

Université de Montréal

**Étude des gènes candidats reliés à l'hypertension
artérielle et l'obésité dans une population hypertendue
du Saguenay-Lac-Saint-Jean.**

par

Benoit Deslauriers

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Sciences biomédicales

Décembre 2003

© Benoit Deslauriers, 2003



W

4

U58

3004

V.060

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude des gènes candidats reliés à l'hypertension artérielle et l'obésité
dans une population du Saguenay-Lac-Saint-Jean

présentée par :

Benoit Deslauriers

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr John S.D. Chan, président-rapporteur
Dr Pavel Hamet, directeur de recherche
Dr Zdenka Pausova, co-directeur
Dr Guy Rousseau, membre du jury
Dr Mohamed Chahine, examinateur externe
Dr Louis Dallaire, représentant du doyen de la FES

Résumé

Il est bien connu que l'hypertension artérielle est l'un des facteurs de risque les plus importants pour le développement des maladies cardiaques, vasculaires, vasculaires cérébrales et vasculaires rénales. Encore aujourd'hui, l'hypertension et l'ensemble des maladies cardiovasculaires sont les causes principales de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Le système rénine angiotensine (SRA) joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle, dans la fonction cardiaque ainsi que dans la morphologie cardiaque. De nombreuses études biochimiques sur la structure des récepteurs AT₁ ont été mises en œuvre depuis quelques années. Le but de ces études biochimiques est de mieux caractériser les récepteurs et de mieux comprendre leur fonctionnement. Notre contribution dans ce domaine se situe au niveau de l'étude du rôle des sites de glycosylation dans l'expression ainsi que dans les propriétés pharmacologiques du récepteur AT_{1a} chez le rat. Nous avons démontré que : (i) le récepteur mutant qui ne possède plus aucun site de glycosylation n'est pas exprimé à la membrane plasmique, de plus il est accumulé dans la zone périnucléaire ; (ii) la conservation de deux sites de glycosylation permet une incorporation normale du récepteur à la membrane plasmique, alors que la seule présence de l'Asn¹⁷⁶ assure un comportement similaire au récepteur de type sauvage ; (iii) tous les récepteurs exprimés démontrent des propriétés pharmacologiques inchangées. Ces résultats démontrent que les sites de glycosylation sont nécessaires pour l'expression du récepteur AT₁. Par la suite, des études génétiques sur différents gènes candidats reliés à l'hypertension artérielle et l'obésité ont été effectuées. Les résultats de l'étude génétique du récepteur AT₁ démontrent des liaisons significatives entre des polymorphismes du récepteur, des paramètres d'échocardiographie, ainsi que des pressions artérielles ambulatoires. Les études de liaison standard démontrent, dans une population hypertendue d'origine canadienne-française, que le locus du gène du récepteur AT₁ joue un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle ainsi que dans l'hypertrophie cardiaque. Cependant, cette liaison du récepteur AT₁ avec l'hypertension est

plutôt contradictoire dans la littérature. Une approche plus physiologique et temporelle est essentielle pour bien comprendre et décortiquer l'implication de tels systèmes complexes dans des pathologies multifactorielles comme l'hypertension artérielle. Avec ce paradigme, il a été possible de mettre au point une nouvelle approche d'évaluation de liaison génétique « temporelle », que nous avons nommé « liaison génétique dynamique ». À notre connaissance, il s'agit de la première étude de liaison dynamique. Cette technique nous a procuré un regard nouveau, qui pourrait expliquer, en partie, la source de nombreux résultats contradictoires dans les différentes études génétiques du SRA. L'utilisation de la génétique moléculaire a grandement contribué à la compréhension de la pathogenèse de maladies complexes telles l'obésité et l'hypertension. Depuis quelques années, plusieurs gènes ont été identifiés et impliqués dans la régulation de la prise alimentaire ainsi que dans le contrôle de la dépense énergétique. Étonnamment, certains de ces gènes sont impliqués autant dans la régulation de la balance énergétique que dans le contrôle de la pression artérielle. Les résultats de notre étude génétique chez des familles hypertendues d'origine canadienne-française suggèrent que les locus du gène de TNF- α et de la leptine sont liés et associés à l'obésité et à l'hypertension. Les études de liaison quantitative par paire de germains démontrent un effet significatif des locus sur 3 mesures globales et 7 mesures locales d'obésité. Les locus des gènes de TNF- α et de la leptine sont liés de façon significative autant au degré qu'à la distribution de la masse adipeuse dans notre population. De façon plus spécifique, le locus du gène de TNF- α est lié de façon significative à l'accumulation de masse adipeuse au niveau fémoral, alors que le locus de la leptine est plutôt lié à l'accumulation de masse adipeuse au niveau abdominal. Dans l'ensemble, les résultats présentés dans cette thèse aident à mieux comprendre le contrôle moléculaire et génétique de l'effet de l'angiotensine II et contribuent également à une meilleure compréhension des déterminants génétiques de l'hypertension et de l'obésité.

Mots-clés : récepteur angiotensine II, leptine, TNF- α , génétique, hypertension, obésité.

Abstract

It is common knowledge that hypertension is one of the most important risk factors contributing to cardiac, cardiovascular, cerebral vascular and renal vascular diseases. Today cardiovascular disease and hypertension are still the major causes of morbidity and mortality in the industrialized countries. The renin angiotensin system (RAS) plays an important role in the regulation of blood pressure, in the cardiac function as well as in the cardiac morphology. In recent years, many biochemical studies have been conducted on the structure and function of AT₁ receptors in order to better identify them and to further understand how they operate. Our contribution in this endeavour was to investigate the role of N-glycosylation in the expression and pharmacological properties of the rat AT_{1a} receptor. We have demonstrated that: (i) the mutant receptor with three defective glycosylation sites is not expressed at the plasma membrane and accumulates inside the cell at the perinuclear zone; (ii) the preservation of two glycosylation sites allows normal receptor delivery to the plasma membrane, while the presence of Asn¹⁷⁶ alone ensures a behavior similar to that of the wild-type receptor; (iii) all expressed receptors display unchanged pharmacological properties. These results demonstrate that N-glycosylation sites are required for the AT₁ receptor expression. We then, performed genetic studies on different candidate genes known to be related to hypertension and obesity. The results of these genetic studies of the AT₁ receptor show significant linkage between the receptor polymorphism and the echocardiographic parameter as well as ambulatory blood pressure. Standard linkage studies performed in a population of French Canadian origin demonstrate that the AT₁ gene locus plays an important role in the control of blood pressure and in cardiac hypertrophy. However, there is much contradiction in literature on the genetic implication of the AT₁ in the development of hypertension. In order to better understand and unravel the implication of complex systems like the RAS in multifactorial diseases such as essential hypertension, we need a more physiological and temporal approach. With this paradigm in mind, we developed a “dynamic genetic linkage”- a new approach for

temporal genetic linkage of physiological events. To our knowledge, this is the first such report on dynamic linkage analysis. This technique has given us new insight that may explain, at least in part, the source of many contradictory results obtained on various RAS genetic studies. The use of molecular genetics has greatly contributed to our understanding the pathogenesis of complex diseases such as obesity and hypertension. In recent years, several genes have been identified and implicated in the regulation of food intake and in the control of energy expenditure. Surprisingly, some of these genes are implicated as much in the regulation of the energy balance as in the control of blood pressure. The results of our genetic study on hypertensive families of French Canadian origin suggest that the TNF- α gene locus and the leptin are linked and associated with obesity and hypertension. The quantitative sib-pair analysis showed a significant linkage of the locus on 3 global and 7 local measures of obesity. The leptin and TNF- α gene locus are notably linked to the degree and distribution of adiposities in our population. To be more specific, the TNF- α gene locus is significantly linked with lower body obesity and the leptin gene locus is linked with the upper and central body obesity. The results described in this thesis contribute to our comprehension of the molecular and genetic control of the angiotensine II effect, and help us to better understand the genetic determinant of hypertension and obesity.

Keywords : angiotensin II receptor, leptin, TNF- α , genetic, hypertension, obesity

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xx
Chapitre 1 : Introduction	1
Hypertension	2
Statistique sur l'hypertension.....	2
Définition de l'hypertension	4
Système rénine angiotensine (SRA).....	8
Historique de découverte du SRA.....	8
Description du SRA	9
Systèmes contrebalançant le SRA.....	14
Étude des relations structure-fonction du récepteur AT ₁	20
Évidence d'une composante génétique de l'hypertension	26
Les études familiales.....	26
Les études d'adoption	27
Les formes monogéniques d'hypertension.....	28
Hypertension remédiable par les glucocorticoïdes	29
Syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïde	29
Syndrome de Liddle	30
La variabilité phénotypique des syndromes monogéniques d'hypertension.....	33
Hypertension essentielle.....	34
Interaction gène-environnement.....	35

Description d'outils d'analyse génétique pour l'étude de l'hypertension essentielle.....	38
Analyse de liaison génétique.....	38
Les méthodes alternatives d'analyse de liaison génétique « non paramétrique».....	40
L'approche par gène candidat	44
Population canadienne-française de la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean (SLSJ).....	45
Présentation du projet BALSAC	46
Historique et formation de la population	47
Effet fondateur et maladies génétiques	53
Étude génétique.....	55
Étude des polymorphismes du récepteur AT ₁	55
L'obésité.....	59
Obésité associée à l'hypertension	64
Étude génétique de la leptine	66
TNF- α	70
Chapitre 2 : Étude structure-fonction du récepteur AT₁.....	73
Summary	75
Introduction.....	76
Materials and methods	77
Receptor constructs and site-directed mutagenesis.....	77
Tagging at the N-terminus	78
Tagging at the C-terminus.....	79
Expression of WT and mutated receptors In COS-7 cells	80
Ligand-binding assays.....	81
IP assays.....	81
Photoaffinity labelling and Immunoblotting analysis.....	82
Enzymic deglycosylation	84
Subcellular localization of tagged receptors In COS-7 cells	85

RESULTS	86
Expression and pharmacological properties of WT and mutated receptors.....	86
Angiotensin-stimulated IP production of cells transfected with WT and mutant receptors	87
Evaluation of carbohydrate addition at the potential N-glycosylation sites by molecular-mass determination of WT and mutant receptors	88
Subcellular localization of WT and N-glycosylation-site-defective receptors	91
DISCUSSION	92
REFERENCES.....	95
Figures et légendes.....	100
Résumé de l'article 1.....	114
Chapitre 3 : Étude génétique du gène candidat de TNF-α.....	115
Summary	117
Introduction	118
Methods.....	120
Results	123
Discussion	126
References	129
Figures, tables and legends	135
Résumé de l'article 2.....	145
Chapitre 4 : Étude génétique du gène candidat de la leptine.....	146
Abstract	147
Introduction	148
Methods.....	151
Results	153
Discussion	155

The concept of selective leptin resistance.....	159
Potential implications for human obesity and hypertension	160
Conclusion	161
References	162
Figures, tables and legends	172
Résumé de l'article 3.....	178
Chapitre 5 : Étude génétique du récepteur AT₁ par liaison conventionnelle et liaison dynamique.....	179
Introduction	180
Objectif de l'étude.....	181
Méthodes	182
Sélection de la population	182
Critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude.....	182
Phénotypage de la population	184
Phénotypage pour l'étude de liaison dynamique	185
Génotypage	186
Méthode d'analyse de liaison.....	190
Résultats	191
Étude de liaison conventionnelle	191
Analyse de liaison dynamique du phénotype de l'index de Milwaukee (MI) pour le récepteur AT ₁	194
Analyse de liaison dynamique du phénotype du rythme cardiaque pour le récepteur AT ₁	199
Conclusion de l'étude.....	203
Chapitre 6 : Discussion	205
Discussion de l'étude des sites de glycosylation du récepteur AT ₁	206

Étude génétique du récepteur AT ₁	211
Implication du locus du gène de TNF- α dans l'obésité et l'obésité associée à l'hypertension.....	218
Implication du locus du gène de la leptine dans le développement de l'obésité et de l'hypertension.....	222
Le concept de résistance sélective à la leptine.....	226
Les avantages évolutifs responsables des maladies modernes.....	229
Perspective sur la pharmacogénétique et la bioinformatique.....	230
Conclusion	233
Bibliographie.....	234
Annexes	276
Constitutive activation of the human bradykinin B ₂ receptor induced by mutations in transmembrane helices III and VI.....	277
Abstract	278
Introduction.....	279
Materials and Methods.....	281
Reagents and Ligands	281
Site-Directed Mutagenesis and Receptor Expression	282
Binding Assays	283
IP Assays.....	284
Results and Discussion.....	284
Role of Asn ⁷⁶ and Tyr ²⁹⁵ in B ₂ Receptor Activation.....	285
Constitutive Activation of the B ₂ Receptor Induced by Asn ¹¹³ and Trp ²⁵⁶ Mutation	288
Conclusion	292
References	297
Tables and figures	303
Curriculum vitae.....	312

Liste des tableaux

Tableau 1:	Pourcentage de l'ensemble des décès attribuables aux maladies cardiovasculaires, par sexe au Canada de 1987 à 1999.	3
Tableau 2:	Propriétés biochimiques des enzymes de conversion ACE et ACE2	18
Tableau 3:	Les différentes formes mendéliennes de dérèglement de la pression artérielle.....	31
Tableau 4:	Résumé des différentes études génétiques du récepteur AT ₁	58
Tableau 5:	Séquence des oligonucléotides du récepteur AT ₁	188
Tableau 6:	Résultats d'analyses de liaisons génétiques entre le récepteur AT ₁ et les phénotypes d'échocardiographie.....	192
Tableau 7:	Analyses de liaison génétique quantitatives par paire de germains entre les polymorphismes du gène du récepteur AT ₁ et les phénotypes de pression artérielle ambulatoire.....	193

Liste des figures

Figure 1:	Pourcentage parmi la population générale de 20 ans et plus qui a un problème d'hypertension artérielle au Canada de 1994 à 2000.....	6
Figure 2:	Schéma représentatif des activités du SRA.....	12
Figure 3	Graphique comparatif d'intensité relative de la modification de la pression artérielle en fonction du temps.....	14
Figure 4:	Représentation schématique du récepteur AT ₁	21
Figure 5:	Localisation de Charlevoix dans la province de Québec.....	48
Figure 6:	Représentation schématique du gène du récepteur AT ₁	187
Figure 7:	Graphique d'étude de liaison dynamique du gène du récepteur AT ₁ pour le polymorphisme A1166C et du phénotype d'impédance cardiaque de l'index de Milwaukee.....	196
Figure 8:	Graphique comparatif entre la liaison dynamique du polymorphisme A1166C du récepteur AT ₁ et de l'index de Milwaukee et la valeur moyenne de l'index de Milwaukee (index de contractilité cardiaque) en fonction du temps.....	198
Figure 9:	Graphique d'étude de liaison dynamique du gène du récepteur AT ₁ pour le polymorphisme A1166C et du phénotype du rythme cardiaque.....	200
Figure 10:	Graphique comparatif entre la liaison dynamique du polymorphisme A1166C du récepteur AT ₁ et la valeur moyenne du rythme cardiaque en fonction du temps.....	202
Figure 11:	Analyse dynamique du marqueur c10s1230 sur le chromosome 10 situé à 8 cM des récepteurs adrénergique β -1 et α -2 pour le phénotype de la pression diastolique.....	215

Liste des abréviations

- $11\beta\text{OH}$ = 11β -Hydroxylase
- $11\beta\text{HSD}$ = 11β -Hydroxystéroïde déshydrogénase
- ACE = enzyme de conversion de l'angiotensine (angiotensine conversion enzyme)
- ACE2 = homologue de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
- ACTH = hormone adrénocorticotropique
- ACV = accidents cérébraux vasculaires
- ADRA2 = récepteur adrénergique α -2
- ADRB1 = récepteur adrénergique β -1
- AII = angiotensine II
- Ang I = angiotensine I
- Ang = angiotensine
- ANP = peptide natriurétique
- ARNm = acide ribonucléique de type messagé
- AS = aldostérone synthétase
- Asn = asparagine
- AT₁ = récepteur 1 de l'angiotensine II

