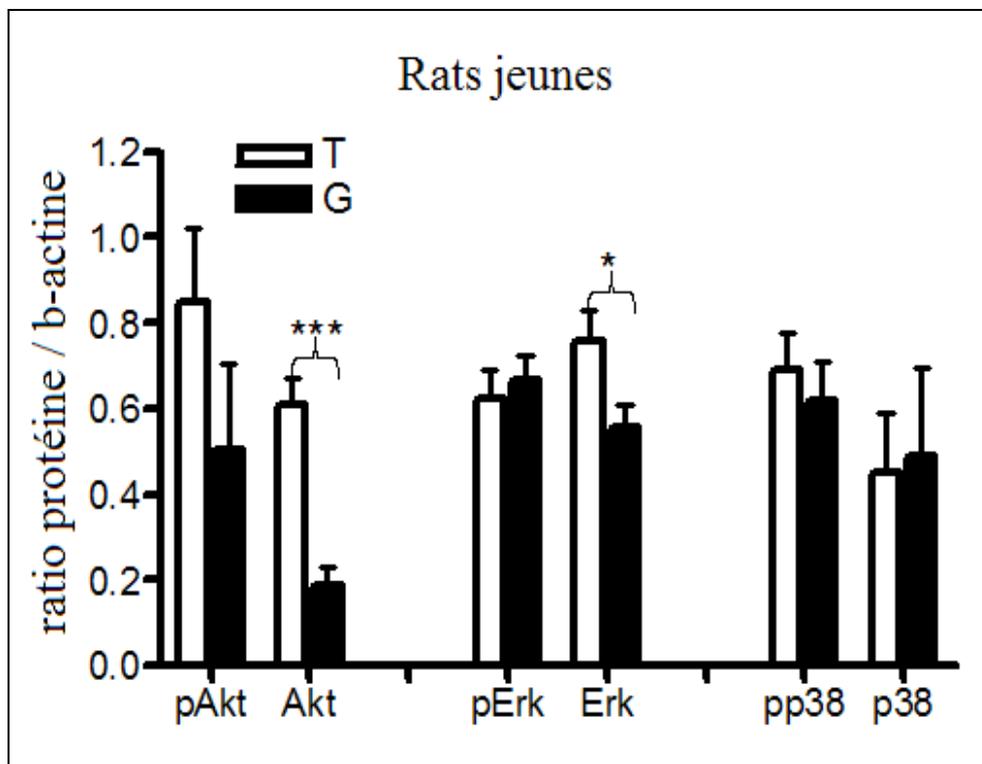


Figure 4.1.1.C

Figure 4.1.1.C. Expressions protéiques (formes phosphorylée et totale) dans les tissus péniens après 1 semaine de diète riche en glucose chez le rat jeune. T = témoins ; G = glucose (n = 6/groupe); * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

4.1.2 Après 6, 12 et 13 semaines chez le rat adulte

À titre explicatif, nous avons considéré l'âge des rats adultes à l'entrée de l'étude à environ 29 semaines du fait qu'il a été suggéré une diminution de la fonction érectile à ces âges-là (Hannan, Heaton, and Adams 2007). Et le choix des durées de la diète a été fait selon la littérature actuelle qui montre que des changements métaboliques induits par des diètes riches en sucrose et dextrose peuvent avoir lieu entre 5 à 12 semaines (Li et al. 2008; Bezerra et al. 2001).

Fonction érectile

Dans les trois cas, on observe, dans les groupes de rats sous diète riche en glucose, une augmentation statistiquement hautement significative des ratios PIC/PAM et ASC/PAM (***) $p < 0,001$) et/ou une déviation de la courbe vers la droite (A et B) par rapport à celle des témoins. La déviation de la courbe vers la droite suggère une augmentation de la réactivité nerveuse par le glucose en diminuant le seuil de la stimulation électrique; c'est-à-dire pour un ratio PIC/PAM de 30%, une stimulation électrique d'environ 3,5 volts est suffisante chez le rat sous glucose, alors que cette même réponse nécessite environ 4,5 volts chez le rat témoin. Cette augmentation de la réactivité nerveuse suggérée pourrait être une composante de cette amélioration de la fonction érectile (Figures 4.1.2.A, B et C).

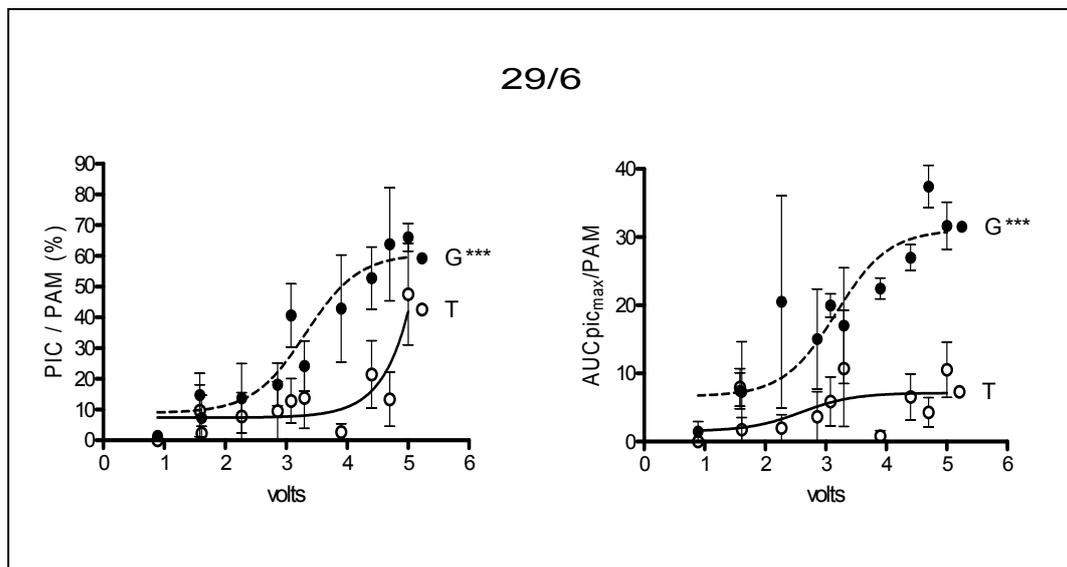


Figure 4.1.2.A

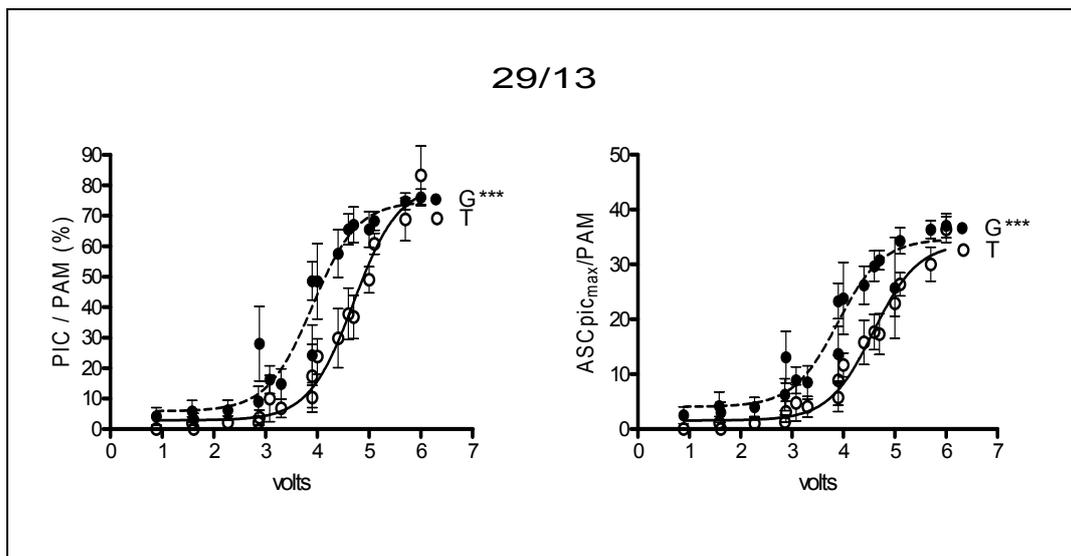
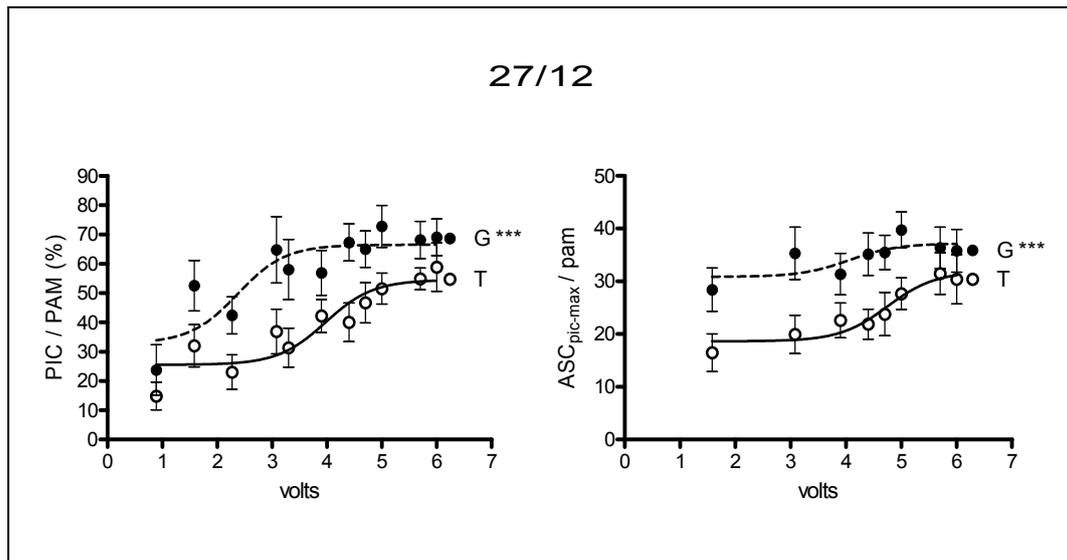


Figure 4.1.2 A, B et C. Fonction érectile chez le rat adulte après 6, 12 et 13 semaines de diète riche en glucose. 29/6 (A, $n = 6/\text{groupe}$) = 29 semaines d'âge à l'entrée de l'étude, 6 semaines de diète; 27/12 (B, 8T vs. 6G) = 27 semaines d'âge à l'entrée de l'étude, 12 semaines de diète; 29/13 (C, $n = 6/\text{groupe}$) = 29 semaines d'âge à l'entrée de l'étude, 13 semaines de diète. *** = $p < 0,001$; T = témoins; G = glucose.

