

REVUE DE LA LITTERATURE INTERNATIONALE

Avec la collaboration de :

M. BENCHAIËB

J.C. CZYBA

S. DROUFY

F. GIULIANO

J.F. GUERIN

H. LEJEUNE

K. OSTROWSKI

GENETIQUE

- 109 **Le gène Dazla de la souris code pour une protéine cytoplasmique indispensable à la gamétogénèse.**
RUGGIU M., SPEED R., TAGGART M. et al
Nature, 1997, 389, 6646, 73-77

AMP

- 111 **Anomalies à la naissance chez des enfants conçus par injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes : une autre interprétation.**
KURINCZUK J.J., BAWER C.
B.M.J, 315 : 1260-1266, 1997
- Une vraie chimère hermaphrodite résultant de la fusion d'embryons consécutifs à une fécondation in vitro.**
STRAIN L., DEAN J.C.S., HAMILTON M.P.R., BONTHROND.T.
The New England Journal of Medicine, 338 : 166-169, 1998.

SEXUALITE

- 114 **Clonage, chez le rat et l'homme, de la synthase du monoxyde d'azote inducible pénienne. Application à la thérapie génique des dysfonctions érectiles.**
GARBAN H., MARQUEZ D., MAGEE T. J. MOODY, T. RAJAVASHITH,
J.A. RODRIGUEZ A. HUNG, D. VERNET, J. RAJFER, and N.F. GONZALEZ-CADAVID
Biology of Reproduction 56, 954-963 1997
- 117 **Impuissance et incontinence après prostatectomie radicale avec préservation des nerfs caverneux.**
TALCOTT J.A., RIEKER P., PROPERT K. J. et al
Journal of the National Cancer Institute, vol. 89, N°15, August 6, 1997.
- 119 **Existe-t-il une relation entre le sexe et la mort ? Découverte à la suite de l'étude de la cohorte de Caerphilly.**
SMITH G.D., FRANKEL S., YARNELL J.
B.M.J., 315, 1641-44, 1997

Le gène *Dazla* de la souris code pour une protéine cytoplasmique indispensable à la gamétogénèse.

The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis

RUGGIU M., SPEED R., TAGGART M.,
MCKAY S.J., KILANOWSKI F, SAUNDERS
P., DORIN J., COOKE H.J.

*MRC Human Genetics Unit, Western General
Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XU,
Midlothian, SCOTLAND*

Nature, 1997, 389, 6646, 73-77

RBM et DAZ/SPGY sont deux familles de gènes localisés sur le chromosome Y. Ils codent pour des protéines comportant des motifs de liaison à l'ARN et semblent intervenir dans la spermatogénèse dans l'espèce humaine. Les gènes de la famille DAZ/SPGY sont localisés sur le chromosome Y chez les primates. Chez les autres mammifères, ils sont représentés par un gène autosomique *Dazla*, ce gène persistant aussi chez les primates. Il a en outre été montré qu'un gène homologue à *Dazla* est indispensable à la spermatogénèse chez la drosophile.

Cet article décrit la localisation de la protéine *Dazla* dans les gonades de souris et étudie l'effet de l'inactivation du gène *Dazla* par recombinaison homologue.

Un anticorps polyclonal contre la protéine *Dazla* réagit avec les spermatogonies-B, spermatocytes préleptotènes, zygotènes et pachytènes (stades I à VIII), ce qui est en accord avec la localisation des ARNm par hybridation in situ. La localisation de la protéine apparaît cytoplasmique, contrairement à la localisation nucléaire de la protéine RBM.

Dans l'ovaire, aux stades embryonnaires et pré-pubertaires, la protéine *Dazla* est présente dans l'ovocyte et les cellules folliculaires ; dans l'ovaire adulte la protéine se trouve localisée dans l'ovocyte en cours de maturation avec une localisation périphérique et/ou dans la zone pellucide.

L'inactivation du gène *Dazla* par recombinaison homologue dans les cellules ES, permet

d'obtenir des animaux hétérozygotes *Dazla* +/- qui se révèlent fertiles, et homozygotes *Dazla* -/-, qui sont, par contre, stériles. Les femelles *Dazla* -/- ont des ovaires de petite taille ne contenant pas d'ovocytes ni de follicules, les mâles *Dazla* -/- ont des testicules de taille diminuée de 3 fois avec absence de cellules germinales au delà du stade de spermatogonie. Les souris mâles hétérozygotes ont un volume testiculaire intermédiaire, un contenu épидидymaire en spermatozoïdes inférieur aux souris normales et un pourcentage élevé (61 % vs 17%) de spermatozoïdes à morphologie anormale.

Au cours du développement, on voit apparaître une réduction des ovocytes dans les ovaires des souris *Dazla* -/- et une réduction du nombre de cellules germinales dans les testicules des souris *Dazla* +/- et -/- entre 15 et 19 jours post coitum.

Ces résultats montrent que la gène *Dazla* est indispensable au développement et à la survie des cellules germinales à la fois dans l'ovaire et dans les testicules. La réduction en nombre et les anomalies morphologiques des spermatozoïdes chez les hétérozygotes *Dazla* +/- suggèrent que la quantité de protéine *Dazla* est importante pour une spermatogénèse normale. La localisation cytoplasmique de la protéine *Dazla* suggère qu'il ne s'agit pas d'un facteur de transcription, comme la protéine RBM à localisation nucléaire, mais plutôt d'une protéine impliquée dans le trafic et le stockage des ARN dans la cellule.

Commentaire. (H. LEJEUNE)

Le gène DAZ a été découvert, comme un cadre ouvert de lecture, dans la zone la plus fréquemment délétée, sur le bras long du chromosome Y, d'hommes présentant un trouble de la spermatogénèse idiopathique. Il a été montré ensuite qu'il existe un gène homologue autosomique, appelé Dazla (DAZ-like autosomal), dans toutes les espèces (de la drosophile à l'homme), mais seuls les primates ont, en plus de Dazla, le gène DAZ porté par le chromosome Y.

