

# L'œstradiol augmente le tonus urétral en diminuant localement l'expression de l'isoforme neuronale de la monoxyde d'azote synthase

## Estradiol increases urethral tone by locally inhibiting the expression of nNOS

Xavier Gamé<sup>1,2</sup>, Julien Allard<sup>2</sup>, Ghislaine Escourrou<sup>3</sup>, Pierre Gourdy<sup>2</sup>, Ivan Tack<sup>2</sup>, Pascal Rischmann<sup>1</sup>, Jean-Pierre Sarramon<sup>1</sup>, Jean-François Arnal<sup>2</sup>, Bernard Malavaud<sup>1</sup>

Cet article a reçu le prix du Jeune Talent Chirurgical

1 : Service d'urologie, transplantation rénale et andrologie, centre hospitalier universitaire Rangueil, Toulouse

2 : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U858 et laboratoire de physiologie.

3 : Laboratoire D'anatomie pathologique, centre hospitalier universitaire Rangueil, Toulouse.

### Mots clés

- ◆ Oestrogènes
- ◆ Neuro-urologie
- ◆ urèthre
- ◆ incontinence urinaire

### Résumé

Introduction : Le but de cette étude était d'explorer les effets de l'œstradiol à des taux physiologiques et gestationnels sur la fonction du bas appareil urinaire et l'expression urétrale de l'isoforme neuronale de la monoxyde d'azote synthase (nNOS).

Matériel et méthode : La fonction et l'histologie du bas appareil urinaire et l'expression urétrale de la nNOS ont été étudiées chez des souris femelles adultes soumises à une simulation d'ovariectomie, une castration chirurgicale ou une castration et supplémentation chronique par de l'œstradiol à des taux gestationnels (80 µg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>).

Résultats : La miction était profondément modifiée chez les souris ayant des taux gestationnels d'œstradiol au long cours. La fréquence des mictions était diminuée et les volumes résiduels augmentés. La résistance urétrale était deux fois supérieure chez les souris traitées par œstradiol sans changements structuraux de l'urètre, en faveur d'un mécanisme tonifiant pur. L'inhibition aiguë de la nNOS par le 7-nitroindazole diminuait la fréquence des mictions et augmentait le volume résiduel des souris ovariectomisées et ayant eu une simulation d'ovariectomie, mais n'avait aucun effet additif sur les souris traitées au long cours par des doses gestationnelles d'œstradiol, montrant que le traitement au long cours à des doses gestationnelles d'œstradiol et l'inhibition aiguë de l'activité de la nNOS avaient des effets fonctionnels semblables. Finalement, l'œstradiol diminuait l'expression urétrale de la nNOS chez les souris traitées.

Conclusion : Les taux gestationnels d'œstradiol au long cours augmentent le tonus urétral par inhibition de l'expression de la nNOS, tandis que les taux physiologiques d'œstradiol n'ont aucun effet.

### Keywords

- ◆ estrogen
- ◆ neurourology
- ◆ urethra
- ◆ urinary incontinence

### Abstract

Introduction: The aim of this study was to explore the effects of endogenous and supraestrus levels of 17β-estradiol (E2) on LUT and urethral neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression and function.

Material and Methods: LUT function and histology and urethral nNOS expression were studied in adult female mice subjected either to sham surgery, surgical castration, or castration plus chronic E2 supplementation (80 µg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, i.e., pregnancy level).

Results: The micturition pattern was profoundly altered by long-term supraestrus levels of E2 with decreased frequency paralleled by increased residual volumes higher than those of ovariectomized mice. Urethral resistance was increased twofold in E2-treated mice, with no structural changes in urethra, supporting a pure tonic mechanism. Acute nNOS inhibition by 7-nitroindazole decreased frequency and increased residual volumes in ovariectomized mice but had no additive effect on the micturition pattern of long-term supraestrus mice, showing that longterm supraestrus E2 levels and acute inhibition of nNOS activity had similar functional effects. Finally, E2 decreased urethral nNOS expression in ovariectomized mice.

Conclusion : Long-term supraestrus levels of E2 increased urethral tone through inhibition of nNOS expression, whereas physiological levels of E2 had no effect.

### Correspondance

Docteur Xavier Gamé

Service d'urologie, transplantation rénale et andrologie, CHU Rangueil, TSA 50032, 31059 Toulouse Cedex, France

Email : gamexavier@gmail.com

Des troubles urinaires à type d'incontinence urinaire ou d'hyperactivité vésicale sont rapportés jusque chez 50% des femmes (1). La fonction du bas appareil urinaire est intimement liée aux variations physiologiques des taux plasmatiques d'œstradiol, comme l'illustrent l'augmentation transitoire de la pression uréthrale lors du pic plasmatique d'œstradiol en milieu de cycle (2), son augmentation progressive au cours de la grossesse (3) et la prévalence des troubles urinaires après la ménopause (4).

Chez la femme, il a été rapporté que l'œstrogénothérapie prévenait, après la ménopause, la survenue de cystites (5), d'atrophie du bas appareil urinaire et d'hyperactivité vésicale (4). De plus, des données cliniques suggèrent que les œstrogènes améliorent partiellement le fonctionnement de l'appareil urinaire en améliorant la trophicité locale (6). Cependant, considérant l'incontinence urinaire, il n'a pas été rapporté d'effet des œstrogènes sur l'incontinence urinaire d'effort (7) voire même, des études multicentriques à large échelle ont montré une augmentation de l'incidence et de la sévérité de tous les types d'incontinence urinaire chez les patientes traitées (8).

Le stockage de l'urine et la miction impliquent en permanence une évolution inverse, sous commande spinale et supraspinale, du tonus musculaire vésical et de celui de l'urètre. La commande autonome du bas appareil urinaire est constituée des 3 composantes du système neurovégétatif. Le monoxyde d'azote (NO), le neurotransmetteur clé du système non adrénergique non cholinergique est produit par l'isoforme neuronal de la monoxyde d'azote synthase (nNOS). Dans le bas appareil urinaire, la nNOS est principalement exprimée dans les fibres nerveuses localisées dans la musculature et au sein de la *lamina propria* de la paroi uréthrale et faiblement dans le muscle détrusor (9, 10). En accord avec l'effet myorelaxant ubiquitaire du NO (11), les variations de la production locale de NO sont suspectées de jouer un rôle physiologique dans la relaxation du sphincter uréthral lors de la miction (12).