Expressions protéiques dans l'étude 27/12

Nos travaux préliminaires ont seulement été faits sur les 27/12 compte tenu du temps alloué, des travaux complémentaires pourraient avoir lieu. Le groupe de rats sous diète riche en glucose a montré une augmentation, bien que non statistiquement significative, des expressions de la protéine Akt dans ces deux formes, totale ($0,55 \pm 0,04$ vs. $0,82 \pm 0,13$) et phosphorylée ($0,66 \pm 0,12$ vs. $0,81 \pm 0,15$) (Figure 4.1.2.D). Ces résultats corroborent l'amélioration de la fonction érectile observée *in vivo* (voir Figure 4.1.2). En ce qui est de l'expression de la MAP kinase ERK, alors qu'elle est très légèrement augmentée avec le glucose dans sa forme active ($0,69 \pm 0,16$ vs. $0,75 \pm 0,14$), sa forme totale est moins importante avec le glucose ($1,07 \pm 0,23$ vs. $1,00 \pm 0,13$), restant toutefois statistiquement non significative dans les deux formes. Ces résultats suggèrent fort que la voie des MAP kinases n'est pas impliquée de façon importante ni dans l'amélioration de la fonction érectile observée ni dans la détérioration de cette fonction avec le vieillissement.

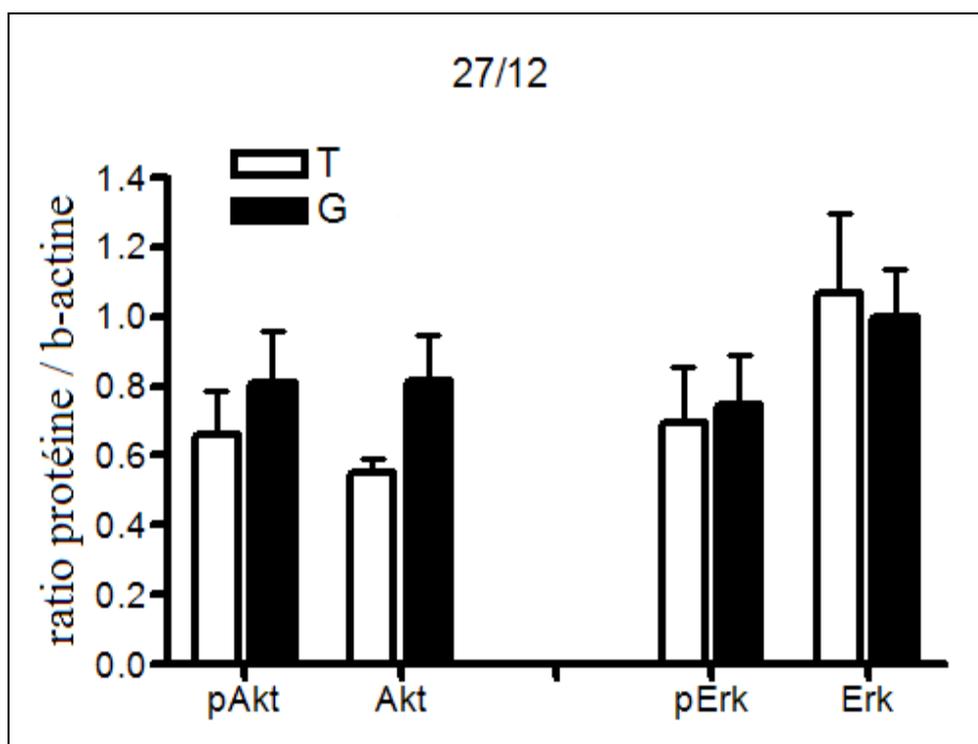


Figure 4.1.2.D

Figure 4.1.2.D. Expressions protéiques (formes phosphorylée et totale) dans les tissus péniens après 12 semaines de diète riche en glucose chez le rat adulte. T = témoins; G = glucose.

Indice de l'hypertrophie cardiaque

Le glucose n'a pas eu d'effet sur le ratio PVG/PC après une consommation continue pendant une durée de 6, 12 et 13 semaines. Cela peut suggérer que l'atteinte du cœur dans les états de la résistance à l'insuline est un phénomène qui n'est pas observé au stade précoce.

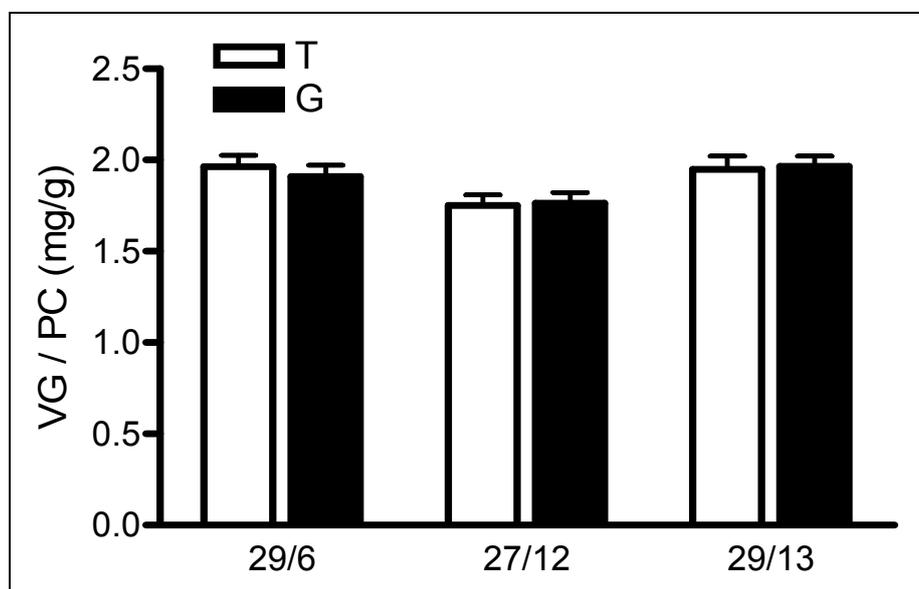


Figure 4.1.2.E

Figure 4.1.2.E. Ratio PVG/PC (poids du ventricule gauche/poids corporel) après 6, 12 et 13 semaines de diète riche en glucose chez le rat adulte. T = témoins; G = glucose.

Autres paramètres

Un rappel : au début des études, les rats étaient randomisés de sorte à avoir pratiquement le même poids moyen dans chaque groupe. La majorité des rats des études de 6 et 13 semaines de diète riche provenaient d'une étude à dose unique de candesartan, un antagoniste des récepteurs de l'Ang II, faite plusieurs mois avant. Dans tous les cas, c'est à partir des poids au début des études et au jour de l'évaluation de la fonction érectile que les calculs du poids corporel et de la prise de poids ont été faits. Aussi, ces données ont été obtenues après un jeun la veille de l'évaluation de la fonction érectile (12 heures en moyenne). On observe une augmentation non statistiquement significative de l'insuline sérique chez les rats avec glucose dans les trois études. En dehors du glucose sérique significativement élevé dans l'une des études (* $p < 0,05$), pas de différence significative entre les groupes n'a été observée dans le poids corporel et la prise pondérale dans les trois études.

	29/6		27/12		29/13	
	T	G	T	G	T	G
Poids corporel (g)	673 ± 30	669 ± 16	722 ± 42	694 ± 38	720 ± 48	750 ± 46
Prise de poids (g)	69 ± 15	67 ± 13	72 ± 16	90 ± 18	122 ± 25	110 ± 21
Glucose sérique (mM)	5,8 ± 1,9	4,4 ± 0,8	Nd	Nd	6,7 ± 0,8	10,4 ± 1,0*
Insuline sérique (ng/ml)	1,7 ± 0,7	2,4 ± 0,4	0,9 ± 0,07	2,03 ± 0,46	2,5 ± 0,7	3,3 ± 1,4

Tableau 1. Différents paramètres évalués après 6, 12 et 13 semaines de diète riche en glucose. T = témoins; G = glucose; Nd = non déterminé ; * = $p < 0,05$

4.2 Influence de la RCIU sur la fonction érectile et sur des expressions protéiques

Fonction érectile

Les rats avec RCIU ont montré une baisse hautement significative de la fonction érectile (PIC/PAM, T: 70% vs RCIU: 50 %; ASC/PAM, T: 37% vs RCIU: 32 %; *** $p < 0,001$) (Figure 4.2.1).