- AT_2 = récepteur 2 de l'angiotensine II
- BMI = indice de masse corporelle (body mass index)
- BP = pression artérielle (blood pressure)
- CHEC = the nationwide Community Hypertension Evaluation Clinic
- CHUM = Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
- CO = débit cardiaque (cardiac output)
- ENaC = canal à sodium épithélial
- ER = réticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum)
- GCa = récepteur A du peptide natriurétique (guanylate cyclase A)
- GFR = taux de filtration glomérulaire (glomerular filtration rate)
- GLP-1 = glucagon-like peptide receptor -1
- GPCR = récepteur couplé aux protéines G (G-protein coupled receptor)
- HSI = hypertension systolique isolée
- Hsp27 = protéine de choc thermique de 27 kDa (Heat shock protein)
- HTA = hypertension, hypertendu
- IBD = identique par descendant (identical by descent)
- IBS = identique par état (identical by state)
- IL-1 = interleukine 1

- ILVM = Index de la masse ventriculaire gauche (index of left ventricular mass)
- IP = inositol phosphate
- IP₃ = inositol tri-phosphate
- IVST = épaisseur du septum interventriculaire (inter ventriculum septum thickness)
- LH = luteinizing hormone receptor
- LPA = acide lysophosphatidique
- LPL = lipoprotéine lipase
- LVID = diamètre interne du ventricule gauche (left ventricle internal diameter)
- MCV = maladies cardiovasculaires
- MI = index de contractilité (Milwaukee index)
- MR = récepteur des minéralocorticoïdes
- NEAT = thermogenèse sans exercice (non-exercise activity thermogenesis)
- NEP = endopeptidase neutre
- Norm = Normotendu
- Npr1 = récepteur du peptide natriurétique
- PRA = activité de la rénine plasmatique (plasmatic renin activity)
- PWT = épaisseur de la paroi postérieure (posterior wall thickness)
- QTL = locus à trait quantitatif (quantitative trait locus)

- RAS = renin angiotensin system
- rAT₁ = récepteur 1 de l'angiotensine II de rat
- RFLP = polymorphisme de restriction (restriction fragment-length polymorphism)
- SHR = rat spontanément hypertendu (spontaneous hypertensive rat)
- SHRSP = rat spontanément hypertendu sujet à l'apoplexie (SHR-strokeprone)
- SLSJ = Saguenay-Lac-Saint-Jean
- SNP = polymorphisme de type substitution d'un seul nucléotide (single nucleotide polymorphism)
- SNS = système nerveux sympathique
- SRA = système rénine-angiotensine
- SSCP = polymorphisme de conformation à simple brin (single strand conformation polymorphism)
- TNF- α = facteur de nécrose tumorale alpha (tumor necrosis factor-alpha)
- TNFR1 = récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale alpha (tumor necrosis factor receptor 1)
- TNFR2 = récepteur 2 du facteur de nécrose tumorale alpha
- TPR = résistance périphérique totale (total peripheral resistance)
- UCP = protéine découplante (uncoupled protein)

- VNTR = polymorphisme à nombre de répétitions variables (variable number tandem repeat)

À mes parents, ma grand-mère, ma conjointe et mes enfants,

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier ma conjointe et mes enfants pour leur patience exemplaire lors de la dernière année qui n'a pas toujours été facile. Plus particulièrement Caroline, ma compagne de vie, pour le soutien sans bornes qu'elle m'a apporté tout au long de mes études et spécialement au fil des 15 derniers mois. Je voudrais également remercier mes parents et ma grand-mère qui ont toujours cru en moi et qui m'ont grandement suivi et encouragés dans mon cheminement.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Dr Pavel Hamet pour sa vision, son enseignement, ses conseils, sa disponibilité (malgré son horaire extrêmement chargé) et surtout pour sa grande ouverture d'esprit. C'est cette ouverture d'esprit qui m'a permis de partir pendant presque deux ans en France et d'effectuer ma maîtrise auprès de ma conjointe. Grâce à lui, il m'a été possible de vivre cette grande aventure que je n'oublierai jamais. Dr Hamet est un maître pour moi, et j'espère toujours pouvoir prendre conseil auprès de lui.

Je voudrais remercier le Dr Jacky Marie qui m'a accueilli chaleureusement dans son laboratoire à Montpellier, et qui a su m'enseigner les principes de la biologie moléculaire. Grâce à son dynamisme et sa joie de vivre mon séjour fut teinté de gaieté, d'entrain, d'éclat de rire et de grande complicité. Jacky sera toujours pour moi un grand ami qu'il fait énormément plaisir de voir.

Je tiens à remercier Dr Ettore Merlo et Dr Juliano Antoniol pour leur merveilleuse collaboration qui m'a grandement stimulé intellectuellement. Je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes problèmes ainsi que pour tout le temps qu'ils y ont investi. Je crois fermement que cette synergie est un point tournant dans nos projets et je les en remercie grandement.

Je tiens également à remercier Dr Zdenka Pausova de m'avoir stimulé et enseigner les fondements de la génétique moléculaire. Je remercie le personnel technique qui oeuvrait dans les laboratoires du Dr Hamet et du Dr Tremblay pour leurs appuis et conseils. Je tiens à remercier plus particulièrement monsieur Gilles Corbeil et madame Suzanne Cossette qui ont enduré mes histoires abracadabrantes ainsi que mes nombreuses discussions (passionnées!) dans le stationnement arrière du CHUM.

Finalement, je m'en voudrais de passer sous silence l'aide que j'ai reçue de madame France Robin, tout au long de mon séjour au CHUM. Grâce à elle, il m'a été possible d'obtenir de nombreux rendez-vous avec Dr Hamet, et surtout de développer la technique qui m'a permis de déchiffrer l'écriture de mon directeur...

Je remercie également tous les membres du jury qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer ma thèse.

Chapitre 1 : Introduction

Hypertension

Statistique sur l'hypertension

Au Canada, comme dans la plupart des pays industrialisés, le taux de mortalité causé par les maladies cardiovasculaires (MCV) est en diminution depuis le début des années 70 ⁽¹⁾ (Tableau 1). Cette diminution peut être causée par une baisse de la prévalence des facteurs de risque des MCV. Des campagnes de prévention ont été lancées depuis les trente dernières années pour encourager les gens à réduire leur risque de développer des MCV. De telles campagnes mettaient l'accent sur les risques liés à la cigarette, les habitudes alimentaires liées au gras, la sédentarité, l'obésité, le taux de cholestérol et l'importance d'avoir un contrôle de la pression artérielle ⁽²⁾. Cependant, les MCV sont toujours en tête des causes de mortalité au Canada avec 36 % ⁽³⁾.

Il est bien connu que l'hypertension artérielle est l'un des facteurs de risque les plus importants pour le développement des maladies cardiaques, vasculaires, vasculaires cérébrales et vasculaires rénales. L'hypertension est une maladie qui représente un problème majeur pour la santé publique mondiale. Elle affecte approximativement 1 milliard d'individus à travers le monde ⁽⁴⁾. Il est également bien établi que le contrôle de la pression artérielle contribue à diminuer la fréquence et le taux de mortalité liés à ces pathologies vasculaires ^{(5) (6) (7)}. Pourtant, les statistiques les plus récentes compilées dans l'étude canadienne de la santé cardiaque indiquent que dans la totalité des personnes

hypertendues, seulement 16 % ont une tension artérielle contrôlée sous le niveau cible de 140/90 mmHg, que pour les hypertendus traités, 23 % des tensions artérielles ne sont pas bien contrôlées, que 19 % des personnes hypertendues connues ne sont pas traitées, et que 42 % des personnes hypertendues ne sont pas diagnostiquées ^{(3) (8) (9)}.

Année	Hommes (%)	Femmes (%)	Tous (%)
1987	40.48	43.97	42.06
1988	39.47	43.42	41.26
1989	39.06	42.61	40.67
1990	37.34	41.21	39.12
1991	37.11	40.95	38.88
1992	37.12	40.72	38.78
1993	37.03	40.19	38.50
1994	36.35	39.75	37.94
1995	35.99	39.29	37.54
1996	35.93	38.84	37.32
1997	36.03	38.64	37.28
1998	35.34	37.53	36.40
1999	35.02	36.97	35.96

Tableau 1 : Pourcentage de l'ensemble des décès attribuables aux maladies cardiovasculaires, par sexe au Canada de 1987 à 1999.

Source : Santé Canada, à l'aide des données des dossiers de mortalité, Statistique Canada.

Les risques de MCV augmentent directement avec la pression artérielle. Dans la population en général, 27 % des MCV chez la femme et 37 % chez l'homme sont attribuées à l'hypertension artérielle⁽¹⁰⁾. Cependant, passé l'âge de 55 ans, près de la moitié des Canadiens sont hypertendus. Aux États-Unis, le nombre de personnes hypertendues est estimé à plus de 50 millions. L'hypertension se retrouve le plus souvent chez les gens de

race noire : 38% des adultes de race noire sont atteints d'hypertension comparativement à 29 % chez les Blancs. Peu importe le niveau de la pression artérielle, les conséquences sont toujours plus sévères chez les Noirs. Aux États-Unis, on estime que seulement deux patients hypertendus sur trois ont été diagnostiqués comme étant hypertendus. De ces personnes, environ 75 % reçoivent un traitement pharmacologique, et seulement 45 % reçoivent un traitement adéquat. Le contrôle inadéquat de la pression artérielle a un impact économique considérable. Flack *et coll.* ont estimé que le manque de contrôle de la pression artérielle dans la population des États-Unis a menées à une dépense médicale directe de 964 millions de dollars en 1999 ⁽¹¹⁾. Les MCV ont un impact économique important au Canada. Santé Canada évalue le coût total des MCV pour l'économie canadienne à 18,472 milliards de dollars en 1998 ⁽¹⁾. Encore aujourd'hui, l'hypertension et l'ensemble des maladies cardiovasculaires sont les causes principales de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés ⁽¹²⁾. Au Canada, 8 personnes sur 10 affichent au moins un des facteurs de risque suivants : tabagisme, sédentarité, excès de poids, hypertension artérielle et diabète ⁽¹⁾. Comme l'hypertension a un impact important sur la santé humaine, l'étude de cette maladie est un domaine de recherche très actif.

Définition de l'hypertension

L'hypertension peut être définie comme une augmentation chronique de la pression artérielle. Lors de la prise de pression artérielle, deux valeurs sont enregistrées. La valeur la plus élevée correspond à la pression au moment où le cœur se contracte (systole) et la plus basse correspond à la pression artérielle au moment où le cœur se relâche entre les battements (diastole). D'une manière générale, on admet que la limite qui sépare la

pression artérielle normale de l'hypertension se situe à 140/90 mm Hg ⁽³⁾. Étant donné que la pression fluctue normalement sous l'effet de nombreux facteurs, il est important de mentionner que l'hypertension ne devient potentiellement dangereuse que si elle présente un caractère chronique, permanent. Les études épidémiologiques démontrent que la pression artérielle augmente avec l'âge jusqu'à 80 ans ⁽¹³⁾. Cependant, la pression diastolique augmente jusqu'à l'âge de 50, par la suite elle devient constante ou, même, peut diminuer légèrement. Cette modification de la pression en fonction de l'âge est observée autant chez l'homme que chez la femme. La prévalence de l'hypertension artérielle subit une augmentation autant chez les hommes que chez les femmes depuis 1994 (Figure 1). L'hypertension se retrouve souvent couplée avec d'autres facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'obésité abdominale, dyslipidémie, intolérance au glucose et hyperinsulinémie. Cela s'explique probablement par des fondements sous-jacents communs.

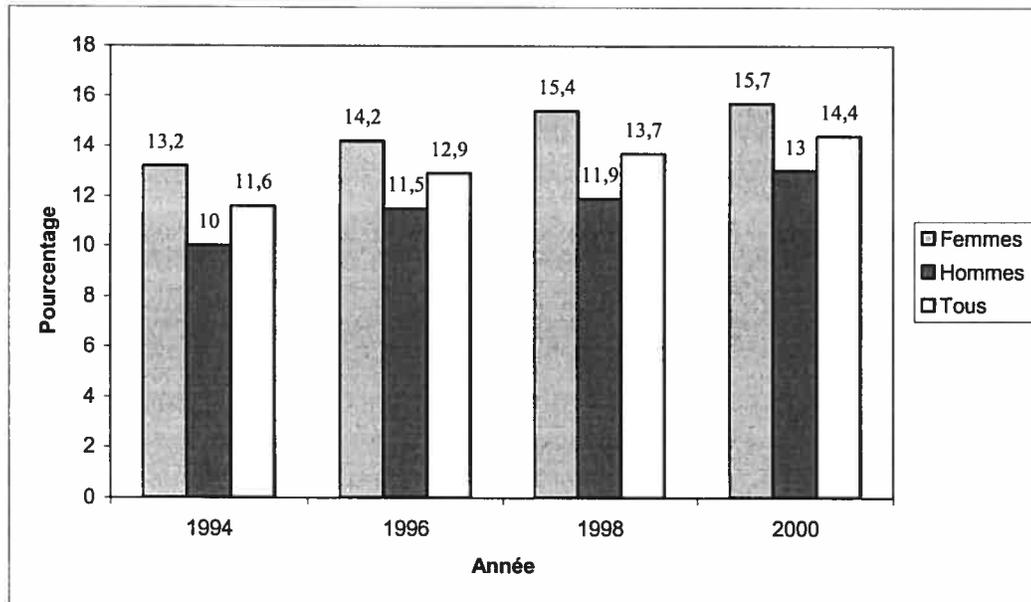


Figure 1 : **Pourcentage parmi la population générale de 20 ans et plus qui a un problème d'hypertension artérielle au Canada de 1994 à 2000.**

Source : Statistique Canada, Enquête nationale sur la santé de la population et enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes.

Le sodium et l'équilibre des fluides ainsi que le tonus vasculaire sont les pierres angulaires de la régulation de la pression artérielle. Les deux mécanismes sont sous l'influence de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. De plus, ils sont contrôlés par les hormones, le système nerveux ainsi que par des boucles d'autorégulation « bio-feedback » paracrines et intracellulaires. L'interaction entre tous ces facteurs se modifie en fonction de l'âge et de l'environnement.

Une large variété de systèmes physiologiques qui ont des effets pléiotropiques (système qui possède de multiples effets), interagit de façon complexe pour contrôler la pression artérielle. Parmi ces systèmes, on retrouve les barorécepteurs, sensibles au changement de pression dans les vaisseaux; les peptides natriurétiques produits par le cerveau et le cœur en réponse à une augmentation de pression dans ces organes ; le système rénine angiotensine (SRA) qui influence l'homéostasie du volume vasculaire ainsi que le tonus vasculaire; le système quinine-kallikrein qui affecte le tonus vasculaire et la réabsorption du sel par le rein; les récepteurs du système adrénergique qui influencent le rythme cardiaque, la contractilité cardiaque et le tonus vasculaire; ainsi que des facteurs produits par les vaisseaux sanguins qui causent une vasodilatation dans le cas de l'oxyde nitrique, ou la contraction pour celui de l'endothéline ⁽¹⁴⁾. Il existe également d'autres facteurs qui causent une vasodilatation comme par exemple l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses, qui est observé principalement dans la circulation coronaire. Tous ces systèmes agissent de façon intégrée pour assurer une perfusion adéquate de tous ces tissus en dépit d'une demande métabolique excessivement variée.