Comme les œstrogènes sont connus pour moduler l'expression de la nNOS dans plusieurs organes cibles, tels que l'hypothalamus (13) et l'appareil génital (14), le but de notre étude était d'évaluer les effets des taux gestationnels d'œstradiol sur la fonction et la morphologie du bas appareil urinaire et sur l'expression uréthrale de la nNOS.

## Matériel et méthode

### Expérimentation animale

Des souris femelles C57/BL6 (Charles Rivers, Les Oncins, France) étaient hébergées dans des cages en acier inoxydable placées dans une enceinte avec contrôle thermique, un cycle jour/nuit 12/12 heures et étaient alimentées avec le régime habituel des souris de laboratoire. Toutes les expériences ont été conduites conformément au *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, Washington, DC: National Academy Press, 1996).

L'anesthésie des souris était obtenue par injection intrapéritonéale à la dose de 0,2 ml/20g d'un mélange de 2,5 ml de kétamine 50 mg/5 ml (Panpharma, Luitré-Fougères, France) et de 0,5 ml de xylazine 2% (Bayer Pharma, Leverkusen, Allemagne) dans 7 ml de sérum physiologique. La température corporelle était maintenue à 37°C à l'aide d'une sonde rectale reliée à une plaque chauffante.

### Manipulations hormonales

Les souris étaient ovariectomisées ou avaient une simulation d'ovariectomie à l'âge de 4 semaines. Deux semaines plus

tard, les animaux ovariectomisés étaient implantés par voie sous-cutanée avec un placebo ou avec des implants diffusant pendant 60 jours de l'œstradiol (0,1 mg d'œstradiol libérant 80 µg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, Innovative Research of America, Sarasota, FL). Il a été précédemment rapporté que cette dose induisait des taux plasmatiques de 0,3 nM (80 pg.ml<sup>-1</sup>), une concentration rencontrée pendant la grossesse et environ 10 fois supérieure à celle trouvée pendant le cycle œstral (15). Six semaines plus tard, les souris recevaient soit une injection intrapéritonéale de 7-nitroindazole (Acros Organics, Morris Plains, NJ), un inhibiteur compétitif sélectif puissant de la nNOS sans effet significatif sur l'isoforme endothéliale de la monoxyde d'azote synthase (eNOS) de la souris (16) soniquée dans de l'huile d'arachide à une dose de 50 mg.kg<sup>-1</sup>, soit uniquement le solvant.

Un catalogue mictionnel était alors réalisé chez les animaux (6 par groupe). Deux jours plus tard, les pressions vésicales au point de fuite étaient mesurées. Une autre partie des animaux (6 par groupe) était suivie après la manipulation hormonale (ovariectomie, chirurgie de simulation, ovariectomie plus implants d'œstradiol tous les deux mois) jusqu'à l'âge de 4 mois. Ils étaient alors euthanasiés pour étude histologique, histomorphométrique et immunoempreinte protéique. Dans tous les cas, le statut hormonal a été vérifié par la combinaison du poids de l'utérus et du taux sérique d'œstradiol.

### Taux sériques d'œstradiol

Chez tous les animaux, des échantillons de sérum ont été prélevés avant euthanasie à 12 semaines (catalogue mictionnel) ou à l'âge de 16 semaines (étude histologique). Le taux sérique d'œstradiol était mesuré avec un double-anticorps RIA immulite-kit (Coat-ACount Estradiol-6 ; Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Les coefficients de variation *interassay* et *intra-assay* étaient respectivement de 4,1-15,3% et 3,5-7,6%. Le seuil de sensibilité était de 7,4 pg/ml et la réactivité croisée avec d'autres composants œstrogéniques était négligeable.

### Catalogue mictionnel

Le catalogue mictionnel était réalisé comme décrit par Burnett (9). Les animaux étaient placés dans des cages métaboliques (Marty Technologie, Marcilly-sur-Eure, France), une souris par cage, 14 heures avant le début de l'étude afin qu'ils s'acclimatent (nourriture et eau *ad libitum*). Les cages étaient placées sur un papier buvard préalablement pesé. Toutes les cinq minutes, le papier buvard était repesé et changé. La production d'urine a été calculée comme la somme du volume uriné et le volume résiduel par 8 h.

### Cystomanométrie

Chez le même animal, 48 heures après, les caractéristiques pariétales de la vessie ont été étudiées par cystomanométrie. Quinze minutes après induction de l'anesthésie générale, les souris étaient placées en décubitus dorsal sur une table chauffante asservie à une sonde thermique rectale afin de maintenir la température corporelle à 37°C. Un cathéter 22 Gauge (Braun, Melsungen, Allemagne) était mis en place dans l'urètre. L'extrémité proximale du cathéter était reliée latéralement à un pousse-seringue électrique (Harvard Apparatus, Southnatick, USA) afin de distendre la vessie par du sérum physiologique à température ambiante avec un débit constant de 1,2 ml/h. Dans l'axe, le cathéter était relié à un capteur de pression (Statham P10 EZ) et à un enregistreur TA 4000 (Gould Electronics, Ballainvilliers, France). Les paramètres étudiés étaient la pression intravésicale pour une distension de 50 µl, 100 µl, 150 µl et 200 µl.

## Pression vésicale au point de fuite

Sous loupe binoculaire, le dôme vésical était exposé par l'intermédiaire d'une courte laparotomie. Il était cathétérisé par un cathlon 22 Gauge mis en place à l'aide de son mandrin. Le cathlon était fixé et l'étanchéité du système assurée par la mise en place de cyanoacrylate autour du point d'entrée dans la vessie. La laparotomie était refermée par un surjet au fil tressé 4/0 (Ethicon Vicryl, USA). La vessie était distendue à un débit constant de 1,2 ml/h par du sérum physiologique et de l'encre bleue. Les pressions intravésicales étaient enregistrées avec un capteur de pression TA400 (Gould Electronics, Ballainvilliers, France) et la pression vésicale au point de fuite a été définie comme la pression enregistrée quand la première goutte était observée au méat.