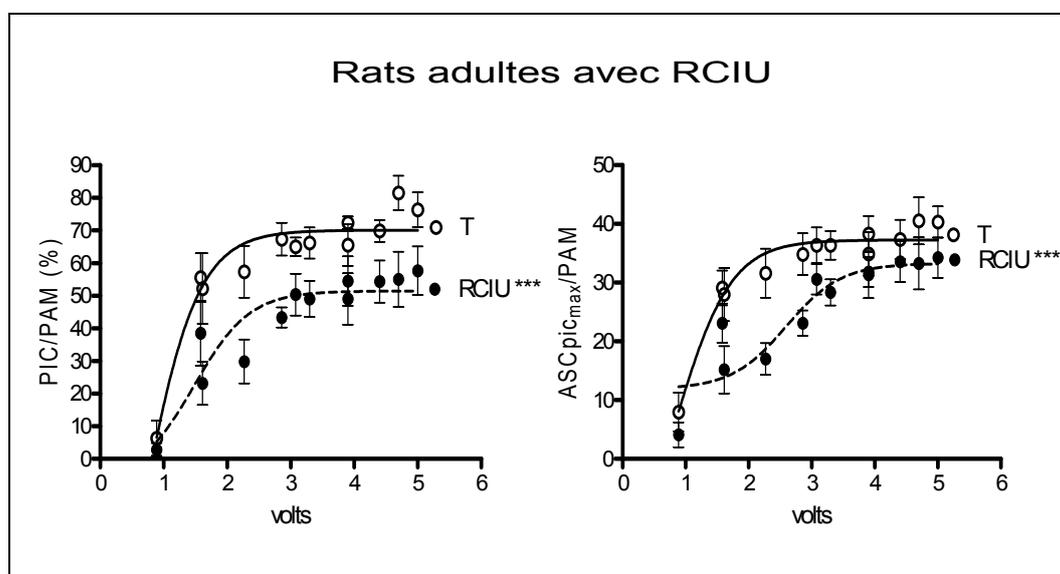


Figure 4.2.1

Figure 4.2.1 Fonction érectile chez le rat adulte (36 semaines d'âge, $n = 6$ /groupe) avec une restriction de croissance intra-utérine (RCIU). T = témoins***; = $p < 0,001$.

Expressions protéiques

Alors que les taux d'Akt total sont similaires dans les deux groupes (T : $0,85 \pm 0,12$ vs RCIU : $0,84 \pm 0,17$), on observe une diminution significative de son expression à la forme phosphorylée chez les rats avec RCIU (T : $0,75 \pm 0,11$ vs $0,40 \pm 0,07$; * $p < 0,05$) (Figure 4.2.2). Ces résultats vont ensemble avec ceux obtenus *in vivo*, montrant une diminution de la fonction érectile chez les RCIU (voir figure 4.2.1). Quand pAkt diminue et/ou NO diminue, cela entraîne une diminution de la fonction érectile. Quant à l'expression d'ERK total, elle est faiblement augmentée chez les témoins ($1,03 \pm 0,09$ vs. RCIU : $0,87 \pm 0,07$) alors qu'elle est sensiblement la même dans sa forme phosphorylée (T : $0,81 \pm 0,08$ vs. RCIU : $0,78 \pm 0,09$). De même que les observations faites plus haut, ces résultats-ci n'appuient pas une implication des MAP kinases, du moins ERK, dans la diminution de la fonction érectile observée avec le vieillissement.

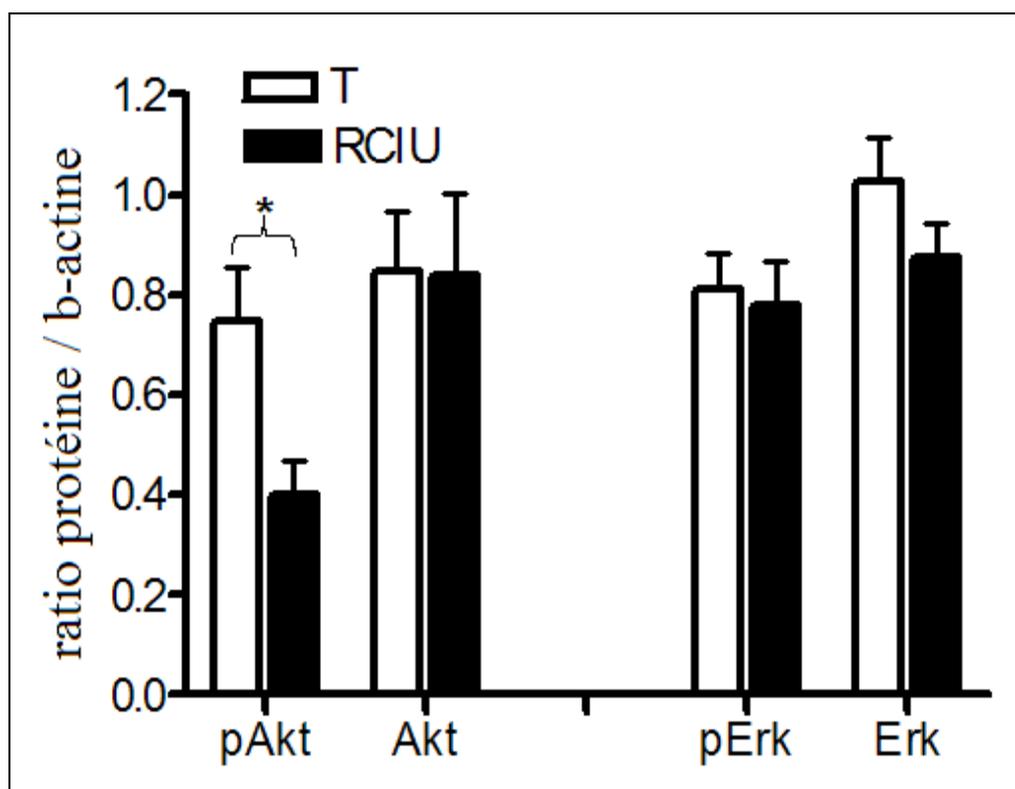


Figure 4.2.2

Figure 4.2.2. Expressions protéiques dans les tissus péniens des rats adultes avec une restriction de croissance intra-utérine (RCIU). T = témoins; * = $p < 0,05$.

4.3 Effet inhibiteur de l'Ang II sur la fonction érectile après 1 et 2 semaines de traitement

Fonction érectile

Après 1 semaine de traitement par l'Ang II, il y a une diminution significative de la fonction érectile. Alors que les ratios PIC/PAM et ASC/PAM dépassent respectivement les 50% et 25% chez les témoins (T), elles n'atteignent respectivement qu'environ 32% (***) et 20% (* $p<0,05$) chez les rats infusés d'Ang II (Figure 4.3.A). Cette diminution de la fonction érectile observée après 1 semaine a été maintenue après 2 semaines de traitement, les ratios PIC/PAM et l'ASC/PAM passent respectivement de 80% et 42% chez les témoins à 60% (***) et 24% (***) chez les rats infusés d'Ang II (Figure 4.3.B).

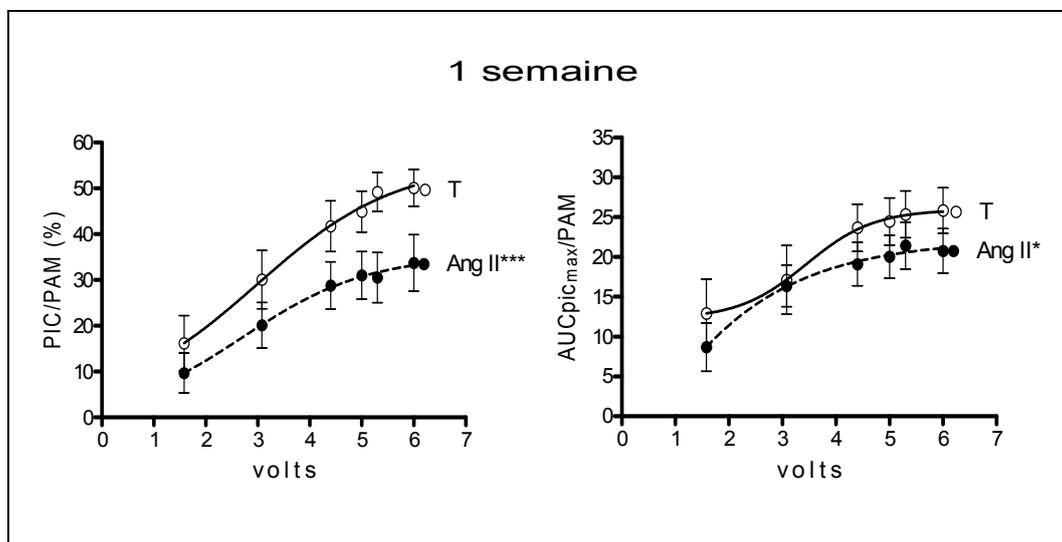


Figure 4.3.A

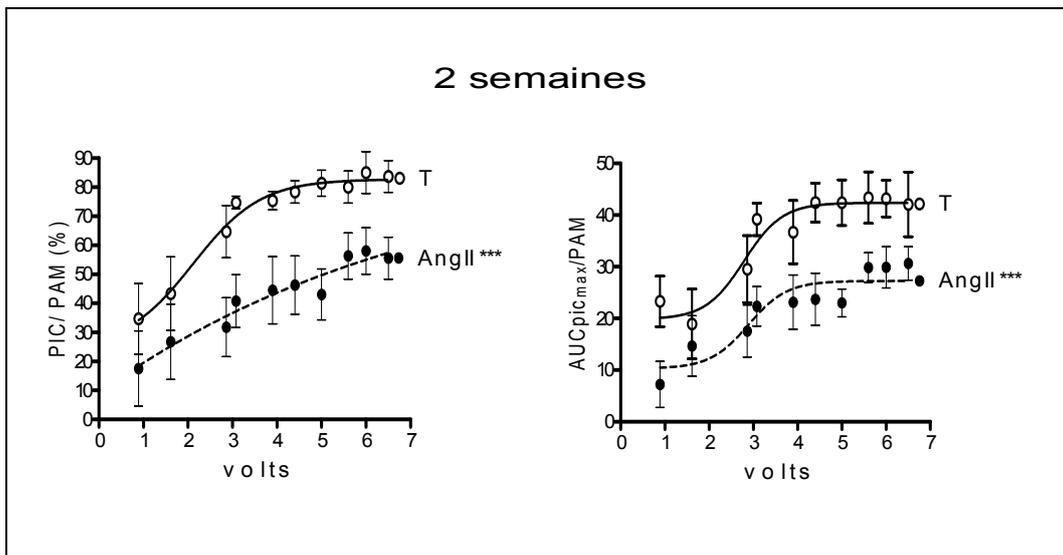


Figure 4.3.B

Figure 4.3.A et B. Effet inhibiteur de l'Ang II sur la fonction érectile après un traitement de 1 semaine (A, n = 11/groupe) et 2 semaines (B, 4Ang II vs 3T). T = témoins; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; PIC = pression intracaverneuse; AUC = aire sous la courbe; PAM = pression artérielle moyenne.