Système rénine angiotensine (SRA)

Historique de découverte du SRA

L'existence d'un système relié à la rénine fut initialement rapportée en 1898 quand Tigerstedt et Bergman ont observé qu'une préparation saline de rein de lapin, injectée par voie intraveineuse, augmentait la pression artérielle des animaux ⁽¹⁵⁾. Ils nomment le composé actif « renin ». Plus tard en 1938, Kohlstaedt *et coll.* ont démontré que cette dernière substance, à caractéristique enzymatique, était activée par une substance protéique contenue dans le plasma sanguin et les globules rouges catalysant la formation d'une substance à fort caractère vasopresseur. En 1939-1940, ce vasopresseur a été simultanément isolé par Page et Helmer ainsi que par Braun-Menendez *et coll.* qui la nomme « **angiotonine** » et « **hypertensine** » respectivement. Par la suite, la communauté scientifique a décidé de rebaptiser ce vasopresseur en fusionnant ces deux termes pour former « l'angiotensine ». La mise en place des premiers éléments du SRA a été complétée lorsqu'il a été publié que la rénine agissait de façon enzymatique sur un peptide nommé « angiotensinogène » ⁽¹⁶⁾. Par la suite, les travaux de Skeggs ⁽¹⁷⁾ ont démontré que la substance active de l'Angiotensine II (AII) était produite via l'angiotensine I (Ang I) par un enzyme de conversion. Depuis les années 40, cette cascade enzymatique était connue sous le nom du « système rénine angiotensine » dont le pilier central était l'AII. En 1945, le groupe de recherche du Dr Genest avait pour hypothèse de travail qu'il y avait deux facteurs importants impliqués dans l'hypertension essentielle : soit le SRA ainsi qu'une dysrégulation du sodium ⁽¹⁸⁾. En 1952, Tait et Simpson isolent l'aldostérone à partir d'extraits de surrénales ⁽¹⁹⁾. Après la caractérisation chimique de l'aldostérone par

Wettstein en 1953, la recherche d'un lien entre les agents vasoconstricteurs, l'aldostérone et le sel, était entreprise ⁽¹⁸⁾. C'est seulement, en octobre 1959, que le groupe du Dr Jacques Genest a fait une découverte majeure : l'Angiotensin II (AII) était le stimulant principal de la production d'aldostérone. Par la suite, ces résultats ont été confirmés au début des années 60 par Laragh ainsi que par le groupe de Davis, Ganong and Mulrow ^(20,21). Suite à cette découverte, il était possible d'intégrer le SRA, la sécrétion par les surrénales de l'aldostérone ainsi que la régulation du sodium par le rein, pour former le système « sodium-rénine-angiotensine-aldostérone ». Ce système est encore aujourd'hui au centre de nombreux projets de recherche qui tentent de clarifier les différentes interactions de ce système dans le but de mettre en valeur son rôle fondamental dans l'hypertension artérielle.

Description du SRA

L'hypertension est un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires et rénales. Le SRA joue un rôle central dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et rénales (Figure 2) mais est également impliqué dans les différentes pathophysiologies qui affectent ces deux systèmes ^(22,23,24,25). La stimulation et l'inhibition de ce système augmentent et baissent respectivement la pression artérielle, ce qui explique l'intérêt porté à chacune des composantes du SRA dans l'hypertension essentielle.

Le système SRA joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle, dans la fonction cardiaque ainsi que dans la morphologie cardiaque. Le SRA est une série de réactions enzymatiques qui se terminent par la génération de l'Angiotensin II (AII) dans le plasma, de même que dans divers tissus tels que le cœur et les reins. Après avoir été libéré par les cellules juxtaglomérulaires des artéioles afférentes rénales, la rénine agit sur

l'angiotensinogène, qui est synthétisée par le foie, pour produire le décapeptide inactif Ang I ^(26,27). Le clivage de l'angiotensinogène par la rénine est l'étape déterminante dans l'activation du SRA ⁽²⁸⁾. L'action protéolytique de l'enzyme de conversion de l'AII (ACE), qui se trouve en concentration abondante dans la circulation pulmonaire, convertit l'Ang I en un octapeptide nommé AII, qui est le médiateur central du SRA. Par la suite, l'AII agit sur ses récepteurs tels que sur le récepteur 1 de l'AII (AT₁) pour induire une vasoconstriction des cellules de muscle lisse vasculaire. De plus, l'AII contribue au développement de l'hypertrophie cardiaque ^(29,30). Cette hormone agit également sur les surrénales qui libèrent l'aldostérone et provoque une rétention de sodium. Cette rétention sodique génère une augmentation du volume plasmatique qui se traduit par un accroissement de la pression artérielle. L'AII est aussi un médiateur critique dans le mécanisme du « feedback » rénal tubuloglomérulaire ^(31,32).

Le SRA joue un rôle très important dans la régulation de la pression artérielle en aidant à contrôler l'équilibre du sodium et ainsi, le volume plasmatique (Figure 2). Par contre, le contrôle de la pression artérielle par l'aldostérone ou les mécanismes de vasoconstriction dus à l'AII sont des mécanismes relativement lents comparativement à ceux du système nerveux (8-10 minutes pour vasoconstriction et plus de 2 heures pour le contrôle du volume plasmatique (Figure 3)). Cependant, ceci ne constitue pas la seule voie par laquelle le SRA influence la pression artérielle. L'AII est un vasoconstricteur artériolaire puissant, qui augmente la résistance périphérique et par conséquent la pression artérielle. De plus, il est connu que l'AII provoque une stimulation du système nerveux sympathique pour induire la libération de la norépinéphrine et de l'épinéphrine par la médullosurrénales. Ce système est un des systèmes de contrôle de pression artérielle le plus rapide et le plus puissant ⁽³³⁾(Figure 3). Ces deux hormones ont pour effet, entre autres, d'exciter le cœur en plus d'avoir un effet vasoconstricteur. L'AII est également impliquée dans la régulation centrale de la sécrétion de la vasopressine par une stimulation

neurohypophysaire ⁽³⁴⁾. La vasopressine, qui est aussi connue sous le nom d'hormone antidiurétique, est un vasoconstricteur très puissant. Elle a un effet vasoconstricteur plus puissant que l'AII, ce qui en fait probablement l'un des plus puissants vasoconstricteurs de l'organisme ⁽³⁵⁾. Malgré cela, cette hormone est plus connue pour ces effets sur le contrôle du volume sanguin par son action sur la rétention d'eau au niveau du rein ⁽³⁵⁾. Les augmentations anormales d'activité du SRA peuvent contribuer au développement de l'hypertension artérielle par l'effet double de rétention de sodium ainsi que par la vasoconstriction artériolaire.

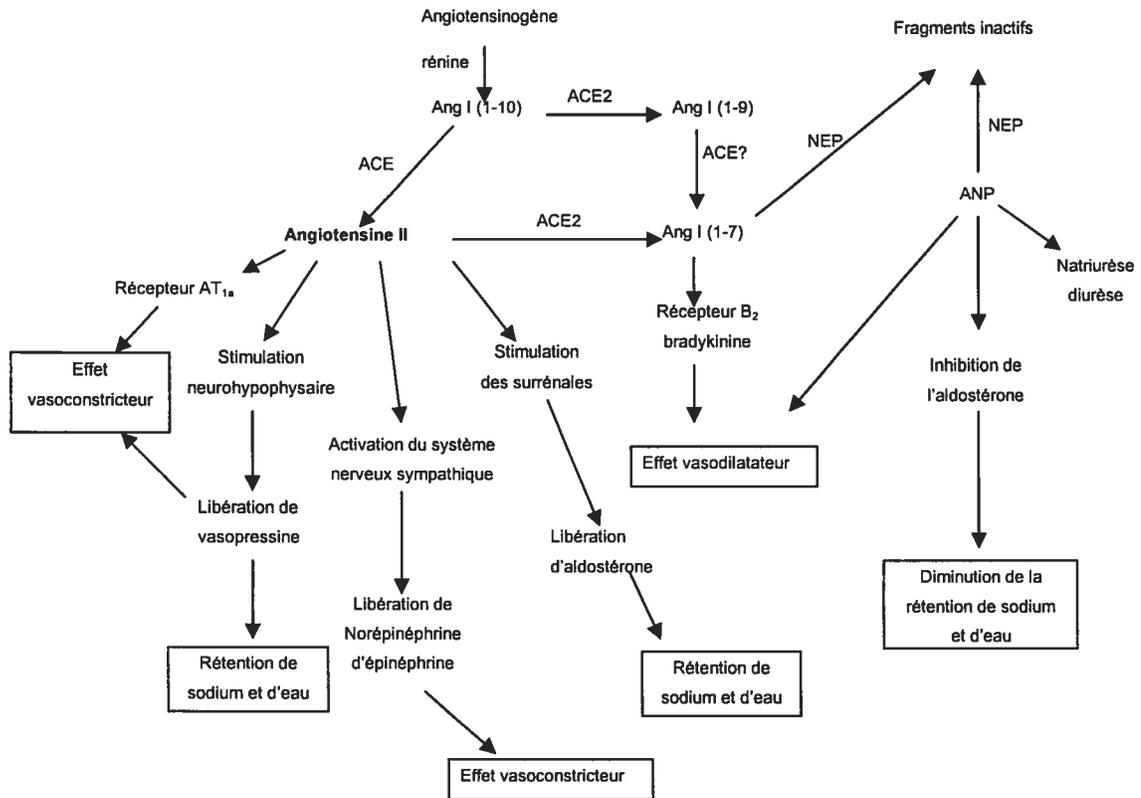


Figure 2: **Schéma représentatif des activités du SRA.** Le schéma représente l'activité du SRA ainsi que les systèmes qui contrebalancent ce dernier. Dans la partie de droite du schéma, on retrouve l'effet vasoconstricteur et l'effet de rétention de sodium et d'eau attribué à l'AII. La partie gauche du schéma représente la voie qui contrebalance les effets de l'AII par l'homologue d'ACE, ACE2. (ANP) peptide natriurétique, (NEP) endopeptidase neutre

L'AII, un octapeptide (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), exerce ses effets hypertenseurs en se fixant sur des récepteurs situés à la surface de la membrane plasmique des cellules : comme les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (effet vasoconstricteur) et les cellules du cortex de la glande surrénale (augmentation de la sécrétion d'aldostérone, une hormone impliquée dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral) (Figure 2) ⁽³⁶⁾. L'AII agit sur deux types de récepteurs : AT₁ responsable des effets cardiovasculaires de l'AII et le récepteur 2 de l'AII (AT₂) qui semble être impliqué dans le processus de maturation de certaines structures du système nerveux. De plus, il a été récemment mis en évidence que le récepteur AT₂ avait un rôle antiprolifératif causé par l'activation des mécanismes d'apoptose ^(37,38).

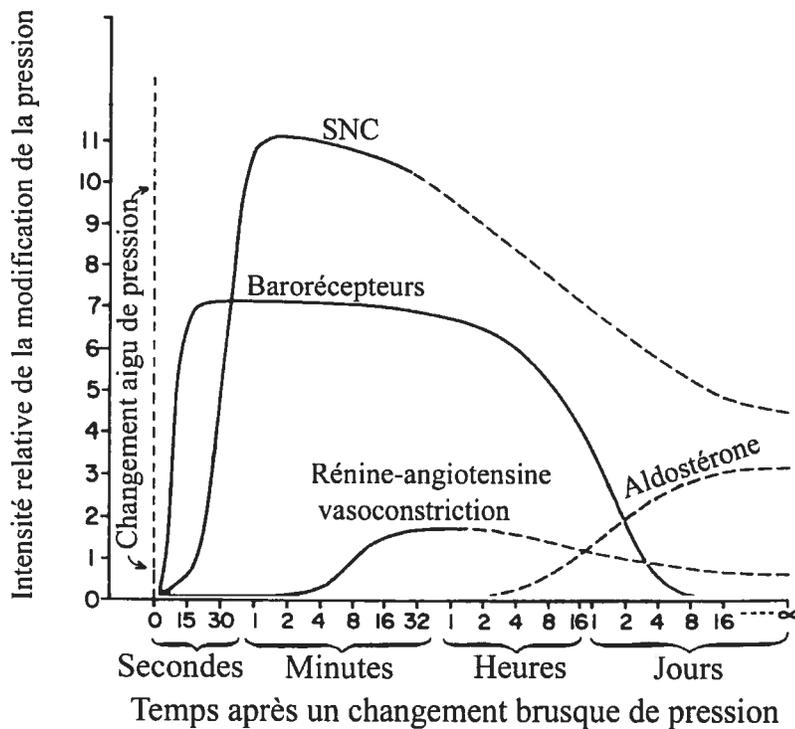


Figure 3 : **Graphique comparatif d'intensité relative de la modification de la pression artérielle en fonction du temps.** ⁽³⁹⁾ Potentiel approximatif des différents mécanismes de contrôle de la pression artérielle à différents intervalles de temps après une modification aiguë de la pression artérielle. Il est important de noter l'intensité relative et la rapidité à laquelle le système nerveux central (SNC) agit sur le contrôle de la pression artérielle.

Systèmes contrebalançant le SRA

Les augmentations anormales d'activité du SRA peuvent contribuer au développement de l'hypertension artérielle. Par contre, l'augmentation de cette activité peut être causée par le dérèglement de systèmes qui contrebalancent le SRA : par exemple,

un dérèglement au niveau du système de l'ANP ou au niveau du système de ACE2, nouvellement découvert.

L'ANP est une hormone cardiaque qui a de nombreux effets sur le rein, les surrénales, le système nerveux ainsi que sur le réseau vasculaire des différents organes. Les fonctions physiologiques de l'ANP vont à l'opposé de ceux du SRA et de la vasopressine pour contrebalancer leurs effets (Figure 2) ^(40,41,42). Il a été démontré que le couplage de l'Angiotensin II (Ang II) sur le récepteur AT₁ stimule la libération du facteur natriurétique ^(43,44). L'effet hémodynamique de l'ANP consiste à diminuer la réabsorption tubulaire du sodium et de l'eau dans le but d'avoir un effet natriurétique qui, par le fait même, diminue le volume sanguin et crée une baisse de la pression artérielle. De plus, l'ANP induit une vasodilatation ⁽⁴⁵⁾, augmente la perméabilité vasculaire et a des propriétés antimitogéniques ⁽⁴⁶⁾. L'ANP est un excellent gène candidat pour l'étude du contrôle de la pression artérielle et de nombreuses études génétiques sont conduites sur ce système. Il a été démontré que l'activité du récepteur du peptide natriurétique (Npr1) était altérée chez les SHR ⁽⁴⁷⁾. D'ailleurs, les taux d'ARNm du Npr1 suggèrent un contrôle anormal de la transcription dans le développement de l'hypertension chez les SHR ⁽⁴⁸⁾. Ces études proposent qu'un dérèglement d'un système comme celui de l'ANP contrebalançant les effets du SRA, pourrait contribuer significativement au développement de l'hypertension essentielle.

Le rôle de ACE2 dans la physiologie cardiovasculaire

Récemment, il a été démontré que le SRA était probablement beaucoup plus complexe que l'on aurait cru. La découverte récente de ACE2, l'homologue de ACE, semble réguler de façon négative le SRA. Plusieurs nouveaux aspects de ce système ont été

identifiés depuis peu. Premièrement, l'AII tissulaire pourrait être généré par un enzyme non relié à ACE. Par exemple, il semble que la chymase tissulaire génère de l'AII ⁽⁴⁹⁾. Deuxièmement, ACE peut cliver et inactiver d'autres peptides tels que la bradykinine et la kallidine qui sont des vasodilatateurs puissants contrebalançant l'effet de l'AII ⁽³²⁾. Troisièmement, ACE2 peut métaboliser différents peptides du SRA ^(50,51,52).

ACE et ACE2 sont tous deux des carboxypeptidases. Contrairement à ACE qui est largement exprimé, l'expression de ACE2 est limitée principalement aux cellules endothéliales des artères, des artérioles ainsi que des veinules du cœur et du rein ^(53,50,51) (Tableau 2). De plus, ACE2 est également exprimé dans l'épithélium tubulaire rénal, dans les cellules de muscle lisse vasculaire des artères intrarénales de même que dans les vaisseaux sanguins coronariens ⁽⁵⁰⁾. En dépit de partager plusieurs propriétés biochimiques avec ACE, ACE2 est insensible aux inhibiteurs d'ACE ^(50,51) (Tableau 2). ACE2 peut cliver l'Ang I pour générer le peptide inactif Ang-1-9 ^(50,52). Ce même peptide (Ang-1-9) peut être alors converti par ACE, ou d'autres carboxypeptidases, en Ang-1-7 qui est un vasodilatateur connu ⁽⁵⁰⁾. En outre, ACE2 peut directement métaboliser AII en Ang-1-7 ⁽⁵²⁾, dont celle-ci a pour fonction d'être un antagoniste de l'action de l'AII et un agoniste du récepteur B₂ de la bradykinin ^(54,55,56) (Figure 2).