## Etude histologique et histomorphométrie

Pour l'analyse histologique, les souris étaient euthanasiées à l'âge de 16 semaines, soit au moins 2 mois après acquisition de la maturité sexuelle. Sous anesthésie générale, afin d'éviter des images artéfactuelles secondaires aux spasmes vésicaux préagoniques, une injection intra-péritonéale de 0,5 ml d'atropine sulfate à 0,025 % (Laboratoire Renaudin, Ixassou, France) était pratiquée. Cinq minutes après, un cathéter 22 Gauge (Braun, Melsungen, Allemagne) était mis en place au niveau urétral. La vessie était vidée puis progressivement distendue, à un débit de 1,2 ml/h, par 50 µl de sérum physiologique. Le cathéter était ensuite clampé. Les souris étaient sacrifiées par injection intra-péritonéale de 0,5 ml de lidocaïne à 1 % (Astra-Zeneca, Rueil-Malmaison, France). L'appareil urinaire était prélevé en monobloc. Les différents organes étaient séparés et pesés. Les uretères étaient placés au sein d'un lobe hépatique puis fixés. L'ensemble des organes prélevés était fixé dans du liquide de Dubosc-Brazil. L'utérus était prélevé et pesé. Après fixation, les pièces histologiques étaient incluses en paraffine. Des sections de 4 micromètres, colorées par un trichrome bleu de Masson, ont été étudiées au microscope optique.

Les lames (uretère, vessie, urèthre) ont été numérisées pour analyse histomorphométrique à l'aide d'un appareil photo numérique (Nikon Coolpix 995) au grossissement x 400 pour les uretères, x 160 pour les vessies et x 100 pour les urèthres. Les images numérisées des vessies, des uretères et des urèthres ont été analysées avec le logiciel NIH Image® (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Les paramètres étudiés étaient pour l'uretère et l'urèthre, la surface globale, la surface de la musculature, du chorion, de l'épithélium et de la lumière. La section urétérale étudiée était située en regard du pôle inférieur du rein (tiers supérieur de l'uretère). La section urétrale étudiée correspondait au tiers moyen de l'urèthre. Pour la vessie, les paramètres étudiés étaient l'épaisseur moyenne de la musculature, obtenue en faisant le rapport de la surface de la musculature sur la longueur de l'épithélium correspondant. La zone étudiée correspondait au dôme vésical, dans l'axe d'implantation de l'urèthre. Les résultats étaient exprimés en µm et en µm<sup>2</sup>.

## Extraction et immunoempreinte protéique

Les urèthres ont été prélevés en bloc, rincés et congelés par immersion dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse au bout de trois semaines. Les tissus congelés ont été dégelés et homogénéisés ensuite dans environ 10 volumes d'un tampon contenant du glycérol à 10 %, 20 mM de Tris, 140 mM de NaCl, 10 mM de pyrophosphate de sodium, 10 mM de fluor, 2 mM orthovanadate de sodium, 3 mM d'EDTA, 10 µg.ml<sup>-1</sup> d'inhibiteur de la trypsine, 10 µg.ml<sup>-1</sup> de leupeptine et 2 µg.ml<sup>-1</sup> d'aprotinine à l'aide d'un Homogénéisateur Polyttron® (Kinematica, Lonay, Suisse) pendant quatre périodes de

une minute avec des pauses intermittentes de rafraîchissement de 4 minutes. L'homogénat a été centrifugé à 40 000 G pendant 45 minutes et le culot éliminé. Le surnageant a été récupéré. Des aliquots de 60 µl de surnageant ont été dilués 1:2 dans un tampon d'électrophorèse (1,8 M Tris HCl, pH 6,8, glycérol à 10%, SDS à 10%, bleu de bromophénol à 0,01% bleu et mercapto-éthanol à 5%) pour déposer 60 µg de protéine par voie. Les échantillons ont été réduits en les bouillant pendant 5 min. Le cortex de cervelet de souris a été utilisé comme contrôle positif. L'électrophorèse de gel de SDS-PAGE a été effectuée sur un gel constitué de 10% de polyacrylamide à 125 V pendant 30 min. Après transfert électrophorétique à une membrane de polyvinylidène Difluoride à 10-15 V pendant 30 min, les empreintes étaient bloquées la nuit avec du lait en poudre dilué dans du TBS-TWEEN 20 à 4°C. Les empreintes ont été alors incubées avec des anticorps polyclonaux primaires (nNOS N31030; laboratoires de Transduction, Lexington, KY) dilués dans un mélange de lait en poudre et de TBS-TWEEN 20 (nNOS 1:1000) pendant une heure à température ambiante. Les empreintes étaient alors rincées dans du TBS-TWEEN 20 pendant 1-15 minute suivie de 3-5 minutes et incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin IgG-peroxidase (SC2030; Santa Cruz Biotechnologie) dilués dans du TBS-TWEEN 20 (1:10 000) pendant une heure à température ambiante. Les empreintes étaient alors rincées comme ci-dessus et soumises au système de chemiluminescence augmenté. Le film autoradiographique a été appliqué aux empreintes jusqu'à ce qu'une exposition satisfaisante ait été obtenue. Après numérisation, les films ont été analysés par le logiciel d'analyse d'image du NIH pour quantifier l'expression de la nNOS.

## Analyse statistique

Les données ont été analysées par une analyse de variance multiple (ANOVA), suivie d'un test t de Student quand approprié. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± écart-type. Le seuil de signification des comparaisons était de  $p < 0,05$ .

## Résultats

### Poids des animaux et de l'utérus

Le poids des animaux était semblable dans tous les groupes (souris traitées par œstradiol : 23,3 ± 1,0 g ; souris ovariectomisées : 22,9 ± 0,9 g ; souris ayant eu une simulation d'ovariectomie : 23,1 ± 1,1 g ; non significatif).

Comparé avec les souris ayant eu une simulation d'ovariectomie (102 ± 12 mg), le poids moyen des utérus était semblable chez les souris traitées par œstradiol (117 ± 22 mg; non significatif) et diminué chez les souris ovariectomisées (23 ± 3 mg,  $p = 0,002$ ).

### Taux sérique d'œstradiol

Au moment de la mort (âge de 16 semaines), les taux sériques d'œstradiol étaient non détectables chez les souris ovariectomisées, alors qu'ils étaient 4 fois supérieurs chez les souris traitées par œstradiol par rapport aux souris ayant eu une simulation d'ovariectomie (80 ± 9 contre 19 ± 3 pg/ml,  $p = 0,001$  [tableau 1]). Des résultats identiques ont été observés à l'âge de 12 semaines (données non rapportées).