Comme la méthode d'inactivation génique par recombinaison homologue dans les cellules ES ne peut actuellement être mise en œuvre que

chez la souris, seule l'inactivation de Dazla peut être étudiée. Celle de DAZ nécessiterait que l'on sache réaliser des recombinaisons homologues chez les primates.

En ce qui concerne Dazla, chez la souris, le travail présenté ici montre clairement que ce gène est indispensable à la gamétogénèse, dans les deux sexes. Son inactivation homozygote est responsable de stérilité par disparition des cellules germinales. L'effet de l'inactivation génique survient pendant le développement des cellules germinales lors de la vie fœtale. Un rôle dans la gamétogénèse à l'âge adulte est suggéré par la persistance de la protéine et sa localisation spécifique dans les cellules germinales adultes, toutefois, la méthode d'inactivation génique dans les cellules ES n'est pas adaptée pour étudier le rôle de la protéine à l'âge adulte. Les souris hétérozygotes Dazla +/- possèdent, contrairement aux souris homozygotes Dazla-/-, des cellules germinales, elles sont fertiles, mais chez le mâle, on observe une réduction du nombre et une altération de la morphologie des spermatozoïdes. Ceci suggère la nécessité d'une quantité suffisante de protéine Dazla dans les cellules préméiotiques pour une spermatogénèse et une spermiogénèse normales chez la souris adulte.

L'extrapolation de ces résultats à l'espèce humaine est, pour le moins, délicate. Certes, les souris homozygotes Dazla -/- adultes présentent une absence complète de cellules germinales, comme une partie des hommes présentant une microdélétion du chromosome Y emportant DAZ. Certains patients présentant une microdélétion de DAZ ont une altération partielle de la spermatogénèse. On peut se demander si le gène autosomique humain, homologue au gène Dazla de la souris, peut compenser partiellement, chez certains patients, l'absence du gène DAZ.

Par ailleurs, on est tenté de faire une relation entre la tératospermie physiologique plus forte chez l'homme que dans les espèces animales, et le fait que, dans l'espèce humaine, une seule copie du gène DAZ (du chromosome Y) est présente, comme chez les souris hétérozygotes Dazla +/-, qui présentent justement une tératospermie plus importante.

Ces réflexions concernant les variations phéno-

typiques dans les microdélétions de DAZ et la tératospermie physiologique chez l'homme sous-entendent que le gène autosomique humain a perdu beaucoup de sa potentialité par rapport à ce qui se passe dans les espèces n'ayant pas de gènes DAZ gonosomiques. Ceci peut bien se concevoir, la pression de sélection ne s'exerçant plus sur Dazla, dès lors qu'il existe un homologue gonosomique. DAZ a pu conférer un avantage de sélection par rapport à Dazla qui, n'étant plus indispensable à la reproduction de l'espèce, peut être altéré par des mutations faisant perdre plus ou moins complètement sa fonction à la protéine Dazla.

On entrevoit, à propos des gènes de la famille DAZ, l'importance des travaux complémentaires qui sont nécessaires pour comprendre le rôle respectif de chacun des gènes impliqués dans la spermatogénèse.

•••

Anomalies à la naissance chez des enfants conçus par injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes : une autre interprétation.

Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection an alternative interpretation

J.J. KURINCZUK, C.BAWER

British Medical journal of Medicine, 315 :
1260-1266, 1997

Introduction

L'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) offre pour la première fois à des hommes souffrant d'oligospermie sévère, voire d'azoospermie, la possibilité d'avoir des enfants issus de leurs propres gamètes. L'équipe bruxelloise qui a développé la technique a recensé jusqu'à maintenant les anomalies à la naissance (AAN) chez 420 enfants nés après ICSI. Les AAN ont été considérées comme majeures si elle entraînaient des altérations fonctionnelles ou nécessitaient une correction chirurgicale ; toutes les autres

étaient considérées comme mineures. A partir de cette classification, ils ont observé un taux de 3,3% d'anomalies majeures et estimé que ce taux se situait dans l'intervalle de normalité.

Le problème est que l'équipe belge a choisi comme références des données disparates provenant de pays où les définitions du concept d' "anomalie majeure " sont différentes, étant en général plus larges. Il y a donc un risque que les auteurs belges aient sous-estimé la prévalence des anomalies majeures des enfants nés après ICSI ; cette hypothèse a été testée dans le présent article.

Méthodes

Les données de l'équipe belge ont été reclassées selon les méthodes utilisées par le Registre des anomalies à la naissance de l'Australie occidentale. Lorsqu'un doute existait sur les AAN, on a choisi la classification la moins sévère. Ces données " reclassées " ont été comparées à celles du registre australien des AAN correspondant aux années 91-94 incluses.

Résultats

Selon la classification belge, 14/420 enfants étaient porteurs d'une AAN majeure (3,3%). Ce chiffre s'élève à 31/420, selon la classification australienne, soit un taux de 7,4%. Cette valeur peut être comparée à la prévalence des AAN majeures du registre australien qui est de 3,8%. L'odds ratio (O.D.) pour cette comparaison était de 2,03, indiquant que les enfants nés après ICSI avaient 2 fois plus de risques d'avoir une AAN majeure. Pour ce qui concerne les anomalies mineures, la prévalence du groupe belge recalculée selon les critères australiens était de 0,71%, versus 0,48% (registre de référence), la différence n'étant pas significative.

L'étude détaillée des anomalies a montré une prévalence significativement plus élevée des anomalies cardio-vasculaires (O.D. : 512 ; $p < 0,0001$). L'O.D. était également supérieur à 1 pour les anomalies génito-urinaires et gastro-intestinales (respectivement 1,33 et 1,84), mais de manière non significative.

Discussion et conclusion

Cette nouvelle classification des AAN majeures est plus appropriée et a conduit à un doublement du taux de ces anomalies, même s'il est possible que les AAN du registre australien aient été codifiées avec moins de vigilance, et donc plus de " perdus de vue ", que dans le groupe d'enfants étudié par l'équipe belge. D'autre part, la proportion d'enfants issus de grossesses multiples est nettement plus élevée dans le groupe belge, mais cela ne suffit pas à expliquer cette élévation des AAN majeures. Deux facteurs peuvent être en cause : l'infertilité paternelle et la procédure d'ICSI par elle-même.