Indice de l'hypertrophie cardiaque

L'infusion continue de l'Ang II a entraîné une augmentation non statistiquement significative du ratio PVG/PC (1 semaine, T : $2,34 \pm 0,09$ vs Ang II $2,70 \pm 0,15$; 2 semaines, T : $3,02 \pm 0,20$ vs Ang II $3,39 \pm 0,15$; $p > 0,05$) (Fig 4.3.C).

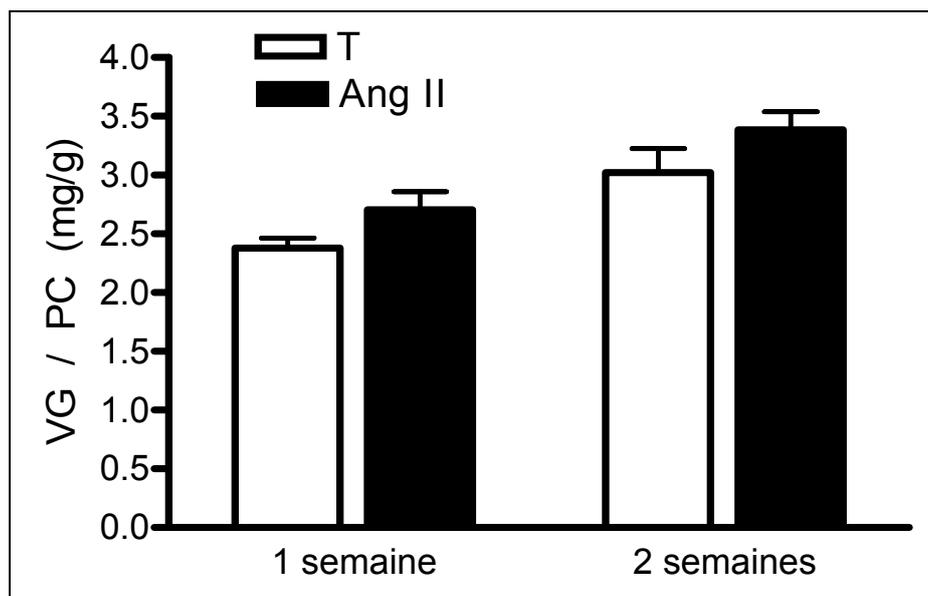


Figure 4.3.C

Figure 4.3.C. Ratio PVG/PC (poids du ventricule gauche/poids corporel) après 1 et 2 semaines d'infusion chronique de 200 ng/kg/min d'Ang (angiotensine) II chez le rat jeune. T = témoins.

Aire de section et nombre de cellules sur des coupes de l'aorte thoracique

L'infusion continue de l'Ang II n'a pas entraîné de changements histologiques sur l'aorte thoracique en se basant sur l'aire de section (T: $0,47 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ vs Ang II : $0,48 \pm 0,03 \text{ mm}^2$) et sur le nombre de cellules (T : $174 \pm 12 \text{ cellules}/\mu\text{m}$ vs Ang II : $177 \pm 17 \text{ cellules}/\mu\text{m}$) (Figure 4.3.D).

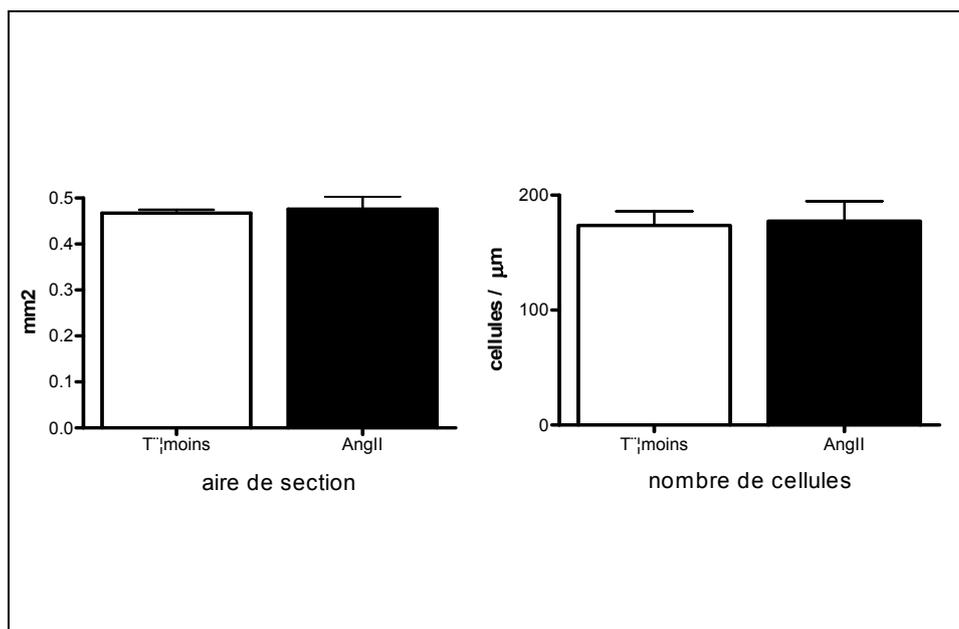


Figure 4.3.D

Figure 4.3.D. Aire de section et nombre de cellules sur des coupes de l'aorte thoracique après 1 semaine d'infusion de 200ng/kg/min d'Ang (angiotensine) II.

Chapitre 5

Discussion

D'une part, les rongeurs, en particulier le rat, sont considérés comme d'excellents modèles de la DE induite avec le vieillissement (Gonzalez-Cadavid and Rajfer 2004) ; d'autre part, beaucoup de modèles de rat avec des facteurs de risque de la DE ont fait l'objet d'étude de la fonction érectile. Cependant la littérature actuelle manque encore de données sur les modèles de rats avec les facteurs de risque de la DE utilisés dans ce mémoire, à savoir le rat avec une résistance à l'insuline générée par une diète riche en glucose, le rat avec un RCIU et le rat infusé avec l'Ang II. C'est dans ce contexte que nous avons essayé de développer ces modèles afin d'en évaluer la fonction érectile.

Glucose et DE

Des diètes riches en sucrose et fructose ont été utilisées dans des modèles animaux pour induire des changements métaboliques observés dans de diverses pathologies incluant entre autres la résistance à l'insuline, l'hypertension, la dyslipidémie (Pagliassotti et al. 2000). Cependant, la capacité des aliments nutritifs à affecter l'action de l'insuline dépend de plusieurs facteurs comprenant la durée de la diète, la composition de la diète, l'âge, voire la lignée de rat étudiée et autres encore (Pagliassotti et al. 2000). Ainsi, il y a des études qui montrent le développement de la résistance à l'insuline au bout de 5 à 12 semaines de diète riche en sucrose ou fructose (Li et al. 2008; Bezerra et al. 2001) et d'autres non (Stark, Timar, and Madar 2000).

Nous avons montré que, après une diète riche en glucose pendant 1 semaine, les rats jeunes exhibaient une baisse de la fonction érectile. Cela pourrait s'expliquer par le stress aigu engendré par le glucose sur l'endothélium. En effet, la consommation d'une diète riche en sucrose ou fructose pendant deux semaines chez le rat jeune montre un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la défense anti-oxydante (Busserolles, Rock et al. 2002; Busserolles, Zimowska et al. 2002). Il est, par ailleurs, connu que ce déséquilibre en faveur des radicaux libres ou la surproduction de ces derniers a un effet néfaste sur l'endothélium

vasculaire. L'endothélium ainsi affecté limite sa production de NO. Les résultats sur l'étude protéique montrant une suppression d'expression d'Akt supportent indirectement l'existence d'une dysfonction endothéliale; car la phosphorylation et l'activation de l'eNOS, qui est à l'origine du maintien de l'érection par production soutenue de NO, dépendent étroitement d'Akt. Nous avons suggéré plus bas la sensibilité plus accrue du tissu pénien par rapport au cœur et aux gros vaisseaux dans les atteintes cardiovasculaires et l'atteinte fonctionnelle plus précoce que l'atteinte structurelle dans les stades aigus dans l'étude avec l'infusion continue de l'Ang II. La détérioration de la fonction érectile dans cette étude avec une diète riche en hydrates de carbone à court terme sans autres atteintes retrouvées vient appuyer cette suggestion.

Cependant, l'explication avancée plus haut à savoir que la consommation d'une diète riche en hydrates de carbone à court terme entraîne un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la défense anti-oxydante n'est pas toujours vraie. La consommation du glucose a masqué la DE observée avec le vieillissement. En effet, cette même diète riche en glucose donnée à des rats adultes ayant servi de procréateurs pendant la même durée (1 semaine) a eu un effet contraire, c'est-à-dire une amélioration de la fonction érectile (Figure 4.1.1.B). Il est suggéré que l'augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans des diètes riches en hydrates de carbone est plus importante chez les rats âgés comparés aux rats jeunes (Hara et al. 1992). Bien que la résistance périphérique à l'insuline associée ait lieu aussi bien chez les rats jeunes que chez les rats âgés (Pagliassotti et al. 2000) ; à court terme c'est-à-dire avant l'apparition de la résistance à l'insuline qui n'est pas toujours évidente dans ces modèles animaux, la sécrétion augmentée de l'insuline chez ces rats adultes pourrait avoir des effets bénéfiques sur la fonction érectile. En effet, l'insuline peut promouvoir la libération du NO via l'activation de l'eNOS (Wheatcroft et al. 2003). Ceci est crucial pour la vasodilatation du muscle lisse pénien conduisant à une bonne érection. Selon cette hypothèse, on devrait s'attendre à une détérioration de la fonction érectile quand l'insuline deviendra inefficace à long terme.