### Catalogue mictionnel

Les souris traitées par œstradiol avaient un nombre de mictions plus faible que les souris ovariectomisées et que les

	n	Poids des animaux (g)	Poids vessie (mg)	Poids utérus (mg)	Taux sérique d'œstradiol (pg/ml)
Simulation d'ovariectomie	6	23,1 ± 1,1	21,0 ± 1,8	102 ± 12	19 ± 3
Ovariectomie	6	22,9 ± 0,9	22,1 ± 2,2	23 ± 3	ND
Ovariectomie + œstradiol	6	23,3 ± 1,0	31,2 ± 7,8	117 ± 22	80 ± 9

Tableau 1. Caractéristiques des souris âgées de 4 mois en fonction du statut hormonal et taux sériques d'œstradiol correspondants. n = nombre d'animaux ; ND : non détectable

	Ovariectomisées			Simulation d'ovariectomie			œstradiol		
	sans 7NI	7NI	P	sans 7NI	7NI	P	sans 7NI	7NI	P
Nombre de mictions / 8h (n)	4,0 ± 1,7	1,2 ± 0,8	0,0079	3,6 ± 1,5	1,3 ± 0,8	0,0041	1,2 ± 0,8	0,4 ± 0,6	0,15
Volume uriné / 8h (µl)	332 ± 62	86 ± 69	0,0079	371 ± 118	260 ± 151	0,16	156 ± 128	58 ± 119	0,22
Volume résiduel (µl)	15 ± 13	104 ± 76	0,016	18 ± 17	92 ± 28	0,0079	318 ± 111	203 ± 36	0,11
Production d'urine / 8 h (µl)	347 ± 7	190 ± 12	0,016	389 ± 12	352 ± 12	0,45	474 ± 14	261 ± 18	0,11
Pression vésicale au point de fuite (cmH <sub>2</sub> O)	4,3 ± 0,7	9,9 ± 5,13	0,03	4,9 ± 0,9	7,60 ± 1,55	0,03	8,8 ± 2,3	10,7 ± 6,12	0,70

Tableau 2. Comportement mictionnel des animaux vigils et pression vésicale au point de fuite chez l'animal anesthésié en fonction du statut hormonal et de l'inhibition aiguë de la nNOS par injection intrapéritonéale de 7-nitroindazole. Dans chaque condition (ovariectomisées, simulation d'ovariectomie et animaux ovariectomisés traités par œstradiol), P (ANOVA) correspond à l'étude de l'effet de l'inhibition de la nNOS par le 7-nitroindazole.

	Souris castrées n = 5	Taux gestationnels d'œstradiol n = 5	P	Simulation d'ovariectomie n = 7	P
50 µl	1,9 ± 0,3	1,6 ± 1,0	ns (0,41)	1,5 ± 0,4	ns (0,11)
100 µl	18,3 ± 16,3	2,4 ± 2,3	0,032	9,6 ± 6,4	ns (0,43)
150 µl	28,6 ± 16,1	5,3 ± 7,6	0,032	18,1 ± 8,6	ns (0,34)
200 µl	31,6 ± 13,0	7,7 ± 10,3	0,032	26,4 ± 7,2	ns (0,43)

Tableau 3. Pression intravésicale moyenne (± écart-type) en cmH<sub>2</sub>O pour une distension de 50, 100, 150 et 200 µl en fonction du statut hormonal (souris castrées ; souris ayant des taux gestationnels d'œstradiol ; souris ayant eu une simulation d'ovariectomie) et comparaison, par le test non paramétrique de Mann-Whitney, des pressions obtenues chez les souris ayant des taux gestationnels d'œstradiol et chez les souris ayant eu une simulation d'ovariectomie par rapport aux pressions obtenues chez les souris castrées.

souris ayant eu une simulation d'ovariectomie (respectivement 1,2 ± 0,8 vs 4,0 ± 1,7 et 3,6 ± 1,5 mictions par 8 h ; p = 0,008). À la fin de l'expérience, le volume résiduel d'urine a été déterminé par cathétérisation vésicale. Les souris traitées par œstradiol avaient un volume résiduel 30 fois supérieur à celui des souris ovariectomisées ou à celui des souris ayant eu une simulation d'ovariectomie, qui étaient presque dépourvus d'urines résiduelles (respectivement 0,32 ± 0,11 millilitres vs 0,01 ± 0,01 millilitres et 0,01 ± 0,01 millilitres ; p = 0,008).

L'inhibition pharmacologique aiguë de la nNOS par le 7-nitroindazole était associée à une diminution significative du nombre de mictions des souris ovariectomisées et des souris ayant eu une simulation d'ovariectomie et une augmentation significative du volume résiduel (tableau 2), prouvant l'effet inhibiteur de la nNOS sur le tonus urétral lors de la miction. À l'inverse, le 7-nitroindazole n'influait pas les paramètres de la miction des animaux traités par œstradiol (tableau 2). L'inhibition de la nNOS a significativement réduit la production d'urine chez les souris ovariectomisées (190 vs 347 µl ; p = 0,016) mais pas chez les souris ayant eu une simulation d'ovariectomie (352 vs 389 µl ; p = 0,45) et chez les souris traitées par œstradiol (261 vs 474 µl ; p = 0,11).

### Cystomanométrie

Pour une distension de 50 µl, les pressions intravésicales n'étaient pas statistiquement différentes entre les 3 groupes. Pour une distension de 100, 150 et 200 µl, les souris castrées et celles ayant eu une simulation d'ovariectomie avaient une pression intravésicale comparable. À l'inverse, elle était abaissée chez les souris ayant des taux gestationnels d'œstradiol. Le tableau 3 présente les résultats de l'étude des pressions intravésicales pour une distension de 50, 100, 150 et 200 µl par référence aux souris castrées.

### Pression vésicale au point de fuite

Les souris traitées par œstradiol avaient une pression vésicale au point de fuite deux fois supérieure à celle des souris ova-

riectomisées et des souris ayant eu une simulation d'ovariectomie (respectivement, 8,8 ± 2,3 vs 4,3 ± 0,7 et 4,9 ± 0,9 cmH<sub>2</sub>O ; p < 0,01 ; tableau 2).

L'inhibition aiguë de la nNOS augmentait significativement les résistances uréthrales chez les souris ayant eu une simulation d'ovariectomie (7,60 ± 1,55 vs 4,90 ± 0,89 cmH<sub>2</sub>O ; p = 0,03) et chez les souris ovariectomisées (9,90 ± 5,13 vs 4,25 ± 0,66 cmH<sub>2</sub>O ; p = 0,03) mais pas chez les souris traitées par œstradiol (10,67 ± 6,12 vs 8,75 ± 2,29 cmH<sub>2</sub>O, non significatif, p = 0,70), mettant en évidence à la fois le rôle relaxant de la nNOS chez les souris ayant eu une simulation d'ovariectomie et chez les souris ovariectomisées et sa perte d'effet chez les souris traitées par œstradiol (tableau 2).