Ces résultats doivent encourager les équipes à continuer d'effectuer une surveillance et un suivi rigoureux des enfants nés après ICSI, ainsi qu'à obtenir des couples un consentement éclairé avant chaque tentative.

Commentaires (J.F.GUERIN)

Le raisonnement et la rigueur méthodologique des auteurs de cet article ne souffrent pas de critiques. Il faut admettre que dans ce groupe de 420 enfants nés après ICSI, la prévalence des anomalies majeures était 2 fois plus élevée que dans la population générale.

Gardons nous toutefois d'être alarmistes : l'équipe bruxelloises vient de présenter des données portant sur un nombre nettement plus important d'enfants, puisqu'il atteint presque les 2000. Le taux d'AAN majeures est en régression, égal à 2,3%. Bien entendu, les mêmes remarques concernant cette valeur peuvent être formulées, réestimées selon les normes australiennes, elle serait certainement plus élevée. Mais il faut noter qu'une étude française en voie d'achèvement effectuée sous l'égide des BLEFCO, n'a pas relevé d'élévation du taux d'AAN par rapport au registre français des naissances.

Un faisceau d'arguments théoriques et d'observations permet d'éliminer avec une quasi certitude un effet tératogène de la procédure d'ICSI par elle-même. En revanche, le problème de l'indication de l'ICSI, c'est-à-dire le trouble de la spermatogenèse, apparaît au 1er plan. Il est

nécessaire d'aller plus loin que la simple observation des anomalies " toutes indications confondues " : il faut impérativement distinguer les étiologies précises et surtout l'origine des gamètes, en particulier les spermatozoïdes ponctionnés dans le testicule dans les cas d'azoospermie non obstructive. Lors d'un symposium récent (ARES SERONO, 29-30 Janvier 98, Paris), une équipe française a fait état d'un taux très alarmant d'anomalies pour cette indication (sur 15 enfants nés) ; toutefois l'équipe bruxelloise, avec plus de 100 enfants nés, n'a rien observé de particulier chez ces enfants (1,7% d'anomalies majeures, versus 2,3% dans leur groupe de 1975 enfants). Il ne faut donc pas tomber dans " l'alarmisme " inconsidéré, mais s'astreindre à un suivi le plus rigoureux possible des enfants nés après ICSI, en distinguant les différentes origines de la stérilité. En tout état de cause, nul ne devrait tenter des ICSI avec des gamètes immatures, tant que la preuve de l'innocuité de l'utilisation des spermatozoïdes testiculaires n'a pas été clairement démontrée

•••

Une vraie chimère hermaphrodite résultant de la fusion d'embryons consécutifs à une fécondation in vitro.

A true hermaphrodite chimera resulting from embryo amalgamation after in vitro fertilization.

L. STRAIN, J. C.S. DEAN,
M. P.R. HAMILTON, D. T. BONTHRON.

The New England Journal of Medicine,
Vol. 338, 166-169, 15 Janvier 1998.

INTRODUCTION

Le haut taux de réussite de grossesse après fécondation *in vitro* (FIV) dépend du fait de placer plus d'un embryon chez la mère ; une pratique conduisant à une augmentation de 30 à 35 fois du risque d'obtention de jumeaux dizygotes. L'augmentation de fréquence d'anomalies associées aux jumeaux doit aussi être attendue. Le chimérisme, présence de cellules

provenant de deux ou plusieurs zygotes chez une même personne, est une de ces rares anomalies. Elle est habituellement confortée à travers les anomalies de groupes sanguins ou (pour les chimères XX/XY) de réversion sexuelle ou d'état intersexué. Nous avons utilisé le polymorphisme de l'ADN afin d'étudier un hermaphrodite 46,XX/ 46,XY conçu par FIV. Nous avons trouvé que non seulement l'enfant est une chimère, mais aussi qu'il a dû être obtenu par la fusion de deux embryons, chacun dérivant d'un ovocyte fécondé séparément et indépendamment.

CAS RAPPORTE

La mère est une femme de 31 ans avec une infertilité primaire. Les investigations hormonales et laparoscopiques montrent une ovulation et un pelvis normal. Son partenaire, âgé de 41 ans, a eu un enfant avec une autre partenaire mais a une oligozoospermie sévère. La femme a reçu de la 'busereline' et de la gonadotrophine humaine, 18 ovocytes ont été obtenus, et 15 ont été fécondés avec le sperme d'un donneur anonyme et maintenu dans des puits séparés. Deux jours après l'insémination (stade quatre cellules), trois embryons ont été transférés. L'échographie au 36^{ème} jour après le transfert a montré un unique fœtus dans un sac. Un enfant de 3,46 kg est né à terme par voie basse, il avait un testicule droit normal et un testicule gauche non en place, avec par ailleurs des organes génitaux mâles normaux. A l'âge de 6 mois, le testicule gauche était palpable au niveau de l'anneau inguinal. Une exploration chirurgicale à l'âge de 15 mois a montré un sac herniaire contenant une gonade anormale avec des déférents. Ces structures ont été disséquées, l'examen histologique a montré que c'était un ovaire avec un tube de Fallope rattaché à un utérus unicorne. Le caryotype des lymphocytes du sang périphérique a alors révélé deux lignées cellulaires : une 46,XX et l'autre 46,XY. A l'âge de 20 mois les concentrations de FSH et de LH de l'enfant étaient normales pour son âge, que ce soit à l'état basal ou en réponse à la GRH. La concentration basale de testostérone était normale et atteignait 180 mg/dcl, trois jours après une unique injection intramusculaire de 2000 UI de hCG. L'échographie à 3 ans et 8

mois a montré un testicule apparemment normal dans le scrotum, des reins, une vessie et des structures pelviennes normales. Une laparoscopie à l'âge de 4 ans et 4 mois, a montré que le déférent et les vaisseaux testiculaires apparaissaient normaux, aucune structure génitale féminine n'a été vue. Des biopsies de peau ont été réalisées. Dans les suites, l'enfant a grandi et s'est développé normalement, avec une taille située dans le 90^{ème} percentile et un poids dans le 75^{ème} percentile. Il n'a aucune anomalie neurologique et suit un cursus scolaire normal.