Conséquemment, de par les actions enzymatiques de ACE2, les niveaux plasmatiques et tissulaires d'AII ont été augmentés d'un facteur 2 chez les souris mâles dont le gène ACE2 a été inactivé ⁽⁵³⁾. Cette augmentation des niveaux d'AII peut résulter d'une augmentation de la biodisponibilité de l'Ang I pour la conversion en AII par ACE ou par la réduction de l'hydrolyse de l'AII par ACE2. L'augmentation de la concentration tissulaire de l'Ang I chez les souris déficientes en ACE2 semble vraisemblablement reliée à la réduction du clivage enzymatique de l'Ang I en Ang-1-9 ⁽⁵³⁾. Le ratio constant AII/Ang I

suggère fortement que l'augmentation de la formation d'AII tissulaire chez les souris déficientes en ACE2 soit provoquée par l'augmentation de la biodisponibilité de l'Ang I converti en AII par ACE. Contrairement à l'Ang I tissulaire et cardiaque, les taux d'Ang I plasmatique n'ont pas subi d'augmentation chez les souris déficientes, ce qui a pour conséquence de provoquer une augmentation du ratio AII/Ang I plasmatique ⁽⁵³⁾. Ainsi, l'augmentation des niveaux d'AII plasmatique est probablement un résultat direct de la réduction du métabolisme de l'AII plasmatique en l'absence de ACE2. D'ailleurs, l'augmentation des niveaux d'AII tissulaire et plasmatique est perpétuelle chez les souris déficientes en ACE2, en dépit du contrôle de la boucle d'inhibition (negative feedback) due à l'augmentation de l'AII sur ACE et les autres composantes du SRA ^(57,58). En résumé, ACE2 est un antagoniste de l'effet hypertenseur, hypertrophique et pro-oxydatif de l'AII, soit via la réduction de sa synthèse (tissu) ou d'une augmentation de sa dégradation (plasma) en augmentant la formation de l'Ang-1-7.

	ACE	ACE2
pH optimal	7.5 (6-9)	6.5 (6-7.5)
Dépendance anionique	Fl ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻	Fl ⁻ , Cl ⁻ ,
Site catalytique	carboxypeptidase	carboxymonopeptidase
Nombre de sites catalytiques	2	1
Protéine membranaire*	Type I, glycoprotéine	Type I, glycoprotéine
Poids moléculaire/nombre d'acides aminés	158 kDa/1306	89,6 kDa/805
Expression tissulaire	Généralisé (cellules endothéliales)	Cœur, reins, testicules (cellules endothéliales)
Sensible au inhibiteur de ACE	oui	non
Localisation chromosomique	17q	Xp

Tableau 2: **Propriétés biochimiques des enzymes de conversion ACE et ACE2.** * les protéines de type I ont un domaine transmembranaire simple avec un résidu N-terminal et C-terminal localisé respectivement dans la partie extracellulaire et intracellulaire.

L'activité biochimique in vitro de ACE2 supporte le fait qu'il est un régulateur potentiel de l'homéostasie de la pression artérielle, de par les modulations qu'il apporte au SRA^(50,51,52). Le rôle potentiel de ACE2 dans l'hypertension essentielle est fondé sur l'étude de Crackower *et coll.* qui démontre que ACE2 est un locus à trait quantitatif (QTL) localisé sur le chromosome X de différentes souches de rats (la souche Sabra, les rats

spontanément hypertendus (SHR) ainsi que les SHR-strokeprone (SHRSP)). Dans ces modèles d'hypertension, l'ARNm ainsi que les niveaux protéiques de ACE2 étaient fortement réduits. Cette réduction des messagers et des protéines de ACE2 est associée à l'augmentation de la pression artérielle observée chez ces modèles ⁽⁵³⁾. Cependant, les souris « knock-out » pour le gène de ACE2 ne permettent pas d'élucider son implication dans l'hypertension, puisque ces souris ne démontrent pas une augmentation de la pression artérielle comparativement aux souris témoins ⁽⁵³⁾. Par contre, ces souris souffrent d'un sévère dérèglement au niveau de la contractilité myocardique ainsi qu'une augmentation des niveaux d'AII. Ces dernières études génétiques démontrent que ACE2 est un régulateur essentiel de la fonction cardiaque in vivo. De plus, la fonction et la morphologie rénales basales ne sont pas altérées par l'inactivation de ACE2. La possibilité par ACE2 d'hydrolyser plusieurs autres peptides tels que les peptides apelines, opioïdes et les métabolites des quinines, soulève l'éventualité que des systèmes autres que celui de l'angiotensine, puissent jouer un rôle de premier plan dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et rénales. Ceci confirme que ce système est plus élaboré qu'initialement défini, et que de nombreuses études seront nécessaires afin de démystifier l'implication de ACE2 dans l'hypertension essentielle.

Dans le but de tenter de mieux comprendre l'implication de ACE 2 dans l'hypertension essentielle, notre groupe de recherche a effectué récemment une étude génétique sur le locus du gène de ACE2 ⁽⁵⁹⁾. Des polymorphismes, détecté par la méthode SSCP, ont été employés pour rechercher des variantes à l'intérieur de la séquence de l'intron 16 du gène ACE2 humain chez des patients hypertendus (n= 436) et normotendu (n= 286). Ces patients proviennent de 97 familles sélectionnées à partir de la population canadienne-française du Saguenay-Lac-Saint-Jean (SLSJ). Trois variantes de polymorphisme de conformation à simple brin (SSCP) ont été identifiées dans l'intron 16 du gène, soit « a », « b », « c ». Les fréquences alléliques sont de « a » =32.5 %, « b »

=66.9 % et « c » =0.4 %. Les études d'association démontrent que l'allèle « a » est significativement surexprimée chez les patients hypertendus (HTA) comparativement aux normotendus (NORM) (49.5 % vs 39.5 %, $p= 0.008$). De plus, des analyses d'association ont été menées en fonction de l'âge de développement de l'hypertension, soit avant l'âge de 55 ans (âge<55 ans) et après 55 ans (âge>55ans). Les résultats démontrent une association plus prononcée pour l'hypertension développée après 55 ans (HTA>55 ans : 67.5 % vs NORM : 39.5 %, $p= 0.001$) que pour celle observée avant l'âge de 55ans (HTA<55 ans : 48.2 % vs NORM : 39.5 %, $p=0.01$). Les résultats de cette étude démontrent pour la première fois, chez des familles hypertendues d'origine canadienne-française, que le locus du gène de ACE2 pourrait être impliqué dans le développement de l'hypertension essentielle, plus précisément dans le développement tardif de l'hypertension (passé l'âge de 55 ans).

Tel que discuté précédemment, le SRA est un système très important dans le contrôle de la pression artérielle. Voilà pourquoi de nombreuses études biochimiques sur la structure de ces récepteurs sont conduites depuis quelques années. Le but de ces études biochimiques est de mieux caractériser les récepteurs et de tenter de mieux comprendre leur fonctionnement.

Étude des relations structure-fonction du récepteur AT₁

Les récepteurs AT₁ et AT₂ ont pu être discriminés pharmacologiquement grâce à la mise au point d'antagonistes non peptidiques ou pseudopeptidiques qui reconnaissent

spécifiquement l'un ou l'autre de ces récepteurs ^(60,61,62,63). Suite au clonage, la détermination de la structure primaire des récepteurs AT₁ et AT₂ a démontré que ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) caractérisés par une architecture à 7 domaines transmembranaires (Figure 4) ^(62,64).

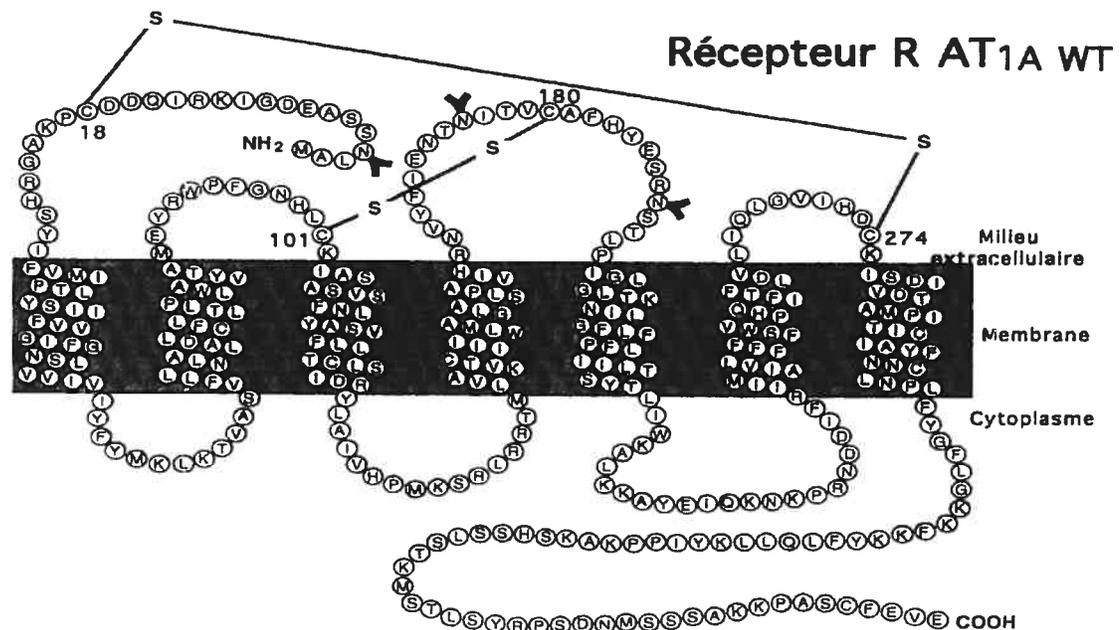


Figure 4 : **Représentation schématique du récepteur AT₁**. Le récepteur est constitué de 359 acides aminés dont la partie N-terminale est extracellulaire et C-terminale, intracellulaire. Plusieurs sites potentiels de glycosylation sont localisés sur les boucles extracellulaires : le premier site potentiel en N-terminal Asn ⁴, et deux sur la deuxième boucle extracellulaire en position Asn ¹⁷⁶ et Asn ¹⁸⁸. De plus, le domaine C-terminal porte plusieurs sites potentiels de phosphorylation par la PKC ainsi que par les (GrK) kinase des récepteurs à protéine G.

Les relations structure-fonction du récepteur AT₁ ont été étudiées de façon exhaustive. L'utilisation de la modélisation moléculaire et de la mutagenèse dirigée ont été largement utilisées pour disséquer les mécanismes de reconnaissance des ligands peptidiques et non peptidiques ^(65,66,67,68,69,70).

Chez les mammifères, deux sous-types du récepteur AT₁ ont été clonés : AT_{1a} et AT_{1b} qui sont identiques à 95 %. Le clonage du récepteur de l'AII chez le xénope et la dinde a conduit à l'identification de 2 sous-types de récepteur de l'AII qui sont identiques respectivement à 60 % et à 40 % aux deux sous-types de récepteur AT₁ de mammifères. À l'aide des études de structure-fonction, la pharmacologie du récepteur de l'AII de xénope vis-à-vis des antagonistes non peptidiques diffère de celle des récepteurs AT₁ et AT₂ de mammifères ⁽⁷¹⁾. Aucun sous-type du récepteur AT₂ n'a été rapporté jusqu'à aujourd'hui.

Plusieurs équipes de recherche s'intéressent aux études de relations structure-fonction des récepteurs de l'AII, comme celle du Dr Jacky Marie avec laquelle j'ai effectué mon stage de maîtrise. L'objectif du groupe de recherche du Dr Marie est de caractériser les mécanismes moléculaires de la reconnaissance des ligands et de l'activation des récepteurs d'hormones peptidiques. Les approches utilisées font appel à la biochimie des protéines, la modélisation moléculaire et l'ingénierie génétique ^(65,66,67).

La caractérisation des sites de reconnaissance de l'AII au niveau du récepteur AT₁ de rat (rAT_{1a}) a été abordée par une approche biochimique faisant appel au marquage covalent du récepteur. Le principe consiste à photomarquer le récepteur avec un dérivé photoactivable de l'AII (Sar¹-Phe₈(N₃)-AII) qui porte un groupement N₃ en position 8 de la molécule d'AII. Les complexes ligands récepteurs covalents sont purifiés puis fragmentés

à la trypsine et les fragments du récepteur qui portent la sonde sont caractérisés ⁽⁷²⁾. Cette technique a permis aux chercheurs du groupe de montrer que la phénylalanine 8 de l'AII interagit avec une zone du récepteur rAT₁ comprenant le 6^e domaine transmembranaire. Ces résultats ont été pris en considération pour positionner la molécule d'AII au sein d'un modèle tridimensionnel du récepteur rAT₁ élaboré par un collaborateur du groupe (Bernard Maigret, CNRS, Nancy). L'ensemble des résultats biochimiques et de mutagenèses dirigées a permis de proposer un modèle d'interaction de l'AII au sein du récepteur ⁽⁶⁶⁾.

L'équipe du Dr Marie a proposé un modèle du mécanisme moléculaire de l'activation du récepteur rAT₁ par l'AII qui a pu être validé par les expériences de mutagenèse dirigée ^(65,69). Par la suite, le même type d'expérimentation a été établi pour le récepteur humain B₂ de la bradykinine ⁽⁷³⁾ (article en annexe). Ce récepteur a plusieurs similarités notamment au niveau de l'homologie de séquence avec le rAT_{1a} ⁽⁷⁴⁾.

Mon implication dans l'équipe de recherche du Dr Marie a consisté à :

- construire des récepteurs étiquetés (fusion d'une séquence reconnue par un anticorps) dans le but de faciliter les procédés de purification des récepteurs exprimés;
- muter les sites de glycosylation du récepteur rAT_{1a} dans le but de produire une protéine non glycosylée plus facile à "manipuler" que la protéine sauvage;
- muter certains résidus du récepteur B₂ humain de la bradykinine qui peuvent être impliqués dans le mécanisme d'activation du récepteur.

Le rAT₁ est constitué de 359 acides aminés dont la partie N-terminale est extracellulaire et C-terminale intracellulaire. Le rAT₁ contient trois sites potentiels de glycosylation sur les asparagines (Asn), le premier en N-terminal en position Asn⁴, les deux autres sur la deuxième boucle extracellulaire en position Asn¹⁷⁶ et Asn¹⁸⁸ (Figure 4).

Il a été démontré précédemment qu'une mutation simple de n'importe lequel des résidus d'Asn du rAT₁ préserve la reconnaissance de l'hormone AII ainsi que l'induction de la production d'inositol triphosphate (IP₃)⁽⁷⁵⁾. Dans le travail publié dans « Biochemical Journal » (chapitre 2 de la thèse), nous présentons une analyse beaucoup plus complète du rôle des glycosylations du rAT₁.

Trois types de récepteurs étiquetés ont été construits⁽⁷⁶⁾. Des récepteurs portant une séquence peptidique (peptide de 10 acides aminés de l'oncogène c-myc) facilement reconnaissable par un anticorps monoclonal, des récepteurs possédant une séquence de 6 histidines à l'extrémité C-terminale, facilement purifiable sur colonne de nickel (Ni²⁺) et finalement des récepteurs portant les deux types d'étiquette (peptide c-myc et polyhistidines). Les propriétés de reconnaissance des récepteurs chimériques vis-à-vis l'AII ont été évaluées et les rendements d'adsorption sur colonne d'anticorps ou de Ni²⁺ ont été déterminés. La caractérisation immunohistochimique des récepteurs étiquetés avec l'épitope c-myc a été réalisée sur des cellules COS-7 transfectées avec les différentes constructions. Les sites potentiels de glycosylation du rAT_{1a} ont été mutés séquentiellement. L'incidence des mutations sur les propriétés de reconnaissance des récepteurs ainsi que sur leur niveau d'expression à la membrane plasmique des cellules a été évaluées.

Nous démontrons que ⁽⁷⁶⁾:

1. les trois sites potentiels de glycosylation du récepteur rAT₁ sont utilisés dans les cellules COS-7;
2. la suppression de ces sites n'affecte pas de façon significative la liaison du ligand ainsi que les propriétés de couplage du récepteur;
3. le rôle des différents sites de glycosylation n'est pas équivalent pour l'intégration des récepteurs dans la membrane plasmique.