### Histologie et histomorphométrie

Les figures 1 et 2 montrent les résultats de l'étude histologique et histomorphométrique. Comme attendu chez la souris, les sections uréthrales étaient exemptes de muscle strié. L'augmentation des résistances uréthrales induites par l'œstradiol était associée à une augmentation de l'épaisseur de la musculature de l'uretère et de la vessie et par une augmentation du poids de la vessie (respectivement 31,2 ± 7,8 chez les souris traitées par œstradiol vs 21,0 ± 1,8 chez les souris ayant eu une simulation d'ovariectomie et 22,1 ± 2,2 mg chez les souris ovariectomisées ; p < 0,01). Aucune différence n'a été observée au niveau des différentes couches de la paroi uréthrale, et ce quelque soit le statut hormonal.

### Expression uréthrale de la nNOS

L'œstradiol influait fortement sur l'expression uréthrale de la nNOS. Comparés aux souris ayant eu une simulation d'ovariectomie, les taux gestationnels d'œstradiol conduisaient à une diminution significative de 62% de l'expression uréthrale de la nNOS, tandis que l'ovariectomie menait à une augmentation de 69% de son expression (fig. 3).

Figure 1. Etude histologique de l'uretère, de la vessie et de l'urètre en fonction du statut hormonal (Trichrome de Masson).

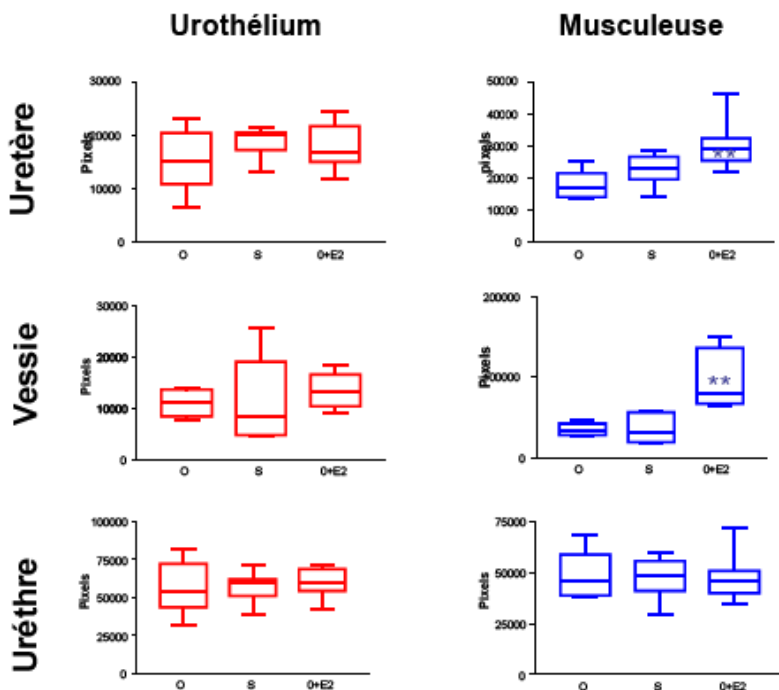
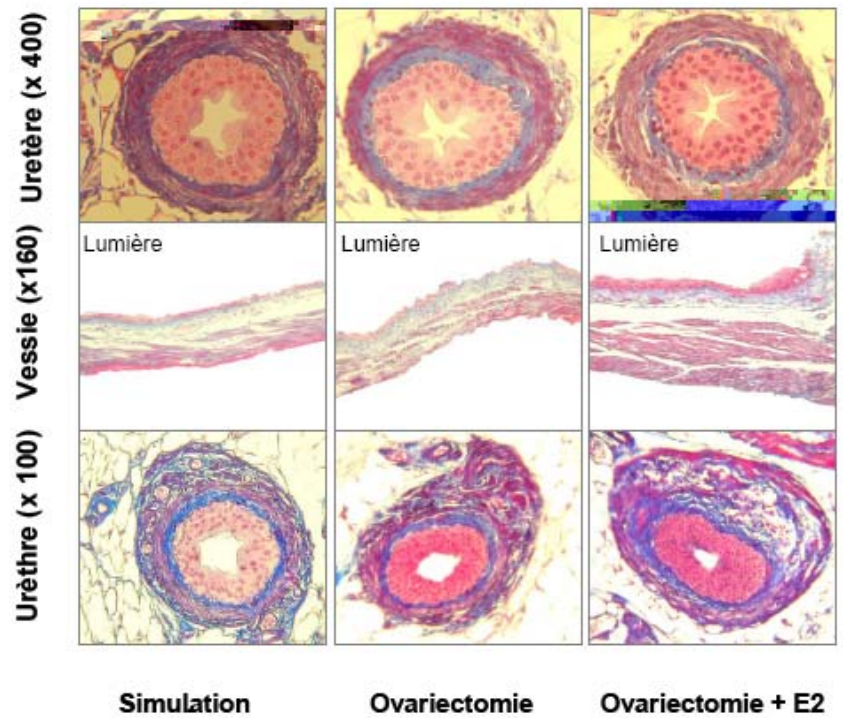


Figure 2: Étude histomorphométrique de l'uretère, de la vessie et de l'urètre. Comparaison de la surface de l'urothélium et de la muscleuse en fonction du statut hormonal. Aucune différence n'a été observée au niveau de l'urothélium quelque soit le segment étudié. En revanche, la muscleuse urétérale et vésicale était augmentée chez les animaux ovariectomisés traités par œstradiol par rapport aux animaux ovariectomisés et aux animaux ayant eu une simulation d'ovariectomie (\*\* :  $p < 0,01$ ).

Figure 3. Expression de l'isoforme neuronale de la monoxyde d'azote synthase (nNOS) au niveau de l'urètre de la souris femelle en fonction du statut hormonal.

A : Western-Blot. Standard correspond à 0,5, 1 et 1,5 µg d'extraits protéiques de cerveau (contrôle positif)

B : Par rapport aux souris ayant eu une simulation d'ovariectomie (S), diminution de 62 % de l'expression de la nNOS chez les souris traitées par des doses gestationnelles d'œstradiol (O+E2) ( $p < 0,01$ ) et augmentation de 69% chez les souris ovariectomisées (O) ( $p < 0,05$ ).