RESULTAT

L'étude de l'ADN a prouvé l'implication de deux spermatozoïdes mais a laissé ouvert la possibilité de plusieurs causes embryologiques: fécondation de l'ovocyte mature et de son premier globule polaire (GP), fécondation de l'ovocyte et du second globule polaire, ou une chimère complète, correspondant à la fusion d'embryons indépendants ovulés et fécondés séparément. La discrimination parmi ces mécanismes est importante, car seule la troisième possibilité peut résulter du transfert de multiples embryons après FIV.

En pensant que chaque marqueur a une faible chance d'erreur due à la recombinaison avec son centromère, les résultats pour au moins trois chromosomes sont incompatibles avec une fécondation du premier ou du deuxième globule polaire. Ils suggèrent fortement une ségrégation indépendante des centromères lors de deux méioses séparées (le troisième mécanisme). Nous concluons que deux embryons, fécondés *in vitro* indépendamment, ont fusionné, probablement après le transfert chez la mère, parce que l'œuf ou l'embryon n'a pas été mis en coculture pendant la fertilisation.

DISCUSSION

C'est une pratique courante de placer plus d'un embryon, après une FIV, préférentiellement deux, car il existe un haut taux d'obtention de triplés, si on transfère trois embryons ou plus. Le pourcentage d'obtention de grossesses gémeillaires dans la plupart des programmes de FIV est entre 20 et 25%. Les com-

plications péri ou post natales de ces grossesses gémeillaires sont généralement du même ordre que celles des grossesses multiples et ne sont pas spécifiques de la FIV, bien que la différence de poids entre les jumeaux semblent être plus importante que dans les grossesses naturelles. L'augmentation de la fréquence par un facteur 33, de jumeaux dizygotes après FIV, implique une augmentation similaire du risque de rares anomalies associées aux jumeaux telles les chimères. L'incidence naturelle des chimères est inconnue. Le phénotype des chimères XX/XY va de l'homme normalement fertile jusqu'à l'homme avec un hypospadias ou une ambiguïté génitale et un hermaphrodisme, et de la femme hermaphrodite fertile à la femme fertile phénotypiquement normale. La littérature éparsée est indubitablement biaisée à travers les cas avec des ambiguïtés sexuelles ou autres problèmes gonadiques, et beaucoup de chimères XX/XY non notifiées. Les chimères de même sexe doivent être pratiquement invariablement normales phénotypiquement.

L'observation de chimère après FIV doit cependant être prise en compte sérieusement. Non seulement, la grande rareté des chimères XX/XY suggère une relation de cause à effet avec la FIV, mais son incidence pourrait être plus importante que celle suspectée.

Commentaires (M. BENCHAIIB)

Ce cas de chimère obtenue suite à une FIV et transfert de multiples embryons soulève deux grandes questions.

Premièrement du point de vue scientifique, nous avons ici un modèle vivant obtenu dans des 'conditions expérimentales strictes' de l'obtention d'une chimère à partir de deux embryons. En effet la possibilité d'avoir des sondes permettant de déterminer d'où provient le génome maternel de l'enfant (1^{er} GP, 2^{ème} GP ou autre ovocyte mature) permet de confirmer la réalité de la chimère. Celle-ci est la résultante de la fusion de deux embryons. Les autres cas de chimères signalés dans la littérature sont des cas retrouvés lors de pathologies ou d'anomalies sanguines pour les plus récents. Ou alors à partir d'ancien mémoire

évoquant un individu mi-homme mi-femme ayant donné naissance à un enfant [1]. Cependant, ce cas a été étudié, car l'enfant présentait des anomalies sexuelles, il est évident que dans le cas d'une chimère XX/XX ou XY/XY cela serait passé totalement inaperçu cliniquement, dans le cas ou aucune différence de coloration de l'iris entre les deux yeux ne serait présente, et qu'aucun examen complémentaire n'aurait été demandé. Ainsi se pose le problème de l'estimation de l'incidence des chimères, dans la nature ou dans les suites d'un transfert multiple après FIV. Ce phénomène ne serait peut-être pas aussi rare qu'on pourrait le croire. Il est évident, comme le souligne Van Steirteghem, qu'un protocole permettant d'estimer le risque de chimérisme suite à une FIV serait difficile à mettre en œuvre [2].

Une expérience réalisable, afin de confirmer l'obtention de chimère à partir d'embryons à quatre cellules, pourrait être la suivante. Nous pourrions mettre dans un espace très réduit (par exemple, une micro-goutte) un nombre important, mais connus, d'embryons de souris provenant de la même femelle et du même mâle. Ensuite, les embryons seraient comptabilisés régulièrement jusqu'au stade de blastocyste. Ceux-ci seraient alors transférés chez la femelle, et les souriceaux obtenus seraient alors étudiés. Cette première expérience pourrait permettre de confirmer la possibilité que deux ou plusieurs embryons entourés de leur zone pellucide peuvent fusionner à un stade très précoce.

La seconde question est la position que doit prendre le médecin vis-à-vis de ce problème. Déjà l'ICSI (injection intra cytoplasmique de spermatozoïde) a fait surgir de nouvelles questions (transmissions de pathologie à l'origine de trouble de la spermatogenèse à l'enfant) [3]. Ce cas ne fait que rallonger la liste des risques auxquels l'embryon est exposé, et de ces risques, les couples faisant appel à la procréation médicalement assistée doivent être prévenus.