Ma contribution sur le projet de la bradykinine a consisté à réaliser des mutants du récepteur B₂ de la bradykinine pour permettre au reste de l'équipe de produire une étude sur le mécanisme d'activation du récepteur B₂. Les résidus Asn¹¹³ (domaine transmembranaire III homologue de Asn¹¹¹ du rAT_{1a}) et Trp²⁵⁶ (domaine transmembranaire VI, homologue de Trp²⁵³ de rAT_{1a}) du récepteur humain B₂ de la bradykinine ont été mutés et l'incidence des mutations sur les propriétés de reconnaissance et d'expression des récepteurs a été évaluée. Cette étude qui avait pour titre « Constitutive activation of the human bradykinine B₂ receptor induced by mutations in transmembrane helices III and VI » a été publiée en 1999 dans « Molecular Pharmacology » (1 :92-101,1999). Cette publication ne fera pas l'objet d'un chapitre mais se retrouve en annexe de la thèse.

Évidence d'une composante génétique de l'hypertension

Les études familiales

Le premier rapport mentionnant que les complications cérébrovasculaires pourraient être d'ordre génétique est apparu en 1761. Dans ce rapport, Morgagni avait noté que le père d'un de ses patients, qui était mort d'une hémorragie cérébrale, était également mort d'apoplexie ⁽⁷⁷⁾. Depuis ce temps, plusieurs études de population ont démontré que l'hypertension était beaucoup plus fréquente chez des patients qui avaient un historique familial de cette maladie. Cette tendance a été nommée « agrégation familiale ». Les études les plus récentes suggèrent que les chances d'un individu âgé de moins de 55 ans de développer une hypertension sont d'environ quatre fois plus élevées lorsqu'il existe un historique familial de la maladie ^(78,79).

Bien que les études familiales aient démontré que l'hypertension fait preuve d'un fort degré d'agrégation familiale, les études n'ont pas prouvé de façon décisive que cette agrégation était génétique. Les agrégations familiales peuvent être causées autant par des facteurs environnementaux partagés, que par des facteurs génétiques. Dans le but d'identifier les composantes génétiques de l'hypertension, des études utilisant des jumeaux ont été faites. Dans ces études, les jumeaux monozygotiques et dizygotiques sont testés pour leur tendance à partager un trait particulier, qui est le principe d'héritabilité. Les jumeaux monozygotiques partagent 100 % de leurs gènes, alors que les jumeaux

dizygotiques ne partagent que 50 % de leurs gènes. Lorsqu'un trait est observé plus fréquemment chez les monozygotes que chez les dizygotes, cela suggère que cette caractéristique soit fortement génétique. Tandis que lorsqu'un trait est observé avec une fréquence quasi équivalente entre les deux groupes de jumeaux, il est impossible de conclure que ce trait est héréditaire. Souvent, on suggère que ce soit plutôt l'environnement qui est déterminant pour ce phénomène. Les études de jumeaux portant sur l'hypertension artérielle ont prouvé que l'incidence d'une pression artérielle élevée est plus fréquente chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes ⁽⁸⁰⁾. L'estimation de l'héritabilité génétique, tirée de ces études sur l'hypertension, est estimée entre 44 et 49 % ⁽⁸¹⁾.

Les études d'adoption

Une approche alternative pour identifier la composante génétique et environnementale de l'hypertension artérielle est l'utilisation des études d'adoption. Les études de ce type comparent la fréquence de la maladie entre les enfants adoptés et non adoptés partageant la même maisonnée avec leurs parents de premier degré. L'une des plus importantes études d'adoption menée sur l'hypertension a été l'enquête faite sur des familles canadiennes-françaises. Cette enquête consistait à comparer la fréquence de pression artérielle élevée chez les individus naturels et adoptés, vis-à-vis leurs parents et germains ^(82,83). Les résultats de cette étude dénotent que l'incidence de l'hypertension est approximativement deux fois supérieure chez les enfants naturels comparativement aux enfants adoptés lorsque que l'un ou l'autre des parents ou germains étaient hypertendus.

Les résultats d'études par famille et par adoption ont démontré que l'hypertension était en partie une maladie à composante génétique et environnementale. Cependant, la compréhension de la génétique de l'hypertension est un défi qui préoccupe les chercheurs depuis plusieurs décennies. Un exemple de cette préoccupation est le débat historique entre Platt et Pickering dans les années 60⁽⁸⁰⁾. Le sujet de ce débat était le mode de transmission génétique par lequel l'hypertension était transmise à travers les différentes générations de mêmes familles. L'argument de Pratt était que l'hypertension suivait un mode de transmission mendélien lorsque l'on mesurait la mort cardiovasculaire. Leur vision était que l'hypertension artérielle était un trait qualitatif qui était soit présent ou absent chez un individu. Pour sa part, Pickering soutenait que l'hypertension était de nature gaussienne lorsqu'elle était évaluée par la mesure de la pression artérielle. Il croyait que l'hypertension était un trait quantitatif existant à différents degrés chez les individus. Maintenant, nous savons que les deux hommes avaient respectivement raison. Aujourd'hui il est clairement accepté qu'il existe deux formes d'hypertension : 1) l'hypertension monogénique causée par des mutations sur un seul gène et 2) l'hypertension essentielle, la forme la plus répandue d'hypertension, causée par l'implication de plusieurs gènes.

Les formes monogéniques d'hypertension

La forme monogénique d'hypertension est une forme plutôt rare chez l'humain. Par contre, les bases génétiques de l'hypertension monogénique sont beaucoup mieux comprises^(84,85). Elles sont causées par des mutations que l'on retrouve dans un seul gène. Ces mutations ont suffisamment d'impact pour causer des modifications majeures de pression artérielle.

Hypertension rémissible par les glucocorticoïdes

L'hypertension rémissible par les glucocorticoïdes a été la première forme d'hypertension décrite ^(86,87). Cette forme d'hypertension est une forme autosomique dominante caractérisée par une surproduction d'aldostérone ainsi qu'une augmentation de l'activité minéralocorticoïde. L'aldostérone interagit avec les récepteurs minéralocorticoïdes des cellules de tubule rénal et produit une augmentation de l'activité des canaux sodiques épithéliaux. Cette augmentation d'activité a pour conséquence d'augmenter la rétention d'eau et de sodium et par ricochet, d'augmenter la pression artérielle. Chez les individus souffrant d'hypertension rémissible par les glucocorticoïdes, la production d'aldostérone est sous contrôle de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) plutôt que l'Angiotensin II (AII). La cause exacte de cette forme d'hypertension est attribuée à une recombinaison homologue inégale entre le gène de l'aldostérone synthétase (AS) et celui du stéroïde 11 β -hydroxylase (11 β OH) qui sont voisins chromosomiques. Ces deux enzymes sont impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes de la surrénale. La recombinaison chromosomique produit un gène hybride qui contient la séquence codante de l'AS fusionnée à la partie 5' régulatrice du stéroïde 11 β OH qui permet d'être régulée par l'ACTH ^(88,89). Étant sous contrôle de l'ACTH, il résulte d'une surproduction d'aldostérone par le cortex surrénalien qui a pour conséquence une augmentation de la réabsorption de sel et d'eau qui mène directement au développement de l'hypertension.

Syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïde

Le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïde est une maladie génétique autosomale récessive caractérisée par un niveau anormalement élevé de cortisol. Le

cortisol est capable de stimuler les récepteurs minéralocorticoïdes rénaux, mais est plutôt converti en cortisone, qui lui, est incapable de stimuler les récepteurs rénaux. La conversion du cortisol en cortisone est effectuée par l'enzyme 11β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11β HSD). Des mutations simples dans le gène de ce dernier ont prouvé qu'il était responsable de la baisse d'activité de l'enzyme et de l'augmentation de la stimulation des récepteurs minéralocorticoïdes, par le cortisol, qui mènent à l'hypertension ⁽⁹⁰⁾.

Syndrome de Liddle

Ce syndrome autosomal dominant est causé par un défaut dans la réabsorption du sodium. Les individus souffrant du syndrome de Liddle ont une activité constitutive de leurs canaux sodiques épithéliaux (ENaC). Ceci a pour conséquence d'augmenter la réabsorption du sodium et ainsi d'augmenter la pression artérielle. Deux types de mutation dans le gène des sous-unités β et γ du canal à sodium épithélial sont responsables de ce syndrome. Une délétion du gène produit une forme tronquée du canal au niveau de la partie cytoplasmique en C-terminale, alors qu'une insertion dans le même gène en modifie sa séquence en acides aminés. Ces deux types de mutation augmentent l'activité du canal et causent l'hypertension observée dans ce syndrome ^(91,92).

Les mécanismes génétiques des formes monogéniques d'hypertension décrits ci-dessus sont les mieux compris actuellement. Depuis la dernière décennie, des progrès phénoménaux ont été apportés par la génomique de haut débit ainsi que par la protéomique. Ces disciplines permettent d'analyser une grande quantité d'échantillons en peu de temps. Cet avancement technologique a conduit à la découverte de plusieurs gènes responsables de

formes mendéliennes d'hypertension ou d'hypotension (Tableau 3) ⁽¹⁴⁾. Il existe d'autres syndromes d'hypertension monogénique tels que le syndrome de Gordon, l'hypertension causée par un phéochromocytome, les pseudohermaphrodites mâles et femelles etc. Par contre, les causes directes de ces syndromes sont encore au stade de recherche et les informations préliminaires concernant les gènes responsables de ces syndromes sont résumées dans un article de Hamet *et coll.* ⁽⁸⁵⁾. Cependant, les désordres monogéniques de régulation de la pression artérielle sont rares et ils n'expliquent pas la variabilité de la pression artérielle dans la population en général ⁽⁹³⁾.

Syndrome	Phénotype	Mutation	Mécanisme
Aldostéronisme rémissible par les glucocorticoïdes (GRA)	HTA, sérum K ⁺ ↓, alkalose, PRA ↓, aldostérone réprimé par dexamétasone	Gène chimérique qui contient la région du promoteur de AS et la région codante de 11βOH (dominant)	Enzyme chimérique est régulée par l'ACTH
Excès apparent de minéralocorticoïde	HTA, aldostérone ↓, sérum K ⁺ ↓, alkalose, PRA ↓, réprimée par spironolactone	Absence de 11βHSD (récessive)	Défaillance de la conversion du cortisol (active MR) en cortisone (inactive MR)
Hypertension exacerbée par la grossesse	HTA accélérée durant la grossesse, PRA ↓	Mutation non sens du MR (dominant)	Stéroïde sans le groupement 21-hydroxyl (progestérone) et spironolactone stimulent les récepteurs mutants MR.
Pseudohypoaldostéronisme dominant de type 1 (PHA-1)	BP ↓, aldostérone ↑, perte de sel néonatal, sérum K ⁺ ↑, acidose, phénotype rénal disparaît à l'âge adulte	MR mutant (normalement dominant, mais une variante récessive a été identifiée)	L'homéostasie normale du sel, nécessite, très tôt dans la vie, deux copies normales de MR

Pseudohypoaldostéronisme récessif de type 1 (PHA-1)	BP ↓, aldostérone ↑, perte de sel néonatal, sérum K ⁺ ↑, acidose, phénotype rénal ne s'améliore pas avec l'âge, défaillance respiratoire	Mutation des sous-unités α, β, ou γ de ENaC (récessif)	Perte de fonction de ENaC
Pseudohypoaldostéronisme de type 2 (PHA-2)	HTA, sérum K ⁺ ↑, PRA ↓, fonction rénale normale	Au moins une mutation dans les 3 gènes suivants localisés aux positions 1q31-42, 12p13 et 17p11-q21 (dominant)	HTA volumique, probablement causée par une augmentation de la réabsorption du sodium par le tubule rénal
Syndrome de Liddle	HTA en bas âge, aldostérone ↓, sérum K ⁺ ↓, alkalose, PRA ↓	Mutation de la sous-unité β ou γ du ENaC (dominant)	Augmentation de l'activité ENaC causée par une réduction de la clearance de ENaC
Hypertension avec brachydactylie	HTA sévère, développement anormal du squelette au niveau des mains, apoplexie	Mutations localisées sur le chromosome 12 en position 12p11, 2-12,2 (dominant)	Inconnu
PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor gamma)	HTA associé à la résistance à l'insuline ou au diabète, répond aux thiazolidinediones	Mutation non sens (dominant)	Désensibilisation du récepteur PPARγ
Synthèse déficiente d'aldostérone	BP ↓, aldostérone ↓, perte Na ⁺ , rétention de K ⁺	Déficience en aldostérone synthétase ou 21 hydroxylase (récessive)	Déficience en aldostérone
Syndrome de Gitelman	BP ↓, sérum Mg ²⁺ ↓, sérum K ⁺ ↓, alkalose, hypocalciurie, PRA ↑, aldostérone ↑	Mutation du co-transporteur NaCl sensible au thiazide au niveau du conduit du collecteur distal (récessif)	Perte de fonction

Syndrome de Bartter	BP ↓, sérum K ⁺ ↓, alkalose, hypercalciurie, PRA ↑, aldostérone ↑	Mutation des transporteurs ioniques de la branche ascendante de Henle : Na ⁺ K ⁺ , 2Cl ⁻ , canaux potassiques sensible à l'ATP ou canaux de Cl ⁻ (récessif)	Perte de fonction
---------------------	--	---	-------------------

Tableau 3 : Les différentes formes mendéliennes de dérèglement de la pression artérielle

AS= aldostérone synthétase, BP= pression artérielle, ENaC= canal à sodium épithélial, 11βOH= 11β-Hydroxylase, 11βHSD= 11β-Hydroxystéroïde déshydrogénase, HTA= hypertension, MR= récepteur des minéralocorticoïdes, PRA= activité de la rénine plasmatique

La variabilité phénotypique des syndromes monogéniques d'hypertension

Bien que la cause de l'hypertension monogénique soit généralement attribuable à une défaillance au niveau d'un seul gène, il est courant d'observer des individus qui ont la même défaillance génétique, mais qui ont des sévérités différentes de la même maladie ⁽⁸⁴⁾ ⁽⁸⁵⁾. Ce phénomène est connu sous le nom de maladie à « pénétrance variable ». Plusieurs facteurs ont été proposés pour tenter d'expliquer cette inconsistance entre les génotypes et les phénotypes. Les facteurs environnementaux tels que l'ingestion de sel et les habitudes alimentaires ont été proposés comme des facteurs pouvant avoir une influence sur l'activité et l'expression des gènes responsables du développement de certains syndromes d'hypertension monogénique. L'hétérogénéité des locus est un autre facteur pouvant être

responsable de ce genre de pénétrance variable, dont son implication a été démontrée dans le syndrome de Gordon ⁽⁹⁴⁾. Un facteur très important dans la pénétrance variable semble être la variabilité allélique (plusieurs allèles du même gène provoquent le même phénotype). Par exemple, différentes mutations dans le gène qui code pour la 11 β -HSD peuvent causer le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïde ^(90,95). Certaines de ces mutations sont associées avec des activités enzymatiques variables, donc avec des pénétrances variables du syndrome. En plus des allèles qui peuvent provoquer des formes moins sévères d'hypertension, d'autres allèles, qui peuvent occasionner une hypotension, ont été identifiés. Des mutations trouvées dans le gène des sous-unités du canal à sodium épithélial, le même canal qui est muté dans le syndrome de Liddle, peuvent causer une forme autosomale récessive d'hypotension connue sous le nom de pseudohypoaldostéronisme de type 1 ⁽⁹⁶⁾. Alors, une pénétrance variable peut être générée chez un individu par un effet combinatoire de différents types d'allèles. Par exemple, une personne peut être porteuse d'une copie d'allèle responsable d'un effet hypertenseur ainsi qu'une copie d'allèle à effet hypotenseur. La résultante de l'expression du phénotype est directement affectée par la somme des allèles ⁽⁸⁴⁾.