Le vieillissement étant associé à une baisse de la fonction érectile et le glucose à des troubles métaboliques conduisant à des atteintes de toute sorte, notre hypothèse de base était qu'une diète riche en glucose devrait aggraver la DE observée avec le vieillissement. Cependant, la diète riche en glucose que ce soit après 1 semaine ou après 6, 12 et 13 semaines chez le rat adulte a eu un effet inattendu sur la fonction érectile, une amélioration voire carrément un

renversement de la DE observée chez ces rats adultes. Les résultats obtenus sont à l'encontre des résultats escomptés. À titre de rappel, nous avons premièrement suivi à différents âges des cohortes de rats afin de déterminer l'âge à partir duquel la fonction érectile présente une chute significative avant d'initier cette diète. Compte tenu de la variabilité de la souche de rats Sprague Dawley, il est difficile de fixer un âge avec certitude. Cependant nos travaux suggèrent que cela prend plus de temps comparativement aux données de Hannan (Hannan, Heaton, and Adams 2007) qui suggèrent une diminution de la fonction érectile aux alentours de 29 semaines. Quant à l'amélioration de la fonction érectile ou le renversement de la DE par le glucose, ce serait probablement dû à des mécanismes compensateurs de l'organisme vis-à-vis de ces changements déclenchés par le glucose. Par ailleurs, nos travaux préliminaires sur les mécanismes moléculaires par lesquels le glucose a eu cet impact positif sur la fonction érectile chez le rat âgé ont montré une augmentation des niveaux d'expression d'Akt associée à une augmentation de l'insuline sérique bien que non statistiquement significative. Bien que la DE associée au vieillissement soit une condition impliquant des mécanismes complexes, les résultats de nos travaux pointent vers la participation directe de la voie de signalisation vasodilatatrice de l'insuline dans l'amélioration de la fonction érectile par le glucose. Nos travaux n'ont pas révélé d'autres changements significatifs avec le glucose incluant, entre autres, la prise de poids corporelle, la masse cardiaque.

RCIU et DE

Le RCIU est une condition avec une susceptibilité au développement de pathologies, en l'occurrence cardiovasculaires. Nous avons montré que des rats âgés, nés des mères qui ont été soumises à une diète hyposodée à la dernière semaine de gestation c'est-à-dire des rats ayant été développés dans un milieu intra-utérin défavorable, présentaient une diminution de la fonction érectile comparativement aux témoins normaux. Un fait intéressant, cette diminution de la fonction érectile est associée à une sous-expression d'Akt phosphorylé. La voie des MAP kinases connue comme inhibitrice de la fonction érectile, quant à elle, ne semble pas être impliquée. Ces travaux, les premiers à être réalisés, à notre connaissance, viennent supporter l'hypothèse de Berker selon laquelle un milieu intra-utérin défavorable était associé aux risques accrus de maladies à l'âge adulte (Barker et al. 1993). Contrairement au vieillissement normal ne faisant pas impliquer l'Akt, la modulation de la fonction érectile dans ce type de vieillissement avec des déficits intra-utérins dépend de l'implication d'Akt.

Angiotensine et DE

L'activation du SRA avec son médiateur principal, l'Ang II, est associée à l'augmentation de la pression artérielle et des dommages vasculaires (Michel 2004). Nous avons montré qu'une infusion continue de l'Ang II pendant 1 semaine avait des répercussions sur la fonction érectile et cette atteinte de la fonction érectile était maintenue après 2 semaines d'infusion sans toutefois entraîner l'hypertrophie cardiaque évaluable et des changements structuraux de l'aorte thoracique. Ces résultats suggèrent que le tissu pénien serait plus sensible que le cœur et appuient l'hypothèse selon laquelle la DE est le marqueur précoce des maladies cardiovasculaires. Par ailleurs, l'étude sur l'aire de section et le nombre de cellules faite sur des coupes de l'aorte thoracique chez les rats après 1 semaine d'infusion de l'Ang II n'a pas montré de différence significative entre les groupes (figure 4.3.2). Ce qui permet de dire que cette sensibilité du tissu pénien dans les maladies cardiovasculaires dépasse non seulement le cœur mais aussi les gros vaisseaux, en faisant à l'allusion à l'aorte thoracique.

Il est connu que l'Ang II peut induire l'inflammation dans la paroi vasculaire, le dépôt de matrice extracellulaire, et l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie de cellules du muscle lisse vasculaire (De Ciuceis et al. 2005). Cependant ces changements structuraux n'ont pas été observés après 1 semaine d'infusion continue de l'Ang II. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'atteinte fonctionnelle précède l'atteinte structurale (remodelage morphologique) dans le mécanisme pathologique engendré par l'Ang II.

Chapitre 6

Conclusion

Ces travaux ; les premiers à évaluer l'impact de la diète riche en glucose, du RCIU et de l'infusion chronique de l'Ang II sur la fonction érectile; ont permis de développer de nouveaux modèles de DE et suggèrent que 1) la diète riche en glucose en aigu (1 semaine) peut avoir des effets diamétralement opposés, délétère ou bénéfique, sur la fonction érectile selon que celle-ci était bonne ou mauvaise à la base. On observe une amélioration quand celle-ci est diminuée à la base et une détérioration quand celle-ci est normale à la base. Le glucose en chronique masque la DE associée au vieillissement via l'action vasodilatatrice de l'insuline. 2) le RCIU est associé au développement de la DE à l'âge adulte et peut, de ce fait, être considéré comme un facteur de risque de la DE. La diminution de la fonction érectile observée chez ces rats avec RCIU est fort probablement associée à la dysfonction endothéliale. 3) la DE précède le développement de l'hypertrophie cardiaque supportant l'hypothèse telle que le système érectile serait une cible précoce des complications des maladies cardiovasculaires du SRA. 4) la voie des MAP kinases ne semble pas être impliquée dans la détérioration de la fonction érectile observée. 5) les rats Sprague-Dawley sont une lignée qui présente une grande variabilité, cela peut être une explication du pourquoi la fonction érectile évaluée à la même tranche d'âge variait d'une cohorte à une autre.

En résumé, l'implication d'Akt dans la DE associée au vieillissement dépend du type de vieillissement (normal vs. RCIU) et de la diète.

En guise de perspectives, ces études préliminaires ouvrent la voie à d'autres études en ce qui concerne l'utilisation de ces modèles développés afin d'en approfondir les connaissances et d'en élucider les voies probables impliquées.

Chapitre 7

Bibliographie

- Abe, C., J. Minami, M. Ohrui, T. Ishimitsu, and H. Matsuoka, 2007, Lower birth weight is associated with higher resting heart rate during boyhood, *Hypertens Res* 30, 945-950.
- Andersson, K. E., 2001, Pharmacology of penile erection, *Pharmacol Rev* 53, 417-450.
- Andersson, K. E., 2003, Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction, *J Urol* 170, S6-13; discussion S13-14.
- Bansal, T. C., A. T. Guay, J. Jacobson, B. O. Woods, and R. W. Nesto, 2005, Incidence of metabolic syndrome and insulin resistance in a population with organic erectile dysfunction, *J Sex Med* 2, 96-103.
- Barker, D. J., 2006, Birth weight and hypertension, *Hypertension* 48, 357-358.
- Barker, D. J., P. D. Gluckman, K. M. Godfrey, J. E. Harding, J. A. Owens, and J. S. Robinson, 1993, Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life, *Lancet* 341, 938-941.
- Battista, M. C., L. L. Oligny, J. St-Louis, and M. Brochu, 2002, Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E124-131.
- Becker, A. J., S. Uckert, C. G. Stief, F. Scheller, W. H. Knapp, U. Hartmann, and U. Jonas, 2001, Plasma levels of angiotensin II during different penile conditions in the cavernous and systemic blood of healthy men and patients with erectile dysfunction, *Urology* 58, 805-810.
- Becker, A. J., S. Uckert, C. G. Stief, F. Scheller, W. H. Knapp, S. A. Machtens, M. A. Kuczyk, and U. Jonas, 2002, Systemic and cavernous plasma levels of vasoactive intestinal polypeptide during sexual arousal in healthy males, *World J Urol* 20, 59-63.
- Behr-Roussel, D., D. Gorny, K. Mevel, S. Compagnie, P. Kern, V. Sivan, J. Bernabe, M. P. Bedigian, L. Alexandre, and F. Giuliano, 2005, Erectile dysfunction: an early marker for hypertension? A longitudinal study in spontaneously hypertensive rats, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R276-283.
- Bender, A. T., and J. A. Beavo, 2006, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use, *Pharmacol Rev* 58, 488-520.
- Bennett, N. E., J. H. Kim, D. P. Wolfe, K. Sasaki, N. Yoshimura, W. F. Goins, S. Huang, J. B. Nelson, W. C. de Groat, J. C. Glorioso, and M. B. Chancellor, 2005, Improvement in erectile dysfunction after neurotrophic factor gene therapy in diabetic rats, *J Urol* 173, 1820-1824.