Une solution pour éviter que cela se produise est certes le transfert d'un seul embryon, mais dans ce cas la probabilité d'obtenir un fœtus chute radicalement, ou alors de réaliser une coculture et de transférer deux à trois embryons au stade blastocyste afin que la patiente conserve toutes ses chances de réussite

avec une diminution du risque de fusion embryonnaire. Cependant, le risque de grossesse multiple avec tous les inconvénients pour la parturiente et les fœtus subsistent.

REFERENCES

1. DE GROUCHY J. JUMEAUX, mosaïques, chimères et autres aléas de la fécondation humaine. MEDSI, Paris, 1980.
2. VAN STEIRTEGHEM A. Outcome of assisted reproductive technology. The New England Journal of Medicine, Vol. 338, 194-195, 15 Janvier 1998.
3. IN'T VELD PA, HALLEY DJJ, VAN HEMEL JO, NIERMEIJER MF, DOHLE G, WEBER RFA. Genetic counselling before intracytoplasmic sperm injection. The Lancet, 350 : 490, 1997.

...

Clonage, chez le rat et l'homme, de la synthèse du monoxyde d'azote inducible pénienne. Application à la thérapie génique des dysfonctions érectiles.

Cloning of Rat and Human Inducible Penile Nitric Oxide Synthase. Application for Gene Therapy of Erectile Dysfunction

H. GARBAN, D. MARQUEZ, T. MAGEE, J. MOODY, T. RAJAVASHITH, J.A. RODRIGUEZ A. HUNG, D. VERNET, J. RAJFER, AND N.F. GONZALEZ-CADAVID

Biology of Reproduction 56, 954-963 (1997)

INTRODUCTION

La physiopathologie des troubles de l'érection repose principalement sur l'altération de la relaxation des fibres musculaires lisses cavernueuses. Le monoxyde d'azote (NO) est vraisemblablement le premier médiateur de cette relaxation. Chez l'homme, il existe deux origines pour le NO du tissu érectile : i) les terminaisons nerveuses végétatives intracavernueuses ii) les cellules endothéliales bordant les espaces sinusoides et tapissant la lumière des artères à destinée pénienne. Ainsi la présence de deux isoformes de la NO synthase (NOS),

l'enzyme catalysant la synthèse de NO à partir de L-arginine, a-t-elle été mise en évidence dans le tissu érectile. Il s'agit de la NOS neuronale (nNOS) et de la NOS endothéliale (eNOS). Chez le rat âgé, diabétique, exposé à la fumée de cigarettes ou castré, une diminution de l'activité globale de la NOS a été retrouvée, elle est généralement associée à une altération de la fonction érectile.

La logique des expériences présentées repose sur l'hypothèse selon laquelle la stimulation de la production endogène intrapénienne de NOS devrait permettre une augmentation plus physiologique de la relaxation musculaire lisse intracaverneuse que l'injection intracaverneuse répétée de substances pharmacologiques proposée actuellement. Il existe deux moyens pour atteindre ce but : i) l'induction de la transcription de la NOS endogène ii) la thérapie génique utilisant un cDNA exogène codant pour la synthèse de NOS. Pour faire l'objet de ces manipulations, c'est la troisième isoforme de la NOS, à priori absente du pénis à l'état physiologique, la NOS inductible (iNOS) qui a été choisie.

Les buts de cette étude ont été i) d'induire pharmacologiquement la synthèse d'iNOS in vivo dans le corps caverneux de rat afin de corriger la dysfonction érectile liée à l'âge ii) dans cette circonstance physiopathologique d'augmenter la réponse érectile à l'aide de la thérapie génique utilisant le cDNA de l'iNOS pénienne. Clonage et séquençage des cDNA humains et de rat de l'iNOS ont été réalisés à partir de cellules péniennes et de tissus stimulés pour l'expression d'iNOS.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'induction de l'expression d'iNOS par des fibres musculaires caverneuses en culture a été réalisée à l'aide de lipopolysaccharides, d'interféron recombinant de rat. Des clones de cDNA d'iNOS de rat ont été séquencés. Ces clones ont été introduits dans des vecteurs viraux.

La synthèse d'iNOS a été également induite à partir de cellules caverneuses humaines en culture à l'aide de lipopolysaccharides, de TNF recombinant humain et d'interleukine recombinante humaine.

Des fragments de cDNA d'iNOS ont été amplifiés par RT-PCR, puis isolés et purifiés pour être clonés.

Des micropompes osmotiques ont été implantées chez des rats de 5 mois (adultes), 20 mois (âgés) et 30 mois (très âgés). Celles-ci délivraient pendant 3 ou 6 jours dans le corps caverneux des lipopolysaccharides, de l'interféron recombinant de rat, du TNF recombinant humain et de l'interleukine recombinante humaine afin d'induire localement la synthèse d'iNOS. Une stimulation électrique du nerf caverneux à différents paramètres était ensuite réalisée permettant l'appréciation de la fonction érectile par la mesure combinée de la pression intracaverneuse et de la pression artérielle.

Enfin l'effet sur la réponse érectile électroinduite de l'administration intra-artérielle de L-NAME (inhibiteur de la NOS) était testé.

Chez des rats adultes et âgés, une injection intracaverneuse de vecteurs viraux renfermant des clones de cDNA d'iNOS de rat a été réalisée. Durant la réalisation de cette injection, une constriction de la base du pénis était réalisée. La fonction érectile était étudiée à 4, 10 et 21 jours comme précédemment décrit.

La NOS pénienne a été appréciée

i) quantitativement par mesure biochimique de la conversion d'arginine en citrulline en présence et en absence de L-NAME

ii) qualitativement en immunohistochimie à l'aide d'une coloration utilisant la NADPH diaphorase rendant compte de la présence de NOS

iii) par immunodétection en mesurant l'iNOS par Western-blot.