Hypertension essentielle

La vaste majorité des cas d'hypertension compte pour une hypertension dite essentielle. Dans les pays industrialisés, l'hypertension essentielle affecte de 25-30 % de la population adulte, et jusqu'à 60-70 % de la population âgée de plus de 70 ans ⁽¹³⁾. Cependant, contrairement aux formes monogéniques d'hypertension, les mécanismes génétiques sous-jacents de l'hypertension essentielle sont, de loin, beaucoup moins

compris. L'hypertension essentielle est considérée comme un trait complexe, car elle démontre une agrégation familiale sans modèle clair de transmission mendélienne. Plusieurs facteurs peuvent contribuer au modèle complexe d'hérédité de l'hypertension essentielle. Premièrement, il est accepté de façon générale que l'hypertension essentielle est causée par l'interaction de plusieurs gènes, et est alors dite de type maladie polygénique. Deuxièmement, l'hypertension essentielle peut être causée par l'interaction de quelques gènes majeurs ou de plusieurs gènes mineurs. Troisièmement, l'hypertension essentielle peut-être causée par différentes combinaisons de gènes, une condition dite d'hétérogénéité génétique. Pour terminer, l'hypertension essentielle est une maladie qui est influencée de façon significative autant par des facteurs environnementaux que des facteurs génétiques, ce qui en fait un défi de taille pour la communauté scientifique qui cherche à comprendre et trouver les causes potentielles de cette maladie.

Interaction gène-environnement

Bien que l'hypertension essentielle soit une maladie génétique, elle est également significativement influencée par des facteurs environnementaux. La composante environnementale de l'hypertension essentielle oscille entre 30 et 60 % ⁽⁷⁸⁾. Dans les maladies complexes telles que l'hypertension essentielle, l'environnement ne produit pas uniquement des effets indépendants additifs aux facteurs génétiques ^(97,98). Il interagit plutôt avec les facteurs génétiques pour déterminer les conséquences mêmes de la maladie car l'effet des variations alléliques des gènes, en général, dépend de l'environnement dans lequel les gènes sont exprimés. Par exemple, des individus qui ont une prédisposition génétique à une hypertension sensible au sel manifesteront différents degrés d'hypertension

s'ils bénéficient d'une diète à forte ou faible teneur en sodium. Plusieurs facteurs environnementaux sont connus pour participer au développement de l'hypertension essentielle et plusieurs gènes candidats en sont associés. Ces gènes candidats sont également appelés gènes à susceptibilité environnementale.

Parmi les facteurs environnementaux les plus connus qui contribuent à l'hypertension essentielle, on retrouve le stress, l'apport en calorie et le sel. Il a été fréquemment démontré que les individus qui avaient un historique familial d'hypertension, exhibaient une plus grande augmentation de pression artérielle lorsqu'ils étaient soumis à un stress mental ou physique comparativement aux sujets normotendus⁽⁹⁹⁾. Plusieurs gènes candidats ont été suggérés comme étant responsable de l'effet du stress dans l'hypertension^(100,101,85), entre autres la protéine de choc thermique de 27 kDa (Hsp27), Hsp70 et TNF- α ^(97,98,102,103). Il a été démontré chez les souris qu'une exposition chronique à une température ambiante de 40°C pendant 5 minutes diminuait la pression artérielle de celles-ci de plus de 20 mm de Hg⁽¹⁰⁴⁾. Dans les faits, après 35 jours de traitement thermique, la pression basale des souris hypertendues était identique à celles qui étaient normotendues^(104,105). La diète à forte teneur en sel est reconnue depuis longtemps comme un facteur environnemental dans le développement de l'hypertension essentielle. Il est maintenant reconnu que la prévalence de l'hypertension est plus faible dans les sociétés primitives qui ont une faible consommation de sodium^(106,107). Des études ont démontré que des animaux maintenus sous une diète à faible teneur en sodium développaient une hypertension artérielle lorsqu'ils étaient transférés à une diète à forte teneur en sel. Par contre, les humains hypertendus et normotendus sont soit sensibles ou résistants à l'augmentation de la pression artérielle causée par le sel⁽¹⁰⁸⁾. En revanche, cette sensibilité de la pression artérielle pour le sel peut être également dépendante d'autres facteurs environnementaux tels que le stress, la consommation d'alcool ainsi que d'autres ions acquis par la diète alimentaire⁽¹⁰⁹⁾. L'obésité est non moins reconnue comme un facteur

environnemental qui influence la susceptibilité de développer une hypertension essentielle ^(85,103). Des études de populations ont démontré qu'il y avait une corrélation significative entre le poids corporel et la pression artérielle ^(110,111,112). Ces études ont aussi révélé que la diminution du poids corporel avait pour conséquence une baisse significative de la pression artérielle. Plusieurs gènes candidats sont avancés pour contribuer à ce phénomène complexe qu'est l'obésité. Entre autres, la leptine a été suggérée comme étant un lien possible entre l'obésité et l'hypertension, puisqu'une infusion chronique de leptine chez les rats provoque une augmentation de la pression artérielle ^(113,114,115). De plus, il a été démontré que la leptine avait un effet direct sur le poids corporel ainsi que sur la distribution de la masse adipeuse ^(116,117) (Deslauriers, B. article soumis, chapitre 4). Un autre gène candidat important est le TNF- α qui a été proposé, entre autres, comme étant responsable de la résistance à l'insuline que l'on retrouve chez les hypertendus. D'ailleurs, les résultats des études de liaison et d'association effectuées sur des familles hypertendues d'origine canadienne-française suggèrent que le locus du gène de TNF- α contribue au développement de l'obésité et de l'obésité associée à l'hypertension ⁽¹¹⁸⁾. Notre groupe a également démontré une interaction gène-environnement entre le gène de TNF- α de rat et l'apport énergétique ⁽¹¹⁹⁾. Lorsque l'on transfère un segment du chromosome 20 d'un rat normotendu (qui contient le gène de TNF- α) sur un génome de rat spontanément hypertendu, on remarque une augmentation de l'adiposité, des taux circulants de leptine ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle. Cependant, ces variables sont augmentées de façon significative seulement lorsque l'animal est soumis à une diète à forte teneur en gras.

On sait maintenant que la plupart des gènes à susceptibilité environnementale n'ont pas un rôle étiologique primaire dans la prédisposition à la maladie, mais agissent plutôt comme des modificateurs dans la réponse à des facteurs exogènes comme ceux mentionnés ci-dessus. Une meilleure caractérisation des interactions entre facteurs génétiques et

environnementaux constitue un élément clé dans la compréhension de la pathogenèse des maladies multifactorielles telle que l'hypertension essentielle.

Description d'outils d'analyse génétique pour l'étude de l'hypertension essentielle

Analyse de liaison génétique

La liaison génétique est une méthode de cartographie génétique fréquemment utilisée. Cette technique fait appel à la notion de distance génétique qui est un paramètre déterminé par la fréquence des recombinaisons méiotiques ou « cross-over ». Les recombinaisons sont des événements strictement aléatoires et imprévisibles. Elles obéissent néanmoins à une loi statistique : la probabilité de recombinaison entre deux locus dépend directement de la distance physique qui les sépare. Plus cette distance est grande, plus les chances de recombinaison augmentent. Inversement, plus les locus sont rapprochés plus les chances de recombinaison sont faibles. On dit alors que ces locus sont génétiquement liés. Le but de l'utilisation de cette technique dans la recherche des gènes des maladies telles que l'hypertension essentielle, est de pouvoir identifier des marqueurs situés à proximité d'un locus susceptible de causer la maladie qui « coségrèguera » seulement chez les individus affectés. Lorsqu'un marqueur coségrègue avec une maladie,

le marqueur est considéré lié à la maladie. Cette liaison n'est mesurable que par une observation empirique : la coségrégation au cours des générations successives sans changement de phase. Il faut donc procéder à une analyse familiale au cours de laquelle on examine le couplage des marqueurs sur le même chromosome. Une première exigence est que les locus alléliques doivent pouvoir être distingués, par exemple par un marqueur génotypique ou un marqueur phénotypique, comme un trait pathologique. Une seconde exigence est que le nombre d'événements pouvant donner lieu à une recombinaison, c'est-à-dire le nombre de méioses, soit suffisant pour permettre à l'analyse statistique d'être significative. Les liaisons génétiques sont souvent mesurées en terme de « lod score », qui est le logarithme de la distance entre le marqueur et le locus de la maladie (θ). Généralement un « lod score » de 3 (1000 :1) indique une probabilité de 95 % de liaison entre les locus ^(120,121).

Pour distinguer les locus entre individus, des marqueurs génotypiques ou polymorphismes sont utilisés. Les deux types de polymorphisme les plus fréquemment employés dans les études de liaison génétique sont les polymorphismes de restriction (RFLP) ainsi que les polymorphismes à nombre de répétitions variables (VNTR variable number tandem repeat). Les RFLP sont des modifications d'une seule base ou d'une insertion/délétion de plusieurs bases azotées à l'intérieur même d'un site de restriction enzymatique. Cette modification a pour conséquence d'altérer le patron de digestion d'un fragment d'ADN donné. Ces différences de digestion sont ensuite exploitées comme marqueurs génotypiques entre les individus pour un locus précis. Le deuxième type de polymorphisme fréquemment utilisé est le VNTR. Les VNTR sont des séquences d'ADN qui sont répétées de façon variable entre les individus. Les VNTR peuvent être de différentes longueurs (microsatellite, minisatellite), et leur différence peut être évaluée par PCR et par électrophorèse sur des échantillons d'ADN isolés à partir de prélèvement sanguin. Les microsatellites sont les polymorphismes les plus employés dans les études

génétiqes à cause entre autres, de leur caractéristique multiallélique, qui en font des marqueurs très polymorphiques. De plus, ces polymorphismes sont communs dans les génomes en général, que ce soit dans le génome humain ou les génomes des autres organismes. Plus de 10 000 microsatellites distribués dans le génome humain ont été identifiés, caractérisés et positionnés. Cependant, ce sont les « Single nucleotide polymorphisms » (SNPs) qui sont les variations génétiques les plus communes. Plus de deux millions de SNPs sont présentement documentés ⁽¹²²⁾. Voilà pourquoi les SNPs sont reconnus comme étant les marqueurs idéals pour les études génétiques des maladies complexes. De plus, avec l'avènement de la bioinformatique, des techniques de haut débit, tels que les puces à ADN, ont été développées pour permettre de détecter des milliers de SNPs de façons extrêmement rapides ^(123,124). Les SNPs sont définitivement les marqueurs génétiques de l'avenir.

Les méthodes alternatives d'analyse de liaison génétique « non paramétrique»

L'utilisation des études de liaison est généralement beaucoup plus utile pour l'étude de maladies monogéniques tout comme les syndromes d'hypertension monogénique. Dans de telles études, un modèle de transmission génétique de Mendel (modèle paramétrique) peut être testé en suivant la transmission du gène causal dans des familles affectées par la maladie. Comme l'effet du gène est soit présent ou absent chez les membres de la famille, la coségrégation de l'allèle qui cause la maladie peut être détectée de façon relativement simple. Par contre, les études de liaison sont un peu moins utiles pour l'étude des maladies polygéniques multifactorielles telles que l'hypertension essentielle, qui résulte de l'effet et

de l'interaction de plusieurs gènes et de l'environnement. Puisque la contribution des gènes est plus faible, les allèles susceptibles de la maladie sont beaucoup plus difficiles à détecter par analyse de liaison. Pour tenter de détecter les gènes susceptibles de contribuer au développement de l'hypertension essentielle par liaison génétique, des méthodes alternatives de liaison ont été développées et employées. Ces méthodes de liaison génétique sont dites « non paramétriques » puisqu'elles ne reposent sur aucun modèle de transmission héréditaire. Deux grandes catégories d'analyse alternative sont utilisées dans les études génétiques des maladies complexes, soit les études d'association ainsi que la méthode d'étude de partage d'allèles.

Les méthodes de partage d'allèles représentent une méthode de liaison alternative intéressante qui recherche des différences dans la fréquence allélique des familles dont certains membres sont affectés par la maladie étudiée. Les trois principaux types de partage allélique sont : les analyses par paires de germains affectés, par paires de germains discordants ainsi que les analyses par famille étendue.

Les analyses par paires de germains affectés mesurent le degré de partage allélique de deux germains, tous deux affectés par la maladie étudiée. Normalement, la probabilité des germains de partager l'allèle de n'importe quel gène est de 50 %. Lorsque les germains partagent un allèle de façon plus fréquente que 50%, il est mentionné qu'il y a « excès » de partage allélique. L'allèle partagé de façon « excessive » peut servir de marqueur pour la maladie ou tout simplement être lui-même un gène susceptible de causer la maladie. Les paires de germains affectés sont considérées comme étant identiques par descendance (IBD) lorsque l'allèle partagé est hérité par les mêmes parents, et identiques par état (IBS) lorsque l'origine de l'allèle partagé est inconnue ^(121,120).

Les analyses par paires de germains discordants examinent la fréquence allélique d'une paire de germains qui comprend un membre affecté et un membre non affecté de la maladie. Dans ce genre d'analyse, l'allèle présent seulement chez le germain affecté est considéré comme étant relié au gène susceptible de causer la maladie. L'avantage de cette méthode utilisant des paires de germains discordants est la réduction importante du nombre de paires nécessaires (10-40 fois moins) pour détecter une liaison. Par contre, le désavantage relatif est le recrutement de sujets discordants pouvant être plus long et laborieux.

Les études par analyse de famille étendue sont similaires aux analyses de paires de germains affectés, sauf que l'excès du partage allélique est mesuré entre un individu affecté et une parenté du second degré (oncle, tante, cousin) affectée par la maladie. Cette méthode augmente grandement la puissance de l'analyse et réduit énormément le nombre de sujets requis ⁽¹²¹⁾.

Les études d'association sont une alternative aux analyses de liaison génétique qui consistent à comparer la fréquence allélique entre deux personnes non reliées, soit une affectée et une non affectée par la maladie. Si un allèle se retrouve plus souvent chez un individu affecté par la maladie que chez un individu non affecté, l'allèle est alors proclamé comme étant en déséquilibre de liaison avec l'allèle susceptible de causer la maladie. Le terme déséquilibre de liaison représente une association allélique maintenue par une liaison sévère. Un déséquilibre de liaison se produit quand l'allèle d'un marqueur est tellement près de l'allèle susceptible qu'aucune recombinaison n'est effectuée entre les deux allèles au cours des générations. Il est préférable d'utiliser le déséquilibre de liaison dans le but de faire de la cartographie à haute résolution, car le déséquilibre de liaison est rarement

observé à plus de 1 cM du locus susceptible. De ce fait, la détection d'un déséquilibre de liaison restreint de beaucoup les régions candidates de susceptibilité.

Les études d'association sont plutôt des études cas/témoins basées sur la comparaison de sujets non reliés/non affectés versus affectés. Un allèle A dans un gène d'intérêt est associé avec le phénotype s'il se retrouve à fréquence plus élevée chez les affectés comparativement au témoin. Le choix du témoin doit être fait avec beaucoup de soin puisqu'un mauvais choix peut mener à des résultats erronés. Par exemple, pour les études d'association entre une variante de l'angiotensinogène et l'hypertension essentielle chez les Blancs, on retrouve environ 50 % des études qui démontrent une association et l'autre moitié ne détecte aucune association ⁽¹²⁵⁾. Ces résultats discordants sont causés par une mauvaise sélection, définition et/ou caractérisation des populations affectées, et des populations témoins. Pour l'hypertension artérielle, il est primordial d'exiger un historique d'hypertension familiale dans la population affectée afin d'être assuré que les sujets hypertendus souffrent d'une hypertension génétique. De façon encore plus importante, un historique négatif d'hypertension familiale dans la population témoin doit être rapporté. De plus, les deux populations doivent avoir les mêmes caractéristiques. Par exemple, une population témoin plus jeune et moins obèse que la population affectée, peut quand même développer une hypertension essentielle lorsque ceux-ci vieilliront et augmenteront la sévérité de leur obésité, surtout s'ils possèdent un historique d'hypertension familiale. Or, de mauvaises classifications de sujets peuvent diluer grandement une association potentielle et même masquer la réalité.