- Bernier, S. G., S. Haldar, and T. Michel, 2000, Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase, *J Biol Chem* 275, 30707-30715.
- Bezerra, R. M., M. Ueno, M. S. Silva, D. Q. Tavares, C. R. Carvalho, M. J. Saad, and J. A. Gontijo, 2001, A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats, *Braz J Med Biol Res* 34, 1155-1160.
- Bivalacqua, T. J., J. S. Armstrong, J. Biggerstaff, A. B. Abdel-Mageed, P. J. Kadowitz, W. J. Hellstrom, and H. C. Champion, 2003, Gene transfer of extracellular SOD to the penis reduces O₂⁻ and improves erectile function in aged rats, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H1408-1421.
- Bivalacqua, T. J., M. F. Usta, M. Kendirci, L. Pradhan, X. Alvarez, H. C. Champion, P. J. Kadowitz, and W. J. Hellstrom, 2005, Superoxide anion production in the rat penis impairs erectile function in diabetes: influence of in vivo extracellular superoxide dismutase gene therapy, *J Sex Med* 2, 187-197; discussion 197-188.
- Bocchio, M., G. Desideri, P. Scarpelli, S. Necozone, G. Properzi, C. Spartera, F. Francavilla, C. Ferri, and S. Francavilla, 2004, Endothelial cell activation in men with erectile dysfunction without cardiovascular risk factors and overt vascular damage, *J Urol* 171, 1601-1604.
- Bochinski, D., P. S. Hsieh, L. Nunes, G. T. Lin, C. S. Lin, E. M. Spencer, and T. F. Lue, 2004, Effect of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 complex in cavernous nerve cryoablation, *Int J Impot Res* 16, 418-423.
- Brownlee, M., 2001, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature* 414, 813-820.
- Burnett, A. L., 2008, Erectile Dysfunction Management for the Future, *J Androl*.
- Burnett, A. L., and T. F. Lue, 2006, Neuromodulatory therapy to improve erectile function recovery outcomes after pelvic surgery, *J Urol* 176, 882-887.
- Busserolles, J., E. Rock, E. Gueux, A. Mazur, P. Grolier, and Y. Rayssiguier, 2002, Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats, *Br J Nutr* 87, 337-342.
- Busserolles, J., W. Zimowska, E. Rock, Y. Rayssiguier, and A. Mazur, 2002, Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression, *Life Sci* 71, 1303-1312.
- Carneiro, F. S., K. P. Nunes, F. R. Giachini, V. V. Lima, Z. N. Carneiro, E. F. Nogueira, R. Leite, A. Ergul, W. E. Rainey, R. Clinton Webb, and R. C. Tostes, 2008, Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension, *J Sex Med* 5, 2793-2807.

- Cartledge, J. J., I. Eardley, and J. F. Morrison, 2001, Advanced glycation end-products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation seen in diabetes, *BJU Int* 87, 402-407.
- Caskurlu, T., A. I. Tasci, S. Resim, T. Sahinkanat, and E. Ergenekon, 2004, The etiology of erectile dysfunction and contributing factors in different age groups in Turkey, *Int J Urol* 11, 525-529.
- Chen, D., Y. X. Shan, and Y. T. Dai, 2008, [Advanced glycation end products and their receptors elevate the activity of endothelin-1 in rat cavernosum], *Zhonghua Nan Ke Xue* 14, 110-115.
- Chen, Y., S. X. Li, L. S. Yao, R. Wang, and Y. T. Dai, 2007, Valsartan treatment reverses erectile dysfunction in diabetic rats, *Int J Impot Res* 19, 366-370.
- Chitale, K., R. C. Webb, A. M. Dorrance, and T. M. Mills, 2001, Decreased penile erection in DOCA-salt and stroke prone-spontaneously hypertensive rats, *Int J Impot Res* 13 Suppl 5, S16-20.
- Chitale, K., D. Weber, and R. C. Webb, 2001, RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension, *Curr Hypertens Rep* 3, 139-144.
- Christ, G. J., 1995, The penis as a vascular organ. The importance of corporal smooth muscle tone in the control of erection, *Urol Clin North Am* 22, 727-745.
- Christ, G. J., K. E. Andersson, K. Williams, W. Zhao, R. D'Agostino, Jr., J. Kaplan, T. Aboushwareb, J. Yoo, G. Calenda, K. P. Davies, R. S. Sellers, and A. Melman, 2008, Smooth-Muscle-Specific Gene Transfer with the Human Maxi-K Channel Improves Erectile Function and Enhances Sexual Behavior in Atherosclerotic Cynomolgus Monkeys, *Eur Urol*.
- Christ, G. J., N. Day, C. Santizo, Y. Sato, W. Zhao, T. Scalfani, R. Bakal, M. Salman, K. Davies, and A. Melman, 2004, Intracorporal injection of hSlo cDNA restores erectile capacity in STZ-diabetic F-344 rats in vivo, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H1544-1553.
- Conti, E., C. Carrozza, E. Capoluongo, M. Volpe, F. Crea, C. Zuppi, and F. Andreotti, 2004, Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor, *Circulation* 110, 2260-2265.
- Cook, S., and U. Scherrer, 2002, Insulin resistance, a new target for nitric oxide-delivery drugs, *Fundam Clin Pharmacol* 16, 441-453.
- Cordain, L., M. R. Eades, and M. D. Eades, 2003, Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 136, 95-112.
- Dai, Y., D. M. Pollock, R. L. Lewis, C. J. Wingard, V. S. Stopper, and T. M. Mills, 2000, Receptor-specific influence of endothelin-1 in the erectile response of the rat, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R25-30.

- Davies, A. A., G. D. Smith, Y. Ben-Shlomo, and P. Litchfield, 2004, Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees, *Circulation* 110, 1258-1262.
- Davies, A. A., G. D. Smith, M. T. May, and Y. Ben-Shlomo, 2006, Association between birth weight and blood pressure is robust, amplifies with age, and may be underestimated, *Hypertension* 48, 431-436.
- De Ciuceis, C., F. Amiri, P. Brassard, D. H. Endemann, R. M. Touyz, and E. L. Schiffrin, 2005, Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2106-2113.
- De Young, L. X., T. Domes, K. Lim, J. Carson, and G. B. Brock, 2008, Endothelial rehabilitation: the impact of chronic PDE5 inhibitors on erectile function and protein alterations in cavernous tissue of diabetic rats, *Eur Urol* 54, 213-220.
- Dean, R. C., and T. F. Lue, 2005, Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction, *Urol Clin North Am* 32, 379-395, v.
- Diaz-Arjonilla, M., M. Schwarcz, R. S. Swerdloff, and C. Wang, 2009, Obesity, low testosterone levels and erectile dysfunction, *Int J Impot Res* 21, 89-98.
- Dinsmore, W. W., C. Gingell, G. Hackett, P. Kell, D. Savage, R. Oakes, and G. D. Frenzt, 1999, Treating men with predominantly nonpsychogenic erectile dysfunction with intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide and phentolamine mesylate in a novel auto-injector system: a multicentre double-blind placebo-controlled study, *BJU Int* 83, 274-279.
- Dorrance, A. M., R. W. Lewis, and T. M. Mills, 2002, Captopril treatment reverses erectile dysfunction in male stroke prone spontaneously hypertensive rats, *Int J Impot Res* 14, 494-497.
- El-Sakka, A. I., and T. F. Lue, 2004, Physiology of penile erection, *ScientificWorldJournal* 4 Suppl 1, 128-134.
- Fandel, T. M., A. J. Bella, G. Lin, K. Tantiwongse, C. S. Lin, J. Pohl, and T. F. Lue, 2008, Intracavernous growth differentiation factor-5 therapy enhances the recovery of erectile function in a rat model of cavernous nerve injury, *J Sex Med* 5, 1866-1875.
- Ferrini, M. G., H. H. Davila, E. G. Valente, N. F. Gonzalez-Cadavid, and J. Rajfer, 2004, Aging-related induction of inducible nitric oxide synthase is vasculo-protective to the arterial media, *Cardiovasc Res* 61, 796-805.
- Gamborg, M., L. Byberg, F. Rasmussen, P. K. Andersen, J. L. Baker, C. Bengtsson, D. Canoy, W. Droyvold, J. G. Eriksson, T. Forsen, I. Gunnarsdottir, M. R. Jarvelin, I. Koupil, L. Lapidus, T. I. Nilsen, S. F. Olsen, L. Schack-Nielsen, I. Thorsdottir, T. P. Tuomainen, and T. I. Sorensen, 2007, Birth weight and systolic blood pressure in adolescence and