RÉSULTATS

La délivrance intracaverneuse de l'association de substances inductrices de l'expression d'iNOS chez les rats âgés augmentait significativement la réponse érectile à la stimulation électrique du nerf caverneux (50%), celle-ci devenait supérieure à celle observée chez des rats adultes non traités. Chez des rats adultes, la réponse érectile était augmentée de 18% par le traitement. Chez les rats très âgés,

l'augmentation de la réponse érectile bien qu'existante n'était pas significative, sans doute du fait de la détérioration des propriétés mécaniques des fibres musculaires liés au vieillissement. Dans ces expériences, l'inhibition de 60 à 80% de la réponse érectile à la stimulation électrique par l'administration de L-NAME démontrait que cette réponse était NO-dépendante. La pression artérielle des animaux n'était pas modifiée par l'administration intracaverneuse de l'association de substances inductrices de l'expression d'iNOS. Le marquage tissulaire utilisant la NADPH diaphorase était accru chez les rats traités suggérant l'existence d'une stimulation de l'activité NOS. La quantification de l'activité de la NOS par mesure de la conversion d'arginine en citrulline en présence et en absence de L-NAME montrait une augmentation de celle-ci de 30% par rapport aux rats témoins, du fait du faible effectif du groupe examiné (n=3), une comparaison statistique n'a pas été effectuée. L'examen par Western blot à l'aide d'un anticorps spécifique de l'iNOS concluait à l'expression d'iNOS chez les rats traités, à l'inverse celle-ci était totalement absente chez les animaux témoins. Il est donc proposé que l'induction intracaverneuse d'iNOS par cette technique est responsable de l'augmentation de la réponse érectile chez les animaux traités.

Les cDNA clônés des iNOS humaines et de rat à partir des mRNA des cellules musculaires lisses humaines - de rat en culture possédaient quelques acides aminés de différence par rapport aux mêmes enzymes originaires d'autres tissus.

Après l'administration intracaverneuse du plasmide possédant le cDNA de l'iNOS de rat pendant dix jours, la réponse érectile des rats âgés était augmentée de 71% par rapport aux animaux témoins; l'augmentation de la réponse érectile était de 46% chez les animaux traités avec une préparation liposomale du vecteur plasmidique n'ayant pas intégré la séquence d'iNOS. La réponse érectile des rats traités par la préparation de plasmides possédant le cDNA de l'iNOS était inhibée à 60-80% par la L-NAME, cette réponse était donc médiée principalement par NO. L'amélioration de la réponse érectile chez les rats âgés ne

s'accompagnait pas d'une chute de la pression artérielle possible résultat de la diffusion systémique du vecteur. Aucune anomalie n'a été remarquée chez les animaux traités.

La présence d'iNOS exogène dans le pénis des rats traités pendant 10 jours a pu être démontrée par amplification à l'aide de PCR du DNA pénien extrait chez ces animaux en utilisant 2 méthodologies différentes. Les primers de l'iNOS de rat ainsi identifiés ont été comparés au gène de l'iNOS humaine, une grande homologie a été retrouvée.

DISCUSSION

Ainsi il a été possible expérimentalement d'améliorer la fonction érectile de rats âgés en accroissant les taux intrapénien de NOS. Deux techniques ont été utilisées : 1) induction sélective modérée de iNOS endogène 2) thérapie génique avec des fragments de cDNA codant pour la synthèse d'iNOS chez le rat. Cette dernière procédure apparaît plus séduisante. L'absence de priapisme ainsi que les résultats in vitro suggèrent que l'augmentation d'iNOS n'altérant pas les mécanismes physiologiques de la relaxation musculaire lisse caverneuse. La restauration de la fonction érectile apparaît plus durable dans ces expériences que l'effet proérectile temporaire de l'injection intracaverneuse de substances pharmacologiques relâchant le muscle lisse. Une inconnue concerne le type de cellules exprimant l'iNOS recombinante. Les fibres musculaires lisses sont les meilleures candidates. Il est apparu que la synthèse d'iNOS peut survenir en réponse à une stimulation du nerf caverneux, amplifiant en quelque sorte le message proérectile. La transcription de l'iNOS dans le tissu érectile ferait intervenir un mécanisme paracrine NOS dépendant. Théoriquement un cDNA d'une isoforme de NOS spécifique du tissu érectile serait l'instrument idéal pour des expériences utilisant la thérapie génique. Une nouvelle isoforme de nNOS qui semble posséder ces caractéristiques a été récemment décrite chez le rat.

Ainsi les progrès actuels de la vectorisation, des techniques de transfert associés à une meilleure connaissance de l'équipement enzymatique du tissu érectile laissent prévoir de considé-

rables progrès dans les bénéfices potentiels de la thérapie génique intrapénienne.

•••

Impuissance et incontinence après prostatectomie radicale avec préservation des nerfs caverneux

Patient-Reported Impotence and Incontinence after Nerve-Sparing Radical Prostatectomy

J. A. TALCOTT, P. RIEKER, K. J. PROPERT,
J. A. CLARK, K. I. WISHNOW,
K. R. LOUGHLIN, J. P. RICHIE,
P. W. KANTOFF

Journal of the National Cancer
Institute, vol. 89, N°15 1117-1123,
August 6, 1997.

Le cancer de la prostate est aujourd'hui la tumeur solide la plus fréquemment diagnostiquée chez l'homme adulte en dehors des cancers cutanés. Les modalités thérapeutiques utilisées pour le traitement des formes localisées ont évoluées puisque de 1984 à 1990 le nombre de prostatectomie radicale a été multiplié par six. La popularisation de cette technique chirurgicale est la conséquence de la publication, au milieu des années 80, de la technique dite " anatomique " permettant le contrôle carcinologique de la maladie au prix d'une mortalité et d'une morbidité acceptable. Cependant, les excellents résultats en terme de préservation des érections et de la continence urinaire publiés par les équipes dans lesquelles l'évaluation est réalisée par le chirurgien sont en contradiction avec ceux des études réalisées sur des populations non sélectionnées évaluées par auto-questionnaires. Les auteurs rapportent les résultats d'une étude prospective sur les conséquences en terme de troubles de l'érection et de continence évalués par les patients ayant subi une prostatectomie radicale.

PATIENTS ET MÉTHODES

De 1990 à 1994, 106 patients traités pour un

cancer prostatique localisé ont été évalués de façon prospective grâce à des questionnaires symptomatiques et de qualité de vie validés.