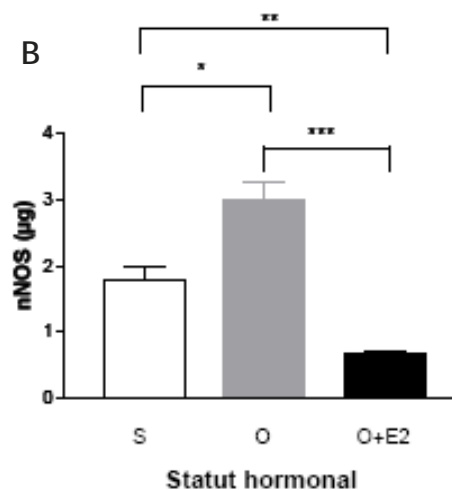
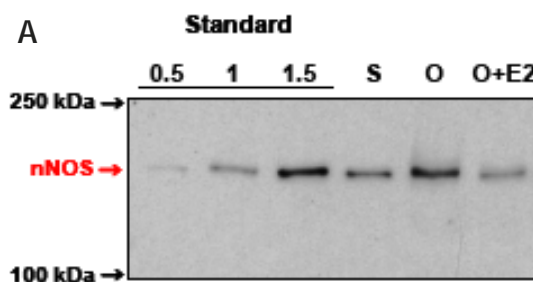
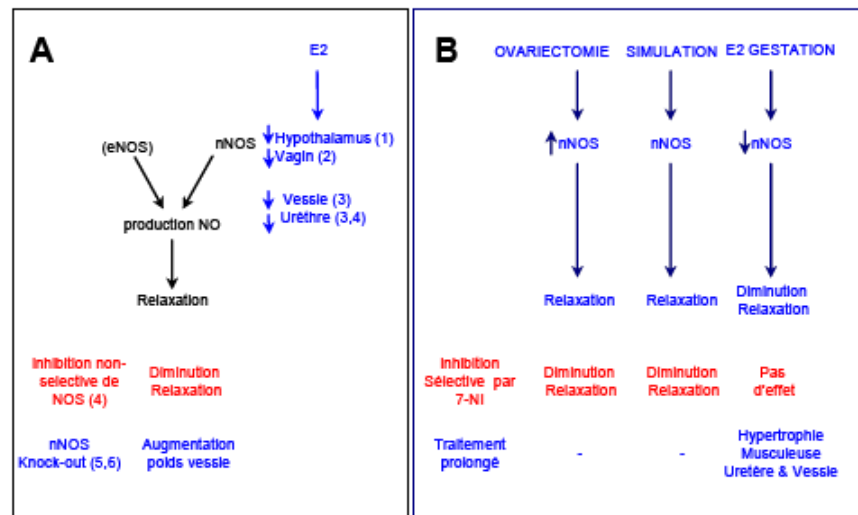


Figure 4. Représentation des interactions entre les œstrogènes et la production de monoxyde d'azote et des effets fonctionnels sur le bas appareil urinaire.

A : résultats rapportés par 1) Warembourg [13], 2) Traish [14], 3) Al-Hijji et Batra [19], 4) Takahashi [18], 5) Burnett [9], 6) Sutherland [17]

B : notre étude

nNOS : isoforme neuronale de la monoxyde d'azote synthase ; eNOS : isoforme endothéliale de la monoxyde d'azote synthase ; 7NI : 7 NitroIndazole.



## Discussion

Dans ce travail, nous avons confirmé l'influence de l'œstradiol sur le tonus uréthral et avons montré que cette dernière était liée à des variations de l'activité et de l'expression locale de la nNOS, comme cela a déjà été rapporté dans d'autres organes cibles (fig. 4). Contrairement aux souris ayant eu une simulation d'ovariectomie et aux souris ovariectomisées chez lesquelles l'inhibition aiguë de la nNOS était responsable d'une augmentation des résistances uréthrales, l'inhibition de la nNOS n'avait aucun effet sur les résistances chroniquement élevées observées chez les souris traitées par œstradiol.

Comme indiqué par l'augmentation du volume résiduel et la diminution du nombre de mictions chez les animaux traités par œstradiol, le statut hormonal influence profondément la fonction urinaire. Cela amène à s'interroger sur la possibilité que des taux gestationnels d'œstradiol soient responsables de l'apparition de fuites par regorgement secondaires à une rétention chronique d'urine. Cependant, la définition du NIH des fuites par regorgement est la présence de mictions fréquentes et de faible volume (<http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/uiwomen/index.htm>). À l'inverse, les souris traitées par œstradiol avaient une diminution du nombre de mictions et une augmentation du volume uriné par miction.

Une des limites de notre étude est que nous n'avons pas étudié la contractilité vésicale. Bien qu'il ait été montré que la nNOS était le principal isoforme de la NOS au niveau du bas appareil urinaire (9), l'inactivation de son gène n'affecte pas la contractilité ou la relaxation de bandes de vessie après stimulations chimiques et électriques (17), suggérant que les effets urodynamiques et sur la miction sont secondaires aux variations des résistances uréthrales (9, 12, 17). Nous nous sommes donc concentrés sur le contrôle dynamique, par l'œstradiol au travers de la voie de la nNOS, de la résistance uréthrale.

Comme la résistance uréthrale peut être le reflet soit d'une obstruction dynamique résultant du tonus musculaire lisse soit des résistances tissulaires statiques, nous avons examiné leurs contributions respectives en fonction du degré d'imprégnation œstrogénique et selon l'activité de la nNOS en mesurant la pression vésicale au point de fuite, semblable à la pression vésicale au point de fuite étudiée en clinique humaine, et avons cherché des modifications structurelles. À l'inverse des souris ayant eu une simulation d'ovariectomie et des souris ovariectomisées, les souris traitées par œstradiol avaient des résistances uréthrales deux fois supérieures et ces résistances n'étaient pas modifiées par l'inhibition de la nNOS. De plus, la structure de la vessie appréciée par l'analyse d'image et son poids, était significativement modifiée. En revanche, au-

cune différence entre les différents groupes n'a été observée au niveau de la paroi uréthrale, suggérant que l'augmentation des résistances uréthrales induites par l'œstradiol n'était pas secondaire à des changements structurels. Chez les souris ovariectomisées ou ayant eu une simulation d'ovariectomie, l'inhibition aiguë de la nNOS était responsable d'une augmentation de la pression vésicale au point de fuite, confirmant l'effet relaxant, dans l'appareil urinaire femelle, du NO sur le tonus uréthral (17). Cependant, une telle inhibition n'avait aucune influence sur l'augmentation des résistances uréthrales observée chez les souris traitées par œstradiol.

Nous avons donc évalué l'expression de la nNOS et pour la première fois mis en évidence la diminution significative dans l'urètre de l'expression de la nNOS chez des animaux traités par œstradiol et, à l'inverse, son importante augmentation chez les animaux ovariectomisés.