L'approche par gène candidat

L'approche par gène candidat est une technique de cartographie génétique qui est basée sur les antécédents du fonctionnement d'une protéine codée par un gène. L'approche par gène candidat est normalement utilisée pour étudier les gènes des systèmes à composantes biochimiques ou physiologiques qui semblent être défectueux dans l'expression de la maladie. Le gène est dit gène candidat s'il est considéré comme étant responsable ou impliqué dans le processus de la maladie. Le gène candidat est analysé par l'utilisation des différentes techniques de liaison ou d'association entre des sujets affectés et des sujets normaux à l'aide de polymorphismes. Il existe deux façons de procéder avec l'approche par gène candidat : soit l'approche d'un candidat positionnel ou l'approche d'un candidat dit indépendant. L'approche d'un candidat positionnel consiste à choisir le gène candidat par sa localisation chromosomique ainsi que pour sa fonction biologique. Cette information chromosomique est généralement obtenue à partir d'autres études de cartographie génétique. Un marqueur polymorphique est utilisé directement dans la région du gène candidat pour évaluer et déterminer si un allèle distinctif du polymorphisme subit une coségrégation avec la maladie. Dans l'approche par gène candidat dit indépendant, le gène candidat est sélectionné uniquement pour sa fonction biologique sans pour autant avoir d'idée de sa position chromosomique. Peu importe l'approche employé, des sujets affectés et témoins sont examinés par la recherche de polymorphismes afin de déterminer si le gène candidat proposé démontre une variation allélique qui peut justifier sa liaison avec la maladie.

L'utilisation de l'approche par gène candidat dans le but d'identifier des gènes susceptibles au développement de l'hypertension essentielle a connu un certain succès dans

les modèles animaux. Les différentes études effectuées par l'approche du gène candidat pour la pathologie de l'hypertension artérielle chez les rats ont généralement été concentrées sur les composantes du SRA ^(126,127). Beaucoup d'autres gènes candidats ont été étudiés au sein des différentes souches de rats. En revanche, cette approche a été utilisée pour souligner le rôle du gène de α -adducine dans l'hypertension essentielle ⁽¹²⁸⁾. Étant donné que cette approche a connu de nombreux succès chez les modèles animaux hypertendus, nous avons choisi de l'utiliser pour tenter de découvrir les gènes responsables du développement de l'hypertension artérielle et de l'obésité dans une population du SLSJ. Il est important de mentionner qu'il existe d'autres approches pour effectuer des études de liaison telle que le scan total du génome ainsi que des testes de déséquilibres de liaisons par haplotypes. Ces techniques ne sont pas décrites dans cet ouvrage, puisqu'ils n'ont pas été utilisés par l'auteur.

Population canadienne-française de la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean (SLSJ).

La région du SLSJ est l'une des dix-neuf régions administratives de la province de Québec au Canada. Sa superficie est de 107 000 km² pour une population de 285 000 habitants. Chicoutimi, la ville principale de cette région (65 000 habitants) est située à 450 km au nord-est de Montréal, au bord du Lac Saint-Jean et de la rivière Saguenay qui se jette dans l'embouchure du fleuve Saint-Laurent. La population est presque exclusivement d'origine française. Les premières implantations au Québec remontent au XVII^{ième} siècle, et les descendants actuels se situent, en moyenne, entre les huitièmes et douzièmes générations.

La relative faiblesse du nombre d'immigrants historiques, l'isolement géographique pendant deux siècles, une forte natalité, et un apparentement à partir du deuxième degré, expliquent la fréquence des affections génétiques dans une population pouvant encore être considérée comme un isolat relatif. Ces éléments en font donc une population de choix pour les études des maladies génétiques. Pour la réalisation des travaux publiés dans cette thèse, nous avons utilisé cette population avec l'approbation du Dr Bouchard dans le cadre d'un projet de recherche concernant l'étude génétique de maladies complexes telles que l'hypertension et l'obésité.

Présentation du projet BALSAC

Le fichier de population BALSAC est une banque de données informatisées comportant divers registres de cette population. BALSAC permet donc la construction automatique des histoires familiales et des généalogies ascendantes ou descendantes⁽¹²⁹⁾. À partir de ces données, les chercheurs ont mis au point un système de reconstitution automatique des familles qui a été utilisé pour jumeler les 660 000 actes de baptême, mariage et sépulture de la région du Saguenay pour la période 1842-1971. L'objectif à terme est de répertorier l'ensemble de la population du Québec depuis le début du peuplement au XVII^e siècle jusqu'à la période actuelle. Le fichier réseau BALSAC contient à ce jour 1,5 million d'actes divers de l'état civil (mariage, naissance, etc.). D'ici une dizaine d'années, il devrait couvrir toute la population du Québec depuis les débuts du

peuplement au XVII^e siècle jusqu'à nos jours (la collecte se limitant aux actes de mariage pour les régions autres que le Saguenay et Charlevoix).

Les travaux de construction du fichier ont commencé en 1972. Ils ont été complétés en 1986 pour la région du SLSJ. Le directeur et initiateur du projet BALSAC est le professeur Gérard Bouchard de l'Université du Québec à Chicoutimi. Les travaux qu'il a dirigés et effectués à ce titre lui ont valu une reconnaissance internationale ainsi que divers prix prestigieux.

Historique et formation de la population

Formation de la population de Charlevoix

Dans le cadre de l'historique de la population du SLSJ, il est nécessaire de s'intéresser au mode de formation de la population de Charlevoix. Il y a au moins deux raisons de s'intéresser au mode de formation de la population de Charlevoix. La première tient au fait que la population de cette région fut à l'origine du peuplement initial du Saguenay au milieu du XIX^e siècle ⁽¹³⁰⁾. La seconde est liée à l'existence de maladies héréditaires communes et spécifiques aux deux régions ⁽¹³¹⁾. Tout indique qu'il faut remonter à l'histoire de la population de Charlevoix pour comprendre la situation qui prévaut aujourd'hui au Saguenay.

La région de Charlevoix est située sur la rive nord du fleuve Saint-Laurent, à quelque 100 kilomètres au nord-est de la ville de Québec, dans le prolongement de Côte-de-Beaupré (Figure 5). La région couvre une superficie de 5 700 kilomètres carrés, mais l'espace habitable est beaucoup plus réduit : il se concentre en majeure partie sur le bord de la côte qui fait une centaine de kilomètres de longueur, sur une largeur variant entre 10 et 25 kilomètres.

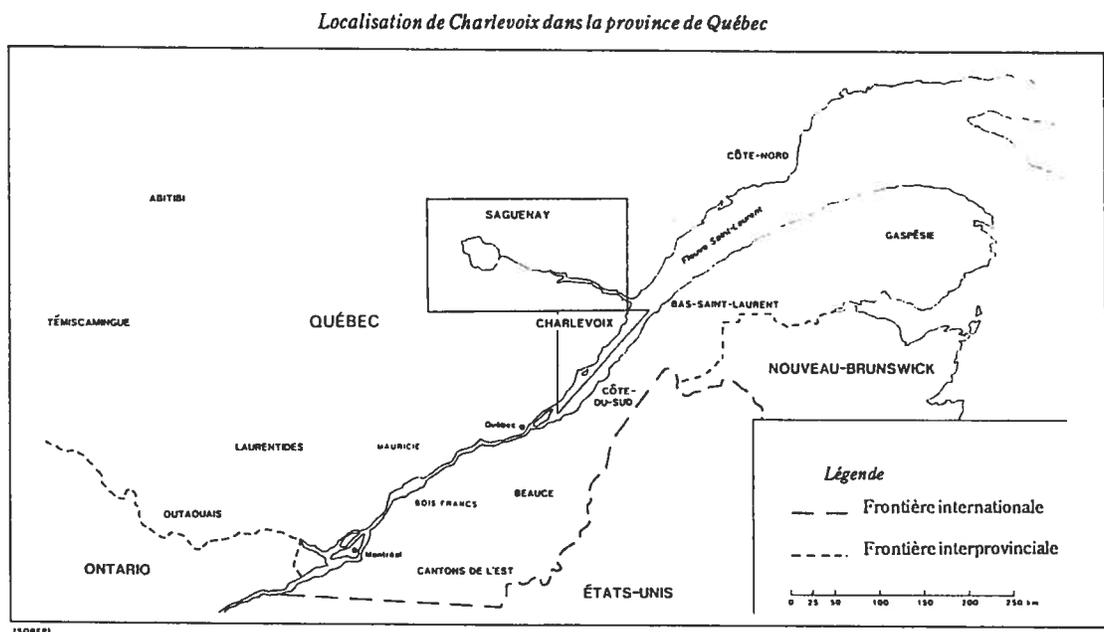


Figure 5 : Localisation de Charlevoix dans la province de Québec

Source : Histoire d'un génome

Il est important d'insister sur l'isolement de la région de Charlevoix. Localisée à la limite nord de Côte-de-Beaupré, Charlevoix est séparée de cette dernière par une chaîne de montagnes d'une trentaine de kilomètres. En fait, la totalité de la zone habitable est ainsi

encerclée : d'abord par les hautes terres et les denses forêts du plateau, ensuite par le fleuve Saint-Laurent au sud et la rivière Saguenay au nord. Entre les dernières paroisses de Beupré et les premières de Charlevoix, il y a un massif dont l'altitude varie entre 600 et 800 mètres et qui a longtemps nui aux communications terrestres avec le sud-ouest. Le chemin des Caps, sentier dangereux à marée haute, ainsi que le fleuve Saint-Laurent ont constitué jusque tard dans le XIX^e siècle les seules voies de communication avec les paroisses de Beupré et la région de Québec.

Le peuplement de Charlevoix a débuté en 1675 à la région de la Petite Rivière Saint-François-Xavier. À ce moment-là, toute la population du Canada était concentrée dans la vallée du Saint-Laurent, où elle s'échelonnait sur plus de 250 kilomètres le long du fleuve. La population de la région de Québec s'étirait au nord-est sur l'île-d'Orléans et la côte de Beupré, et c'est de cette région voisine que sont venus les premiers colons de Charlevoix. Formée d'à peine 200 personnes à la fin du XVII^e siècle, la population de Charlevoix compte en 1765 un peu plus de 1000 personnes. En 1831, la population de Charlevoix compte 8400 personnes et une certaine pression démographique a déjà commencé à s'y exercer dans les territoires qui ont été occupés jusqu'à présent. Même si les terres de l'arrière-pays ne sont guère propices à l'agriculture, toutes les conditions sont réunies pour alimenter un mouvement de colonisation en périphérie des basses paroisses, vers les hauteurs qui dominent l'estuaire. Le mouvement d'émigration vers le Saguenay s'amorce au cours de la même période ⁽¹³²⁾.

Effet fondateur dans la région de Charlevoix

La notion de fondateur porte sur cette portion de la population qui a contribué à la constitution du bassin génétique de la région en laissant des descendants dans cette région, dans ce cas-ci Charlevoix. Pour recevoir le statut de fondateur de Charlevoix, un individu doit remplir les conditions suivantes :

- la personne doit être l'enfant d'un couple immigrant ou étranger à la région et donc marié à l'extérieur de Charlevoix;
- la personne doit s'être mariée dans la région de Charlevoix;
- la personne doit avoir laissé au moins un descendant marié dans cette région;
- toutes ces conditions doivent être établies avant 1850.

Donc, selon ces critères, l'ensemble des fondateurs de Charlevoix regroupe 599 personnes, soit 341 hommes et 258 femmes ⁽¹³²⁾. Le peuplement fondateur de Charlevoix est caractérisé par un très fort apparentement et il résulte largement du mouvement migratoire de type familial. Ainsi, 38 % seulement des fondateurs ne sont apparentés à aucun autre fondateur.

Le pool génique observé aujourd'hui dans Charlevoix et au Saguenay proviendrait d'un nombre relativement restreint d'ancêtres lointains impliquant un effet fondateur. Par définition, *l'effet fondateur désigne un phénomène migratoire en vertu duquel un groupe d'immigrants en provenance d'une population mère s'établit dans un territoire inoccupé où il se reproduit et donne naissance à une nouvelle population* ⁽¹³³⁾. Ceci provoque une homogénéisation du pool génique, tout au moins à certains locus. Par homogénéité génétique, on désignera ici le fait qu'à divers locus, des copies d'un même allèle deviennent très fréquentes dans une population. Exprimée d'une autre façon, c'est aussi la fréquence élevée d'individus portant des copies de mêmes gènes, ou encore une probabilité élevée d'homozygotie à ces locus.

Historiquement, pour la population de Charlevoix, on peut dire que cet effet fondateur découle de deux facteurs. Le premier consiste dans l'immigration relativement faible qui a suivi la période d'établissement de la population. On sait que la part des nouveaux fondateurs, en l'occurrence des immigrants ultérieurs qui laissent des descendants, ne représente que 13 % de la population totale entre 1750 et 1774. L'apport relatif des nouveaux immigrants « utiles » ne cesse par la suite de décroître pour ne représenter que 5 % de la population entre 1800 et 1824, et seulement 3,8 % de 1825 à 1849 ⁽¹³²⁾. Le caractère sélectif qui entoure la provenance géographique des fondateurs de Charlevoix constitue la seconde cause. Il est rapporté que neuf fondateurs sur dix provenaient de la région de Québec ; le tiers de ceux-ci originait plus particulièrement de Côte-de-Beaupré. De plus, la moitié du noyau fondateur était apparentée au premier degré (frères et sœurs) et 45 % des ancêtres de ce noyau provenaient de la même région française située à la frontière des anciennes provinces du Perche et du Maine. Il est donc tout à fait plausible de penser que le pool génique actuel de Charlevoix a été formé en grande partie d'un petit noyau ancestral de cette région de la France.

Tous ces faits sont en concordance avec la thèse d'un effet fondateur important : la population actuelle de Charlevoix proviendrait d'un nombre restreint d'ancêtres qui ont pu transmettre à plusieurs de leurs descendants quelques gènes mutants dont ils étaient porteurs.

De Charlevoix vers le Saguenay

Dès 1830, des pressions officielles s'exercent dans Charlevoix pour que le territoire du Saguenay s'ouvre à la colonisation. Détenu à bail par la Compagnie de la Baie d'Hudson, ce territoire presque voisin de Charlevoix apparaît propice à l'agriculture et recèle des richesses forestières convoitées. Ces éléments en font un lieu de destination privilégié pour les partants de Charlevoix, qui ne s'ouvre néanmoins officiellement qu'à la fin du bail de la Compagnie, en 1842. C'est à partir de 1837, que les premiers colons et leurs familles émigrent vers le Saguenay, même si le mouvement s'étend rapidement à toutes les paroisses de Charlevoix. Ce dernier est surtout motivé par le besoin de s'établir sur des terres plus vastes et de meilleure qualité, mais aussi par des intérêts dans l'industrie du bois.

L'analyse des familles reconstituées à partir des registres paroissiaux saguenéens a permis d'établir à près de 30 000 le nombre total de personnes ayant immigré au Saguenay avant 1911 ⁽¹³⁴⁾. Jusqu'en 1870, 80 % du courant migratoire dirigé vers le Saguenay était venu de Charlevoix.

En effet, malgré ses 280 000 habitants, la population actuelle du Saguenay se distingue par son homogénéité culturelle et on y observe des indices évidents d'homogénéité génétique, tout au moins à certains locus (par exemple, l'incidence élevée de génopathies rares). Rappelons que cette population est à plus de 95 % d'origine française et de tradition catholique. Par contre, un premier point semble acquis : les éléments d'homogénéité observés dans la population saguenéenne ne sont pas causés par une faible immigration au XIX^e siècle. Effectivement, en 1852, soit un peu plus d'une douzaine d'années après son ouverture à la colonisation, la région du Saguenay comptait 5 200 habitants, dont la très grande majorité (80 %) était constituée d'immigrants. Il ressort que les entrées d'immigrants ont été relativement nombreuses, mais la diversification que ce

phénomène aurait pu entraîner a été considérablement atténuée. C'est que, dans une large mesure, les immigrants provenaient d'une seule région, elle-même relativement homogène, et qu'ils étaient fortement apparentés. Quant à ceux qui provenaient d'autres régions vraisemblablement plus hétérogènes, ils ont quitté le Saguenay plus souvent que les premiers, et leurs descendants aussi. Très rapidement, le premier noyau de fondateurs a pu ainsi accroître son poids numérique et alimenter le bassin génétique saguenéen de manière importante et durable. Dans la mesure où, à partir de 1838 (et durant quelques décennies), la population du Saguenay a été formée à même un prélèvement migratoire quasi exclusif en provenance de Charlevoix, on peut parler ici d'un effet fondateur, au sens large tout au moins. Or, les données sur l'enracinement et la reproduction des pionniers venus de Charlevoix montrent qu'à l'effet fondateur s'est ajouté une sorte d'effet multiplicateur. En vertu même de l'avance prise par les premiers immigrants de la région mère, ces derniers ont bénéficié de conditions économiques et sociales qui leur ont permis de se reproduire plus vite que les autres et de diffuser leurs gènes en plus grand nombre.