- adulthood: meta-regression analysis of sex- and age-specific results from 20 Nordic studies, *Am J Epidemiol* 166, 634-645.
- Gao, B. H., S. T. Zhao, F. W. Meng, B. K. Shi, Y. Q. Liu, and Z. S. Xu, 2007, Y-27632 improves the erectile dysfunction with ageing in SD rats through adjusting the imbalance between nNo and the Rho-kinase pathways, *Andrologia* 39, 146-150.
- Giuliano, F., J. Allard, O. Rampin, S. Droupy, G. Benoit, L. Alexandre, and J. Bernabe, 2001, Spinal proerectile effect of apomorphine in the anesthetized rat, *Int J Impot Res* 13, 110-115.
- Giuliano, F., and O. Rampin, 2000, Central neural regulation of penile erection, *Neurosci Biobehav Rev* 24, 517-533.
- Jin, L., and A. L. Burnett, 2004, Neural control of erection, *Physiol Behav* 83, 189-201.
- Giuliano, F., O. Rampin, J. Bernabe, and J. P. Rousseau, 1995, Neural control of penile erection in the rat, *J Auton Nerv Syst* 55, 36-44.
- Goldenberg, R. L., and J. F. Culhane, 2007, Low birth weight in the United States, *Am J Clin Nutr* 85, 584S-590S.
- Gonzalez-Cadavid, N. F., and J. Rajfer, 2004, Molecular pathophysiology and gene therapy of aging-related erectile dysfunction, *Exp Gerontol* 39, 1705-1712.
- Greenfield, J. M., and C. F. Donatucci, 2007, Smoking, obesity, and sedentary lifestyle linked to erectile dysfunction, *Nat Clin Pract Urol* 4, 16-17.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, 2000, NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease, *Circ Res* 86, 494-501.
- Hafez, E. S., and S. D. Hafez, 2005, Erectile dysfunction: anatomical parameters, etiology, diagnosis, and therapy, *Arch Androl* 51, 15-31.
- Hale, T. M., H. Okabe, T. L. Bushfield, J. P. Heaton, and M. A. Adams, 2002, Recovery of erectile function after brief aggressive antihypertensive therapy, *J Urol* 168, 348-354.
- Hannan, J. L., J. P. Heaton, and M. A. Adams, 2007, Recovery of erectile function in aging hypertensive and normotensive rats using exercise and caloric restriction, *J Sex Med* 4, 886-897.
- Hara, S. L., R. C. Ruhe, D. L. Curry, and R. B. McDonald, 1992, Dietary sucrose enhances insulin secretion of aging Fischer 344 rats, *J Nutr* 122, 2196-2203.
- He, J., K. Reynolds, J. Chen, C. S. Chen, X. Wu, X. Duan, R. Reynolds, L. A. Bazzano, P. K. Whelton, and D. Gu, 2007, Cigarette smoking and erectile dysfunction among Chinese men without clinical vascular disease, *Am J Epidemiol* 166, 803-809.
- Hecht, M. J., B. Neundorfer, F. Kiesewetter, and M. J. Hilz, 2001, Neuropathy is a major contributing factor to diabetic erectile dysfunction, *Neurol Res* 23, 651-654.

- Hurt, K. J., B. Musicki, M. A. Palese, J. K. Crone, R. E. Becker, J. L. Moriarity, S. H. Snyder, and A. L. Burnett, 2002, Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4061-4066.
- Hwang, T. I., and Y. C. Lin, 2008, The relationship between hypogonadism and erectile dysfunction, *Int J Impot Res* 20, 231-235.
- Isenovic, E. R., Y. Meng, A. Divald, N. Milivojevic, and J. R. Sowers, 2002, Role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in angiotensin II and insulin-like growth factor-1 modulation of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells, *Endocrine* 19, 287-292.
- Jesmin, S., I. Sakuma, A. Salah-Eldin, K. Nonomura, Y. Hattori, and A. Kitabatake, 2003, Diminished penile expression of vascular endothelial growth factor and its receptors at the insulin-resistant stage of a type II diabetic rat model: a possible cause for erectile dysfunction in diabetes, *J Mol Endocrinol* 31, 401-418.
- Jin, L., and A. L. Burnett, 2006, RhoA/Rho-kinase in erectile tissue: mechanisms of disease and therapeutic insights, *Clin Sci (Lond)* 110, 153-165.
- Jin, L., and A. L. Burnett, 2008, NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction, *Asian J Androl* 10, 6-13.
- Jin, L., G. Lagoda, R. Leite, R. C. Webb, and A. L. Burnett, 2008, NADPH oxidase activation: a mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction, *J Sex Med* 5, 544-551.
- Jin, L., T. Liu, G. A. Lagoda, H. C. Champion, T. J. Bivalacqua, and A. L. Burnett, 2006, Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age-associated erectile dysfunction, *FASEB J* 20, 536-538.
- Jin, L., Z. Ying, and R. C. Webb, 2004, Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H1495-1500.
- Johansson, S., A. Iliadou, N. Bergvall, U. de Faire, M. S. Kramer, Y. Pawitan, N. L. Pedersen, M. Norman, P. Lichtenstein, and S. Cnattingius, 2008, The association between low birth weight and type 2 diabetes: contribution of genetic factors, *Epidemiology* 19, 659-665.
- Kaiser, D. R., K. Billups, C. Mason, R. Wetterling, J. L. Lundberg, and A. J. Bank, 2004, Impaired brachial artery endothelium-dependent and -independent vasodilation in men with erectile dysfunction and no other clinical cardiovascular disease, *J Am Coll Cardiol* 43, 179-184.
- Kim, Y. C., J. H. Kim, M. G. Davies, P. O. Hagen, and C. C. Carson, 3rd, 1995, Modulation of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-mediated relaxation by nitric oxide and prostanoids in the rabbit corpus cavernosum, *J Urol* 153, 807-810.

- Kloner, R. A., S. H. Mullin, T. Shook, R. Matthews, G. Mayeda, S. Burstein, H. Peled, C. Pollick, R. Choudhary, R. Rosen, and H. Padma-Nathan, 2003, Erectile dysfunction in the cardiac patient: how common and should we treat?, *J Urol* 170, S46-50; discussion S50.
- Kubin, M., G. Wagner, and A. R. Fugl-Meyer, 2003, Epidemiology of erectile dysfunction, *Int J Impot Res* 15, 63-71.
- Kwon, N. S., C. F. Nathan, C. Gilker, O. W. Griffith, D. E. Matthews, and D. J. Stuehr, 1990, L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen, *J Biol Chem* 265, 13442-13445.
- Kyosseva, S. V., 2004, Mitogen-activated protein kinase signaling, *Int Rev Neurobiol* 59, 201-220.
- Lackland, D. T., B. M. Egan, and P. L. Ferguson, 2003, Low birth weight as a risk factor for hypertension, *J Clin Hypertens (Greenwich)* 5, 133-136.
- Lau, D. H., C. S. Thompson, F. H. Mumtaz, R. J. Morgan, and D. P. Mikhailidis, 2007, Serotonin induces a biphasic response in rabbit cavernosal smooth muscle: relevance to the erectile process, *Urol Int* 79, 255-261.
- Lenfant, C., 2008, Low birth weight and blood pressure, *Metabolism* 57 Suppl 2, S32-35.
- Lewis, R. W., K. S. Fugl-Meyer, R. Bosch, A. R. Fugl-Meyer, E. O. Laumann, E. Lizza, and A. Martin-Morales, 2004, Epidemiology/risk factors of sexual dysfunction, *J Sex Med* 1, 35-39.
- Li, P., T. Koike, B. Qin, M. Kubota, Y. Kawata, Y. J. Jia, and Y. Oshida, 2008, A high-fructose diet impairs Akt and PKCzeta phosphorylation and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle, *Horm Metab Res* 40, 528-532.
- Liew, G., J. J. Wang, B. B. Duncan, R. Klein, A. R. Sharrett, F. Brancati, H. C. Yeh, P. Mitchell, and T. Y. Wong, 2008, Low birthweight is associated with narrower arterioles in adults, *Hypertension* 51, 933-938.
- Lin, C. S., G. Lin, and T. F. Lue, 2005, Cyclic nucleotide signaling in cavernous smooth muscle, *J Sex Med* 2, 478-491.
- Lin, C. S., Z. C. Xin, Z. Wang, G. Lin, and T. F. Lue, 2008, Molecular Yin and Yang of erectile function and dysfunction, *Asian J Androl* 10, 433-440.
- Lyngdorf, P., and L. Hemmingsen, 2004, Epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors: a practice-based study in Denmark, *Int J Impot Res* 16, 105-111.
- Maggi, M., S. Filippi, F. Ledda, A. Magini, and G. Forti, 2000, Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy, *Eur J Endocrinol* 143, 143-154.

- Mehta, N., S. Sikka, and M. Rajasekaran, 2008, Rat as an animal model for male erectile function evaluation in sexual medicine research, *J Sex Med* 5, 1278-1283.
- Melman, A., N. Bar-Chama, A. McCullough, K. Davies, and G. Christ, 2006, hMaxi-K gene transfer in males with erectile dysfunction: results of the first human trial, *Hum Gene Ther* 17, 1165-1176.
- Melman, A., and J. C. Gingell, 1999, The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction, *J Urol* 161, 5-11.
- Michel, J. B., 2004, [Tissue consequence of renin-angiotensin system activation], *Bull Acad Natl Med* 188, 611-619; discussion 620.
- Mills, T. M., R. W. Lewis, C. J. Wingard, A. E. Linder, L. Jin, and R. C. Webb, 2003, Vasoconstriction, RhoA/Rho-kinase and the erectile response, *Int J Impot Res* 15 Suppl 5, S20-24.
- Moore, C. R., and R. Wang, 2006, Pathophysiology and treatment of diabetic erectile dysfunction, *Asian J Androl* 8, 675-684.
- Moreira, E. D., Jr., C. F. Lbo, A. Diament, A. Nicolosi, and D. B. Glasser, 2003, Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil, *Urology* 61, 431-436.
- Moreland, R. B., 1998, Is there a role of hypoxemia in penile fibrosis: a viewpoint presented to the Society for the Study of Impotence, *Int J Impot Res* 10, 113-120.
- Morrison, J. F., R. Sheen, S. Dhanasekaran, and E. P. Mensah-Brown, 2007, Long-term changes in sympathetic innervation in the corpus cavernosum of the STZ-diabetic rat, *Int J Impot Res* 19, 509-516.
- Mulhall, J. P., S. Bukofzer, A. L. Edmonds, and M. George, 2001, An open-label, uncontrolled dose-optimization study of sublingual apomorphine in erectile dysfunction, *Clin Ther* 23, 1260-1271.
- Musicki, B., and A. L. Burnett, 2006, eNOS function and dysfunction in the penis, *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 154-165.
- Musicki, B., and A. L. Burnett, 2007, Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction, *Int J Impot Res* 19, 129-138.
- Nangle, M. R., M. A. Cotter, and N. E. Cameron, 2006, Correction of nitrenergic neurovascular dysfunction in diabetic mouse corpus cavernosum by p38 mitogen-activated protein kinase inhibition, *Int J Impot Res* 18, 258-263.
- NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence, 1993, *JAMA* 270, 83-90.