L'évaluation était réalisée avant l'intervention puis 3 mois et 12 mois après. Les prostatectomies radicales ont été réalisées par 35 chirurgiens différents et dans plus des trois quarts des cas dans des services hospitaliers universitaires impliqués dans la formation des internes.

RÉSULTATS

La préservation des nerfs caverneux n'a pas été réalisée chez 32% des patients, 40% ont eut une préservation unilatérale et 28% une préservation bilatérale. Les patients ayant bénéficié d'une préservation bilatérale étaient significativement plus jeunes et atteints d'une forme moins agressive de cancer.

Les informations concernant la sexualité n'ont été recueillies que chez 49 patients. Parmi les patients chez qui les nerfs caverneux ont été sacrifiés tous avaient des troubles de l'érection avant l'intervention. En revanche, seul 27% des patients ayant bénéficié d'une préservation des nerfs caverneux avaient des troubles de l'érection avant l'intervention. Au total, plus de deux tiers des patients sont totalement impuissants 12 mois après l'intervention. La préservation des nerfs caverneux n'apparaît pas comme facteur prédictif de la préservation des érections, en revanche le statut sexuel préopératoire semble déterminant dans la récupération d'érections après l'intervention.

Parmi les patients ayant des érections normales avant l'intervention et ayant bénéficié d'une préservation bilatérale des nerfs caverneux 58% ont des érections et 21% des érections permettant la pénétration.

Les deux indicateurs de troubles de la continence (pertes d'urines importantes et port de protections) sont plus fréquemment rapportés par les patients ayant eut une préservation des nerfs caverneux (pertes d'urines à 3 mois: 36% vs 11% $p = 0.013$; protections à 12 mois: 50% vs 14% $p = 0.001$).

Commentaires (S. DROUPY)

L'acceptabilité du traitement chirurgical du cancer prostatique localisé est soumise à trois impératifs qui peuvent être classés par ordre d'importance de la façon suivante: contrôle carcinologique de la maladie, préservation de la continence urinaire, préservation des érections.

Lorsque ces trois éléments sont réunis la prostatectomie radicale est le meilleur traitement du cancer prostatique localisé. Malheureusement il est aujourd'hui impossible pour un patient donné de prédire avec certitude un résultat que ce soit en ce qui concerne l'absence de récurrence de la maladie ou en ce qui concerne la récupération d'une continence et d'érections normales.

Il est parfaitement clair depuis les publications de Geary et al (J Urol 1995 ; 154 :145-149) et de Fowler et al (Urology 1995 ;45 :1007-1015) que l'évaluation des troubles de la continence et de l'érection après prostatectomie radicale doit être prospective et réalisée grâce à des questionnaires de qualité de vie spécifique et générale validés. La construction méthodologique de cette étude semble idéale car elle permet de comparer les données pré et postopératoires en fonction de la technique chirurgicale utilisée.

Cependant, la faiblesse de l'effectif (49 patients évaluables sur 106), les incertitudes concernant la maîtrise de la technique de préservation utilisée (35 chirurgiens dont un nombre non précisé d'urologues en formation) et l'absence d'information sur la prise en charge postopératoire des patients (andrologique et rééducation périnéale) ne permettent pas de considérer les résultats de cette étude comme une référence fiable. Ces résultats sont par ailleurs concordants avec ceux d'autres études menées sur la base de questionnaires (Fowler et al. Urology 1995 ; 45 :1007-1015, Jonler et al. Brit J. Urol 1994 ; 74:352-358). En revanche, dans cette étude, non seulement la préservation des nerfs caverneux n'apporte pas de bénéfice en terme de récupération des érections mais est significativement délétère pour la continence. Cette dernière affirmation s'oppose à toutes les données publiées à ce jour qui tendaient à évoquer le rôle bénéfique de cette préservation sur la continence (Eastman et al J Urol 1996; 156:1707-1713.).

La prostatectomie radicale est considérée par les urologues comme le traitement de choix du cancer de la prostate localisé car elle permet d'éradiquer le cancer. Cependant, les probabilités actuelles de survie sans récurrence à 10 et 15 ans sont de 52 et 40% (Zincke et al J Urol 1994; 152:1850-1857). En l'absence d'étude comparative randomisée il est difficile aujourd'hui d'affirmer la supériorité de la chirurgie sur la radiothérapie.

L'objectif du médecin qui prend en charge un patient atteint d'un cancer de la prostate doit-il être d'éradiquer un cancer dont il sait qu'il ne conduit pas invariablement vers une évolution métastatique et une mort liée au cancer ou de prolonger et d'améliorer sa qualité de vie?

Cependant si ces objectifs semblent s'opposer à l'option chirurgicale avec ses risques d'incontinence et d'impuissance, il faut considérer le souhait du patient d'être débarrassé d'un cancer qui altère sa qualité de vie par l'inquiétude qu'il génère et lui interdit tout projet d'avenir. Ainsi, il est sans doute inadapté d'évaluer la qualité de vie sexuelle d'une population d'hommes de plus de 60 ans en terme de rigidité des érections. En revanche, il est important d'évaluer les modifications des index de qualité de vie générale en fonction des résultats des questionnaires symptomatiques.

Dans notre expérience, la préservation des nerfs caverneux est nécessaire à la récupération d'érections normales mais insuffisante dans plus de 40% des cas en raison d'une participation artérielle aux troubles de l'érection. La prise en charge thérapeutique précoce des patients après l'intervention doit être aujourd'hui la règle dans un but de rééducation afin d'éviter que l'hypoxie chronique des corps caverneux ne crée des lésions de fibrose irréversibles. La préservation de la continence urinaire doit pouvoir être obtenue dans plus de 75 % des cas grâce à l'utilisation de la rééducation périnéale et sphinctérienne pré et postopératoire. Ainsi, les résultats fonctionnels de la prostatectomie radicale dépendent du statut préopératoire du patient, de la nature du geste chirurgical et de la rééducation postopératoire.