Il y a dix ans, Takahashi (18) rapportait pour la première fois que les œstrogènes à dose élevée donnés sur une courte période réduisaient l'activité NOS et inhibait la relaxation induite par la stimulation des nerfs nitrergiques du muscle lisse uréthral de lapin. Al-Hijji et Batra (19) ont montré que la diminution de l'activité NOS induite par l'œstradiol était observée dans tous les segments du bas appareil urinaire. Ces deux études ont évalué l'influence de la stimulation à court terme (respectivement 2 et 1 semaine) et avec de hautes doses (respectivement 5 et 1 mg.kg<sup>-1</sup>.semaine<sup>-1</sup>) d'œstradiol sur l'activité NOS mais n'ont pas évalué l'implication sélective des sous-types de NOS. À notre connaissance, nous rapportons pour la première fois la preuve d'une modulation hormonale à long terme de l'expression nNOS au niveau du bas appareil urinaire femelle, découverte clef au vu de la fonction du NO en tant que médiateur majeur de la relaxation du muscle lisse au niveau du bas appareil urinaire.

Sutherland (17) et Burnett (9) ont précédemment souligné le rôle clef du sous-type nNOS sur la fonction du bas appareil urinaire. Sutherland a montré que l'inactivation du gène de la nNOS chez des souris femelles aboutissait à une diminution profonde de l'activité NOS en général, dans la vessie et l'urètre, indiquant que la nNOS représentait la plupart de l'activité NOS au niveau du bas appareil urinaire. Parallèlement, il montrait une augmentation du poids de la vessie et de la pression vésicale au point de fuite suggérant que l'absence de nNOS conduisait à une augmentation des résistances uréthrales, qui n'étaient cependant pas responsable de modifications de la miction (17). Chez la souris mâle, l'inactivation du gène de la nNOS s'associait à des troubles de la vidange vésicale (9). De façon intéressante, l'eNOS était observée dans l'endothélium des vaisseaux sanguins sous-muqueux et dans l'urothélium uréthral, alors que l'expression de la nNOS était limitée aux fibres nerveuses situées dans la *lamina propria* et

dans la musculature, soulignant ainsi un contrôle exclusif de la relaxation musculaire urétrale par la nNOS (9). Nos découvertes chez la souris femelle ayant eu une simulation d'ovariectomie pour laquelle l'inhibition sélective de la nNOS par le 7-nitroindazole augmentait le tonus urétral est en accord avec ces deux études.

Nous montrons ici que des doses gestationnelles d'œstradiol diminuaient l'expression urétrale de la nNOS, aboutissant aux modifications profondes de la fonction et de la structure vésicale. Parallèlement à la modulation de l'expression de la nNOS, l'œstradiol peut aussi indirectement diminuer l'activité NOS en générant une production urétrale d'inhibiteurs endogènes de NOS tels que le N<sup>G</sup>-monométhyl-L-arginine et le N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-diméthyl-L-arginine (20). Des études chez l'homme ont montré que les inhibiteurs endogènes de NOS ont un rôle physiopathologique dans certaines pathologies comme les artériopathies périphériques ou coronariennes (21, 22). En plus de la modulation de la fonction urétrale ou de ces conséquences, l'œstradiol a un effet important sur le réservoir vésical. En effet, il peut induire une hypertrophie du détrusor (23) ou réduire la densité en récepteurs muscuraniques (24) conformément à l'amélioration significative des symptômes d'hyperactivité vésicale de la femme ménopausée (25).

Dans l'ensemble, en diminuant l'expression et l'activité de la nNOS et en augmentant la concentration locale d'inhibiteurs de la NOS, l'œstradiol à des taux gestationnels peut localement perturber la production de NO, conduisant à une augmentation du tonus urétral. Cela pourrait expliquer l'augmentation progressive du tonus urétral et l'absence relative d'incontinence urinaire d'effort pendant la grossesse (3) et suggère un effet bénéfique des œstrogènes dans l'incontinence postménopausique.

Cet effet n'a pas été observé avec des doses sériques physiologiques d'œstradiol, conformément à l'absence rapportée d'efficacité sur l'incontinence urinaire de la supplémentation œstrogénique à des taux correspondant à ceux de l'œstrus (7, 8). Cette discordance entre les taux physiologiques et gestationnels d'œstradiol a été précédemment rapportée par notre équipe dans d'autres situations, comme la prévention de l'athérosclérose (15) et la modulation des cellules *natural killer* T (26).

Cette étude a aussi confirmé l'impact de doses élevées d'œstradiol sur la fonction rénale et sur l'expression rénale de la nNOS. En effet, chez les animaux traités par œstradiol, la production d'urine (somme du volume uriné et du volume résiduel) était augmentée, rappelant les travaux de Carlberg (27) qui a montré que la supplémentation par des doses élevées d'œstrogènes augmentait le volume d'urine produit en diminuant l'osmolalité. De plus, cela était sous l'influence de l'inhibition de la nNOS, confirmant l'observation d'Alexander (28) chez la rate enceinte, qui a montré que les variations hémodynamiques rénales étaient liées à l'expression rénale de l'isoforme inductible de la NOS et de la nNOS.

En ce qui concerne les animaux ovariectomisés, la production d'urine était brusquement réduite par l'inhibition de la nNOS (347 vs 190 µl ; p = 0,016), tandis qu'aucun effet significatif n'a été observé chez les animaux ayant eu une simulation d'ovariectomie, suggérant que le rôle de la nNOS était plus important après castration. Récemment, Yamaleyeva (29) a observé dans le cortex et la médullaire de rats hypertensifs que l'ovariectomie augmentait l'ARNm de la nNOS, mais diminuait l'ARNm de l'eNOS, suggérant que l'augmentation de l'expression de la nNOS rénale constituait un mécanisme compensatoire à la réduction induite par la castration de l'eNOS rénale. Cela est en accord avec l'observation présente d'un effet plus profond de l'inhibition aigue de la nNOS chez les animaux ovariectomisés par rapport aux animaux ayant eu une simulation d'ovariectomie.