- Ottesen, B., G. Wagner, R. Virag, and J. Fahrenkrug, 1984, Penile erection: possible role for vasoactive intestinal polypeptide as a neurotransmitter, *Br Med J (Clin Res Ed)* 288, 9-11.
- Pagliassotti, M. J., E. C. Gayles, D. A. Podolin, Y. Wei, and C. L. Morin, 2000, Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R66-73.
- Park, J. K., S. Z. Kim, S. H. Kim, Y. K. Park, and K. W. Cho, 1997, Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: functional characterization of angiotensin II receptors, *J Urol* 158, 653-658.
- Park, K., S. W. Kim, K. S. Rhu, and J. S. Paick, 2006, Chronic administration of an oral Rho kinase inhibitor prevents the development of vasculogenic erectile dysfunction in a rat model, *J Sex Med* 3, 996-1003.
- Park, K., J. W. Shin, J. K. Oh, K. S. Ryu, S. W. Kim, and J. S. Paick, 2005, Restoration of erectile capacity in normotensive aged rats by modulation of angiotensin receptor type 1, *J Androl* 26, 123-128.
- Persson, E., and T. Jansson, 1992, Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig, *Acta Physiol Scand* 145, 195-196.
- Pfab, T., T. Slowinski, M. Godes, H. Halle, F. Priem, and B. Hoher, 2006, Low birth weight, a risk factor for cardiovascular diseases in later life, is already associated with elevated fetal glycosylated hemoglobin at birth, *Circulation* 114, 1687-1692.
- Ponholzer, A., C. Temml, K. Mock, M. Marszalek, R. Obermayr, and S. Madersbacher, 2005, Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in 2869 men using a validated questionnaire, *Eur Urol* 47, 80-85; discussion 85-86.
- Price, S. A., S. Agthong, A. B. Middlemas, and D. R. Tomlinson, 2004, Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy: interactions with aldose reductase, *Diabetes* 53, 1851-1856.
- Prieto, D., 2008, Physiological regulation of penile arteries and veins, *Int J Impot Res* 20, 17-29.
- Pu, X. Y., L. Q. Hu, H. P. Wang, Y. X. Luo, and X. H. Wang, 2007, Improvement in erectile dysfunction after insulin-like growth factor-1 gene therapy in diabetic rats, *Asian J Androl* 9, 83-91.
- Rajasekaran, M., A. Kasyan, W. Allilain, and M. Monga, 2003, Ex vivo expression of angiogenic growth factors and their receptors in human penile cavernosal cells, *J Androl* 24, 85-90.
- Rajasekaran, M., S. White, A. Baquir, and N. Wilkes, 2005, Rho-kinase inhibition improves erectile function in aging male Brown-Norway rats, *J Androl* 26, 182-188.

- Ranke, M. B., 2005, Insulin-like growth factor-I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance, *Trends Endocrinol Metab* 16, 190-197.
- RG, I. J., C. D. Stehouwer, E. J. de Geus, M. M. van Weissenbruch, H. A. Delemarre-van de Waal, and D. I. Boomsma, 2003, Low birth weight is associated with increased sympathetic activity: dependence on genetic factors, *Circulation* 108, 566-571.
- Rhoden, E. L., E. P. Ribeiro, C. E. Riedner, C. Teloken, and C. A. Souto, 2005, Glycosylated haemoglobin levels and the severity of erectile function in diabetic men, *BJU Int* 95, 615-617.
- Rondo, P. H., J. O. Lemos, J. A. Pereira, J. M. Oliveira, and L. R. Innocente, 2008, Relationship between birthweight and arterial elasticity in childhood, *Clin Sci (Lond)* 115, 317-326.
- Roy-Clavel, E., S. Picard, J. St-Louis, and M. Brochu, 1999, Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats, *Am J Obstet Gynecol* 180, 608-613.
- Saenz de Tejada, I., 2000, Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility, *Int J Impot Res* 12 Suppl 4, S34-38.
- Saenz de Tejada, I., M. P. Carson, A. de las Morenas, I. Goldstein, and A. M. Traish, 1991, Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum, *Am J Physiol* 261, H1078-1085.
- Saigal, C. S., H. Wessells, J. Pace, M. Schonlau, and T. J. Wilt, 2006, Predictors and prevalence of erectile dysfunction in a racially diverse population, *Arch Intern Med* 166, 207-212.
- Sazova, O., A. Kadioglu, L. Gurkan, Z. Kayaarasi, S. Bross, M. Manning, and K. P. Junemann, 2002, Intracavernous administration of SIN-1+VIP in an in vivo rabbit model for erectile function, *Int J Impot Res* 14, 44-49.
- Schiffrin, E. L., and R. M. Touyz, 2003, Inflammation and vascular hypertrophy induced by angiotensin II: role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species independently of blood pressure elevation?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 707-709.
- Selvin, E., A. L. Burnett, and E. A. Platz, 2007, Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US, *Am J Med* 120, 151-157.
- Shen, Z. J., H. Wang, Y. L. Lu, X. L. Zhou, S. W. Chen, and Z. D. Chen, 2005, Gene transfer of vasoactive intestinal polypeptide into the penis improves erectile response in the diabetic rat, *BJU Int* 95, 890-894.
- Siroky, M. B., and K. M. Azadzo, 2003, Vasculogenic erectile dysfunction: newer therapeutic strategies, *J Urol* 170, S24-29; discussion S29-30.
- Solomon, H., J. W. Man, and G. Jackson, 2003, Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator, *Heart* 89, 251-253.

- Somlyo, A. P., and A. V. Somlyo, 2000, Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II, *J Physiol* 522 Pt 2, 177-185.
- Sommer, F., T. Klotz, D. Steinritz, A. Schmidt, K. Addicks, U. Engelmann, and W. Bloch, 2002, MAP kinase 1/2 (Erk 1/2) and serine/threonine specific protein kinase Akt/PKB expression and activity in the human corpus cavernosum, *Int J Impot Res* 14, 217-225.
- Sommer, F., and W. Schulze, 2005, Treating erectile dysfunction by endothelial rehabilitation with phosphodiesterase 5 inhibitors, *World J Urol* 23, 385-392.
- Stark, A. H., B. Timar, and Z. Madar, 2000, Adaptation of Sprague Dawley rats to long-term feeding of high fat or high fructose diets, *Eur J Nutr* 39, 229-234.
- Steers, W. D., J. McConnell, and G. S. Benson, 1984, Anatomical localization and some pharmacological effects of vasoactive intestinal polypeptide in human and monkey corpus cavernosum, *J Urol* 132, 1048-1053.
- Stief, C. G., 2003, Central mechanisms of erectile dysfunction: what a clinician may want to know, *Int J Impot Res* 15 Suppl 2, S3-6.
- Tai, C., A. M. Booth, W. C. de Groat, and J. R. Roppolo, 1998, Penile erection produced by microstimulation of the sacral spinal cord of the cat, *IEEE Trans Rehabil Eng* 6, 374-381.
- Tefekli, A., E. Kandirali, B. Erol, M. Tunc, and A. Kadioglu, 2006, Peyronie's disease: a silent consequence of diabetes mellitus, *Asian J Androl* 8, 75-79.
- Tian, J. Y., Q. Cheng, X. M. Song, G. Li, G. X. Jiang, Y. Y. Gu, and M. Luo, 2006, Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults, *Eur J Endocrinol* 155, 601-607.
- Toblli, J. E., I. Stella, F. Inserra, L. Ferder, F. Zeller, and O. N. Mazza, 2000, Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats, *Am J Hypertens* 13, 686-692.
- Trussell, J. C., and R. S. Legro, 2007, Erectile dysfunction: does insulin resistance play a part?, *Fertil Steril* 88, 771-778.
- Ushiyama, M., T. Morita, T. Kuramochi, S. Yagi, and S. Katayama, 2004, Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide, *Hypertens Res* 27, 253-261.
- Usta, M. F., M. Kendirci, S. Gur, N. A. Foxwell, T. J. Bivalacqua, S. Celtek, and W. J. Hellstrom, 2006, The breakdown of preformed advanced glycation end products reverses erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: preventive versus curative treatment, *J Sex Med* 3, 242-250; discussion 250-242.

- Valjent, E., J. Caboche, and P. Vanhoutte, 2001, Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory?, *Mol Neurobiol* 23, 83-99.
- Verratti, V., C. Di Giulio, F. Berardinelli, M. Pellicciotta, S. Di Francesco, R. Iantorno, M. Nicolai, S. Gidaro, and R. Tenaglia, 2007, The role of hypoxia in erectile dysfunction mechanisms, *Int J Impot Res* 19, 496-500.
- Wei, J. N., H. Y. Li, F. C. Sung, C. C. Lin, C. C. Chiang, C. Y. Li, and L. M. Chuang, 2007, Birth weight correlates differently with cardiovascular risk factors in youth, *Obesity (Silver Spring)* 15, 1609-1616.
- Wheatcroft, S. B., I. L. Williams, A. M. Shah, and M. T. Kearney, 2003, Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function, *Diabet Med* 20, 255-268.
- Wilkins, M. R., J. Wharton, F. Grimminger, and H. A. Ghofrani, 2008, Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension, *Eur Respir J* 32, 198-209.
- Woodall, S. M., B. M. Johnston, B. H. Breier, and P. D. Gluckman, 1996, Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring, *Pediatr Res* 40, 438-443.
- Yamanaka, M., M. Shirai, H. Shiina, Y. Tanaka, H. Enokida, A. Tsujimura, K. Matsumiya, A. Okuyama, and R. Dahiya, 2005, Vascular endothelial growth factor restores erectile function through inhibition of apoptosis in diabetic rat penile crura, *J Urol* 173, 318-323.