•••

Existe-t-il une relation entre le sexe et la mort ? Découverte à la suite de l'étude de la cohorte de Caerphilly

Sex and death : are they related ? Findings from the Caerphilly cohort study

G.D.SMITH, S.FRANKEL, J.YARNELL

Universités de Bristol et de Belfort

British Medical Journal of Medicine 315,
1641-44, 20-27 déc.1997

INTRODUCTION

Le comportement sexuel, en tant que comportement à risque, a été peu étudié en dehors de son aptitude à transmettre des maladies.

Il y a peu d'exceptions au silence épidémiologique général sur l'association entre comportement sexuel et mortalité ultérieure. Dans une étude longitudinale de 1982 sur le vieillissement, la fréquence des rapports sexuels avait été inversement associée à la mortalité chez l'homme et la qualité érotique du rapport sexuel inversement associée à la mortalité chez la femme [1]. Des auteurs suédois ont trouvé que l'arrêt précoce de l'activité sexuelle entraîne une augmentation de la mortalité chez l'homme dans un délai de 5 ans [2]. L'insatisfaction sexuelle augmenterait le risque d'infarctus chez les épouses d'impuissants et éjaculateurs précoces [3]. Une étude rétrospective sur 10.026 prêtres catholique américains a révélé un discret accroissement du taux de mortalité (particulièrement pour cause de cirrhose) [4]. Une étude chez des religieuses a abouti à des constatations inverses [5].

Malheureusement, aucune de ces études ne permet de préciser dans quel sens s'exerce le rapport de cause à effet.

SUJETS ET MÉTHODES

Nous avons étudié une cohorte de 918 hommes âgés de 45 à 59 ans, entre 1979 et 1983. Tous ces individus étaient des habitants de la ville de Caerphilly et de 5 villages adjacents. L'examen clinique a été complété par la mesure de la pression artérielle, un électrocardiogramme, le dosage du cholestérol total, de la testostérone et de l'œstradiol plasmatiques. Un questionnaire sur la fréquence de leurs rapports sexuels a permis un classement en 3 groupes : basse fréquence (moins d'un orgasme par mois) fréquence élevée (deux fois par semaine et plus), fréquence moyenne (catégorie intermédiaire). Les individus ont été suivis pendant 10 ans et les décès ont été enregistrés ainsi que leurs causes.

RÉSULTATS

Le tableau suivant résume les principaux résultats:

Le risque de mortalité dans le groupe à fréquence d'orgasmes élevée est donc deux fois moindre que dans le groupe à basse fréquence, avec mise en évidence d'un effet dose si l'on considère le groupe à moyenne fréquence.

DISCUSSION

La prise en compte de divers facteurs de risque (âge, classe sociale, tabagisme, troubles coronaires) permet d'affirmer que la relation de cause à effet correspond bien à une diminu-

	Fréquence des orgasmes		
	Basse	Moyenne	Haute
Age moyen	54,1	51,8	49,8
% travailleurs non manuels	29,1	42,4	41,5
%t troubles coronariens au début de l'étude	20,5	15,7	14,1
% n'ont jamais fumé	13,2	17,5	18,2
mortalité toutes causes confondues après 10 ans (Odds ratios ajustés pour l'âge et les facteurs de risque)	2,0	1,6	1,0

tion la mortalité en raison de l'activité sexuelle plus élevée et non à une diminution de l'activité sexuelle en raison des facteurs de risque. En d'autres termes, plus la fréquence des orgasmes est élevée plus le sujet est protégé contre le risque de mourir. Cette constatation va à l'encontre de l'idée communément répandue que l'émission de sperme correspond à une perte d'énergie et est nuisible à la santé. A partir de nos résultats, peut s'envisager une campagne de prévention qui pourrait s'approprier le slogan excitant " Au moins cinq fois par jour " de la campagne visant à promouvoir la consommation des fruits et légumes.

Commentaires (J.C.CZYBA)

Il est réjouissant d'apprendre par une étude épidémiologique sérieuse que la répétition de l'orgasme masculin, au moins deux fois par semaine, apporte la gratification supplémentaire d'une espérance de vie prolongée et non le contraire.

Néanmoins il nous paraît difficile de partager complètement l'enthousiasme des auteurs lorsqu'ils préconisent le lancement d'une campagne de prévention avec comme slogan " Au moins cinq fois par jour ". Comme le chantait Georges Brassens " ça ne se commande pas ". Il est fort probable que les abstinentes habituels le soient plus souvent par manque de désir que par crainte de nuire à leur santé. Faut-il alors aller plus loin et promouvoir, comme celle des fruits et légumes, la consommation des aphrodisiaques efficaces qui seront bientôt disponibles sur le marché ?

Les auteurs ne se sont pas intéressés aux femmes, laissant le lecteur perplexe devant les quelques données de la littérature qu'ils citent : les nonnes (sans doute parce qu'elles fument peu) vivent longtemps ; les épouses (fumeuses par dépit ?) insatisfaites des hommes sexuellement défaillants sont plus exposées aux infarctus du myocarde ; les femmes satisfaites de la qualité (et non de la quantité) de leurs rapports sexuels ont une bonne longévité...

RÉFÉRENCES

- 1 PALMORE E.B. : Predictors of the longevity difference : a 25 year follow-up. *Gerontologist*, 1982,6,513-8
- 2 PERSSON G. Five-year mortality in a 70 year old urban population in relation to psychiatric diagnosis, personality, sexuality and early parental death. *Acta Psychiatr. Scand.*, 1981, 64,244-58
- 3 ABRAMOV L.A. Sexual life and frigidity among women developing acute myocardial infarction. *Psychosomat. Med.*, 1976, 38, 418-25
- 4 KAPLAN S.D. Retrospective cohort mortality study of Roman Catholic priests. *Prev. Med.*, 1988, 17, 335-45
- 5 BUTLER S.M., SNOWDON D.A. Trends in mortality in older women : findings from the nun study. *J Gerontol. Sci. B.*, 1996, 51, 201-8.

•••