Une découverte importante est que pour avoir un effet clinique sur le tonus urétral, la supplémentation en œstradiol doit permettre d'obtenir des taux gestationnels au niveau de

l'urètre. De tels taux pourraient être obtenus par une administration transvaginale qui, comme l'a montré une revue de la *Cochrane Library* ayant inclus 16 essais comprenant 2 129 femmes, a un effet positif sans effets secondaires sur la sécheresse et l'atrophie vaginale (30). Une autre voie serait de recourir à des modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERMs), développés pour reproduire certains mais pas tous les effets de l'œstradiol. L'identification de nombreux coactivateurs et corépresseurs modulant la fonction des récepteurs et la production de deux sous-types de récepteurs aux œstrogènes attestent de la complexité potentielle avec laquelle les SERMs peuvent produire des réponses spécifiques dans divers tissus (31). Contrairement à leurs effets sur le métabolisme osseux, les SERMs ne semblent pas avoir un effet de classe sur le bas appareil urinaire (32) et les modèles animaux que nous rapportons pourraient être d'une grande utilité dans le développement préclinique d'« uroSERM », conçus pour profiter de la modulation du tonus urétral par les œstrogènes.

## Conclusion

Le traitement au long cours avec des doses élevées d'œstradiol augmente le tonus urétral et diminue l'expression de la nNOS au niveau de l'urètre. Ce mécanisme explique l'augmentation physiologique du tonus urétral pendant la grossesse. Il suggère un effet bénéfique de la délivrance locale d'œstrogènes à doses gestationnelles ou d'uroSERM dans le traitement de l'incontinence urinaire postménopausique.

## Références

1. Norton P, Brubaker L. Urinary incontinence in women. *Lancet* 2006;367:57-67.
2. Van Geelen JM, Doesburg WH, Thomas CM, Martin CB, Jr. Urodynamic studies in the normal menstrual cycle: the relationship between hormonal changes during the menstrual cycle and the urethral pressure profile. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:384-92.
3. Losif S, Ingemarsson I, Ulmsten U. Urodynamic studies in normal pregnancy and in puerperium. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:696-700.
4. Cardozo L, Bachmann G, McClish D, Fonda D, Birgerson L. Meta-analysis of estrogen therapy in the management of urogenital atrophy in postmenopausal women: second report of the Hormones and Urogenital Therapy Committee. *Obstet Gynecol* 1998;92:722-7.
5. Cardozo L, Lose G, McClish D, Versi E, de Koning Gans H. A systematic review of estrogens for recurrent urinary tract infections: third report of the hormones and urogenital therapy (HUT) committee. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001;12:15-20.
6. Hextall A, Cardozo L. The role of estrogen supplementation in lower urinary tract dysfunction. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001;12:258-61.
7. Robinson D, Cardozo LD. The role of estrogens in female lower urinary tract dysfunction. *Urology* 2003;62:45-51.
8. Hendrix SL, Cochrane BB, Nygaard IE, Handa VL, Barnabei VM, Iglesia C, Aragaki A, Naughton MJ, Wallace RB, McNeely SG. Effects of estrogen with and without progestin on urinary incontinence. *Jama* 2005;293:935-48.
9. Burnett AL, Calvin DC, Chamness SL, Liu JX, Nelson RJ, Klein SL, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Urinary bladder-urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption of neuronal nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans. *Nat Med* 1997;3:571-4.
10. Ho KM, Ny L, McMurray G, Andersson KE, Brading AF, Noble JG. Co-localization of carbon monoxide and nitric oxide synthesizing enzymes in the human urethral sphincter. *J Urol* 1999;161:1968-72.
11. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
12. Mamas MA, Reynard JM, Brading AF. Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology* 2003;61:1079-85.
13. Warembourg M, Leroy D, Jolivet A. Nitric oxide synthase in the

- guinea pig preoptic area and hypothalamus: distribution, effect of estrogen, and colocalization with progesterone receptor. *J Comp Neurol* 1999;407:207-27.
14. Traish AM, Kim NN, Huang YH, Min K, Munarriz R, Goldstein I. Sex steroid hormones differentially regulate nitric oxide synthase and arginase activities in the proximal and distal rabbit vagina. *Int J Impot Res* 2003;15:397-404.
  15. Elhage R, Arnal JF, Pieraggi MT, Duverger N, Fievet C, Faye JC, Bayard F. 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2679-84.
  16. Moore PK, Babbedge RC, Wallace P, Gaffen ZA, Hart SL. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits antinociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol* 1993;108:296-7.
  17. Sutherland RS, Kogan BA, Piechota HJ, Bredt DS. Vesicourethral function in mice with genetic disruption of neuronal nitric oxide synthase. *J Urol* 1997;157:1109-16.
  18. Takahashi W, Yoshida M, Wada Y, Goto S, Inadome A, Yono M, Ueda S. Effect of estrogen on nitric oxide-induced relaxation of the rabbit urethra. *Eur J Pharmacol* 1997;339:165-71.
  19. Al-Hijji J, Batra S. Downregulation by estrogen of nitric oxide synthase activity in the female rabbit lower urinary tract. *Urology* 1999;53:637-41.
  20. Okuno T, Masuda H, Tsujii T, Kihara K, Yamauchi Y, Azuma H. Accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors in inhibiting urethral relaxation following estrogen supplementation in ovariectomized rabbits. *J Urol* 2004;172:360-4.
  21. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997;95:2068-74.
  22. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001;358:2127-8.
  23. Lin AD, Levin R, Kogan B, Whitbeck C, Chichester P, Sokol R, Manikarottu A. Estrogen induced functional hypertrophy and increased force generation of the female rabbit bladder. *NeuroUrol Urodyn* 2006;25:473-9.
  24. Shapiro E. Effect of estrogens on the weight and muscarinic cholinergic receptor density of the rabbit bladder and urethra. *J Urol* 1986;135:1084-7.
  25. Cardozo L, Lose G, McClish D, Versi E. A systematic review of the effects of estrogens for symptoms suggestive of overactive bladder. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:892-7.
  26. Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, Leite-de-Moraes M, Dy M, Arnal JF, Bayard F, Herbelin A. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. *Blood* 2005;105:2415-20.
  27. Carlberg KA, Fregly MJ, Fahey M. Effects of chronic estrogen treatment on water exchange in rats. *Am J Physiol* 1984;247:E101-10.
  28. Alexander BT, Miller MT, Kassab S, Novak J, Reckelhoff JF, Kruckeberg WC, Granger JP. Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension* 1999;33:435-9.
  29. Yamaleyeva LM, Gallagher PE, Vinsant S, Chappell MC. Discoordinate regulation of renal nitric oxide synthase isoforms in ovariectomized mRen2.Lewis rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R819-26.
  30. Suckling J, Lethaby A, Kennedy R. Local oestrogen for vaginal atrophy in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2003:CD001500.
  31. Lonard DM, Smith CL. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. *Steroids* 2002;67:15-24.
  32. Albertazzi P, Sharma S. Urogenital effects of selective estrogen receptor modulators: a systematic review. *Climacteric* 2005;8:214-20.