Effet fondateur et maladies génétiques

Depuis plus de 20 ans, et surtout depuis quelques années, cette population du SLSJ a fait l'objet de diverses enquêtes grâce auxquelles on comprend mieux maintenant pourquoi on y observe une prévalence élevée de certaines maladies génétiques spécifiques telles que tyrosinémie, rachitisme vitamino-dépendant, dystrophie myotonique, etc. Comme ces maladies sont toutes des maladies récessives, il a été établi qu'elles ne sont pas attribuables à la fréquence élevée des mariages consanguins, mais plutôt à une fécondité élevée combinée à un effet fondateur.

En résumé, cette population est finalement la résultante d'un triple effet fondateur. Le premier, c'est le déplacement de la France vers la Nouvelle-France aux XVII^e et XVIII^e siècles. Le second est celui d'une sous-population de la région de Québec qui a émigré sur les côtes de Charlevoix à partir du début du XVIII^e siècle pour y trouver de nouvelles terres à défricher. À partir de 1840, il y a eu un troisième effet fondateur provoqué par ces gens de Charlevoix qui ont émigré au Saguenay pour les mêmes raisons. Voilà donc pourquoi cette population est une population de choix pour les études de maladies génétiques.

Alors que les chercheurs se sont penchés depuis de nombreuses années sur les maladies héréditaires de cette population, ce n'est que plus récemment, qu'ils ont commencé des recherches sur les maladies multifactorielles telles que maladie d'Alzheimer, les lymphomes, les maladies affectives bipolaires. Ces maladies, comme leur nom l'indique, peuvent avoir plusieurs causes et, généralement, au moins deux facteurs entrent en jeu pour les déclencher. Ils sont d'origine génétique et d'origine environnementale. Notre équipe de recherche du centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), en collaboration avec l'équipe du Dr Daniel Gaudet du complexe hospitalier de la Sagamie à Chicoutimi ainsi que l'équipe du Dr Gérard Bouchard de l'Université du Québec à Chicoutimi, avons choisi cette population pour faire l'étude génétique de l'hypertension artérielle. Par son homogénéité génétique, cette population nous permet d'augmenter la puissance de détection de liaisons génétiques. De plus, les populations ayant un effet fondateur tout comme celle du SLSJ permettent de simplifier l'étude d'une maladie aussi complexe que l'hypertension artérielle. Moins de gènes devraient contribuer au phénotype, ce qui implique que chaque gène qui contribue à la maladie devrait être plus facile à détecter⁽¹³⁵⁾. Notre but est d'explorer la possibilité de déterminer l'impact éventuel de l'effet fondateur dans les maladies complexes comme l'hypertension artérielle.

Étude génétique

Les études génétiques effectuées sur une population canadienne-française du Saguenay-Lac-Saint-Jean, seront subdivisées en deux sections, soit la première sur l'étude des polymorphismes du récepteur AT₁ et la seconde sur l'étude génétique de la leptine et du TNF- α .

Étude des polymorphismes du récepteur AT₁

Le gène du récepteur AT₁ est situé sur le bras long du chromosome 3 et fait plus de 55 kb (position 3q21-25). Le gène est composé de 5 exons et 4 introns. La région codante du récepteur est localisée dans le 5^{ième} exon, alors que les 4 premiers codes pour la région 5' non traduite du gène. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés pour le gène du récepteur AT₁. Bonnardeaux *et coll.*⁽¹³⁶⁾ ont séquencé toute la partie codante (exon 5) ainsi que la région 3' non traduite du gène. Ils ont identifié 5 polymorphismes fréquents situés dans l'exon 5 : +573, +1062, +1166, +1517 et +1878.

Bonnardeaux *et coll.*⁽¹³⁶⁾ ont utilisé des études de cas-témoins ainsi que des études de liaison pour étudier le lien possible entre les polymorphismes du gène du récepteur AT₁ et l'hypertension essentielle. Sur les 5 polymorphismes décrits dans l'article, c'est le

polymorphisme qui substitue la cytosine (C) pour une adénine (A) à la position +1166 dans la région 3' non traduite (A¹¹⁶⁶C) qui a une fréquence plus élevée chez les individus hypertendus. Cette association est plus prononcée chez les patients qui souffrent d'hypertension sévère, et chez ceux qui ont développé la maladie en bas âge.

Les résultats de Bonnardeaux ont été confirmés par certains ^(137,138,139,140,141) et contredits par d'autres ^(142,143,144,145,146,147). Donc, cette relation du marqueur A¹¹⁶⁶C avec l'hypertension est très contradictoire (Tableau 4). Par exemple en 1999, Kainulainen *et coll.* ⁽¹³⁹⁾ ont effectué des études de liaison et d'association sur un échantillonnage de la population finlandaise qui possèdent une certaine homogénéité génétique. L'échantillonnage était constitué de jumeaux hypertendus et de leurs germains respectifs. Ils ont recruté 329 individus provenant de 142 familles dont l'hypertension s'est manifestée avant l'âge de 60 ans. Seulement le polymorphisme A¹¹⁶⁶C a été associé au phénotype de l'hypertension.

Alors que Tiret *et coll.* ⁽¹⁴¹⁾ ont démontré, avec une étude cas-témoin d'une population caucasienne française, une association du polymorphisme A¹¹⁶⁶C avec l'hypertension seulement chez les femmes. Plusieurs autres études ne démontrent aucune association ou liaison de ce marqueur avec l'hypertension, par exemple l'étude publiée par Schmidt *et coll.* ⁽¹⁴⁴⁾ dans une population allemande. Si l'on observe les différentes études effectuées sur les Caucasiens (Tableau 4), on remarque que l'influence du polymorphisme du gène du récepteur AT₁ a une prévalence plus importante chez les groupes à haut risque. Des études ont été menées également chez des populations non caucasiennes. Par exemple, l'étude publiée par Takami *et coll.* en 1998 ⁽¹⁴³⁾ chez une population japonaise ne détecte aucune association entre le marqueur A¹¹⁶⁶C et l'hypertension, mais par contre, elle

démontre une association entre la masse ventriculaire gauche chez les sujets ayant une pression artérielle normale.

En résumé, l'implication de polymorphismes du récepteur AT_1 dans le développement de l'hypertension artérielle est très controversée. Par contre, plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats tels que l'origine de la population. Une population en structure familiale qui bénéficie d'un effet fondateur (comme la population finlandaise utilisée par Kainulainen) n'a pas la même puissance d'analyse qu'une cohorte de patients non reliée sélectionnée au hasard. Fait à préciser que ce type de cohorte non reliée est utilisé dans la majorité des études d'associations de cas-témoin. Peu d'études de liaison sur une population à effet fondateur ont été effectuées pour évaluer l'implication du récepteur AT_1 envers l'hypertension. En fait, la majorité des études sont des analyses d'association de types cas-témoin. Cela s'explique facilement par le fait que les études de liaison demandent une logistique beaucoup plus importante et coûteuse. Un autre facteur extrêmement important qui peut influencer les résultats est l'environnement du patient dans un sens physiologique. Si le patient est en position assise versus en position couchée, l'implication du système étudié n'est pas nécessairement la même. Souvent, les pathologies sont révélées par une intervention extérieure ou environnementale, comme par exemple la détection de l'angine de poitrine par le test de tapis roulant avec effort. Sans le test avec effort, il est impossible de déterminer si le patient souffre d'angine de poitrine. Donc, nous croyons que le même principe peut être appliqué pour la détection de liaison génétique de différents systèmes complexes tels que l'implication du SRA dans l'hypertension essentielle. Ce sujet sera traité de façon approfondie au chapitre 5 de cette thèse où nous expliquons notre nouvelle méthode d'analyse de liaison génétique que nous avons baptisée « liaison dynamique ». Cette méthode peut expliquer en partie les résultats contradictoires obtenus dans les différentes études.

Auteurs	Analyse	Population	Résultats	Notes
Bonnardeaux <i>et coll.</i> 1994	Association cas-témoin	Caucasien Française	Fréquence A ¹¹⁶⁶ C, 0,36 HTA vs 0,28 Norm (chi 2 = 6.8, P < .01)	
Kainulainen <i>et coll.</i> 1999	Association cas-témoin ^(*) et liaison ^(&)	Finlandaise	^(*) A ¹¹⁶⁶ C 28% HTA vs 16% Norm Lod Score de 2,9 pour marqueur VNTR	Utilisation d'une population qui possède une homogénéité génétique
Wang <i>et coll.</i> 1997	Association cas-témoin	Caucasienne	A ¹¹⁶⁶ C 40% Hta vs 29% Norm	Recrutement de patients avec un fort historique d'hypertension familial
Fan <i>et coll.</i> 1998	Association cas-témoin	Chinoise	Augmentation significative de la fréquence allélique du A ¹¹⁶⁶ C chez les hypertendus	
Szombathy <i>et coll.</i> 1998	Association cas-témoin	Caucasien	Allèle « C » du A ¹¹⁶⁶ C plus fréquent chez les hypertendus	Seulement dans un sous-groupe qui ont un BMI élevé et d'âge mûr
Castellano <i>et coll.</i> 1996	Association	Italienne	Aucune association	Population générale sélectionnée au hasard
Schmidt <i>et coll.</i> 1997	Association cas-témoin	Allemande	Aucune association	
Takami <i>et al</i> 1998	Association cas-témoin	Japonaise	Association positive avec la masse ventriculaire gauche	Pas d'association avec l'hypertension
Berge <i>et coll.</i> 1998	Association	Norvégienne	Aucune association	Les patients avaient tous une pression normale
Liyou <i>et coll.</i> 1999	Association cas-témoin	Australienne	Aucune association	Effectué seulement chez les personnes âgées
Lesage <i>et coll.</i> 1997	Liaison par paire de germains	Française	Aucune liaison	Population hypertendue et diabétique non insulinodépendante
Benetos <i>et coll.</i> 1995	Association cas-témoin	Italienne	Aucune association avec hypertension	Seulement association avec le niveau des lipides

Tableau 4 : Résumé des différentes études génétiques du récepteur AT₁.

L'obésité

Les facteurs susceptibles d'entraîner une prise de poids excessive chez l'homme sont multiples et encore largement inconnus. L'obésité est une maladie complexe et on considère actuellement que les obésités humaines, sauf exception (formes rares des syndromes de Bardet-Biedl ou de WilliPrader), ne résultent pas d'anomalies géniques univoques, mais de l'interaction : 1) de facteurs génétiques jouant un rôle permissif pour des facteurs environnementaux (gènes de susceptibilité), mais qui pourraient être, dans certains cas, déterminants (gènes « nécessaires » d'obésités constitutionnelles); 2) de facteurs environnementaux comme l'activité physique et l'alimentation ; 3) de facteurs psychologiques, psychosociaux et culturels comme l'adaptation au stress et diverses perturbations émotionnelles qui jouent parfois un rôle prépondérant (obésité psychogène). Ces variables nutritionnelles, métaboliques et psychosociales interagissent entre elles et avec les facteurs génétiques sans qu'il ne soit possible d'attribuer à l'une ou l'autre un caractère prédominant ou primitif. Le caractère multifactoriel des obésités complique donc l'approche physiopathologique. L'identification de gènes impliqués dans cette pathologie est passablement ardue puisque le développement des phénotypes d'obésité repose sur des interactions complexes entre des facteurs génétiques et environnementaux. Le tout est un mélange d'interaction gènes-gènes et gène-environnement.

La recherche fondamentale et clinique dans les domaines de l'obésité, du développement des tissus adipeux, des mécanismes de dépense d'énergie et des neuropeptides régulant l'appétit, s'est beaucoup développée ces dernières années. Ceci est dû au fait que de remarquables travaux de recherche (par exemple la découverte du gène ob/leptine) ont été effectués dans ces domaines au cours des dernières années. L'autre moteur de la recherche dans ce secteur vient de la médecine et de la santé publique

puisque un tiers des Nord-Américains et 15 à 20 % des européens sont obèses (indice de masse corporelle $> 30 \text{ kg/m}^2$). Les complications bien connues de l'obésité (diabète, maladies cardiovasculaires graves, problèmes pulmonaires, atteintes articulaires, risques accrus de cancer, aspects psychologiques, etc.), l'accroissement alarmant de la fréquence des obésités (5,5 % du budget américain de la santé), font qu'il s'agit d'un problème de santé majeur qui commence à être pris en considération par les autorités de plusieurs pays et qui pourrait même devenir le nouveau fléau du 21^e siècle.

La génétique des obésités humaines est très complexe. Les travaux de Claude Bouchard *et coll.*, de l'Université Laval à Québec, ont démontré que les facteurs génétiques interviennent pour environ 30 % dans l'héritabilité de la taille du tissu adipeux, et pour 10 à 50 % dans l'héritabilité du poids corporel ⁽¹⁴⁸⁾. Les analyses de liaison génétique et d'études d'association de polymorphismes de gènes candidats montrent que de nombreux gènes sont susceptibles de participer (ou de favoriser) le développement de l'obésité chez l'homme. Les résultats obtenus récemment par de nombreuses équipes, par les méthodes de « total genome scan », permettent de construire une carte génétique des obésités humaines qui suggère que tous les chromosomes sont impliqués, à l'exception du chromosome Y. Certains chercheurs parlent même qu'une centaine de gènes pourraient être impliqués dans le développement de l'obésité.

Nouvelles fonctions des adipocytes

Les travaux récents sur les adipocytes ont permis de montrer que ces cellules ne sont pas seulement des lieux de stockage des triglycérides. En effet, ces cellules ont une activité sécrétoire très importante démontrée par la découverte de la leptine. Les autres facteurs sécrétés par les adipocytes sont : la lipoprotéine lipase (LPL), l'angiotensinogène, l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène-1, le TNF- α , la protéine CETP de transfert des esters de cholestérol, une protéine de liaison du rétinol, les facteurs D, C3, B, C_{1q} et C_{3a} du complément, IGF-1, TGF- β , PGE₂, la monobutyryne (activité angiogénique), et des hormones stéroïdes (androgènes et oestrogènes). De plus, il a été démontré récemment que les peptides natriurétiques étaient impliqués dans la lipolyse des tissus adipeux humains ^(149,150). Ces peptides natriurétiques étaient plutôt connus pour leurs effets sur le contrôle du volume plasmatique ainsi que sur la régulation de la pression artérielle. Les adipocytes ont donc une activité sécrétrice endocrine et paracrine considérable correspondant à la production d'hormones, cytokines, facteurs angiogéniques et facteurs adipogéniques ⁽¹⁵¹⁾. Des études ont démontré la production d'acide lysophosphatidique (LPA) par les adipocytes et montré également que ce LPA agit de manière paracrine et favorise la prolifération des préadipocytes ⁽¹⁵²⁾. Par conséquent, les adipocytes peuvent communiquer avec leur milieu proche ainsi qu'avec le système nerveux central et d'autres organes.

Mécanismes physiologiques et moléculaires de la thermogenèse

L'excès de graisse corporelle résulte d'un déséquilibre entre l'énergie absorbée et l'énergie dépensée. L'énergie dépensée est divisée en métabolisme de base, thermogenèse postprandiale et activité physique. Un certain nombre de travaux effectués chez les animaux et les humains ont démontré qu'un défaut de thermogenèse, indépendant de l'exercice physique, était associé à certaines obésités. Ces résultats ont suscité la recherche de mécanismes thermogéniques. La thermogenèse est proportionnelle à la consommation d'oxygène et est liée à l'oxydation des substrats. On sait que cette oxydation est couplée à la phosphorylation de l'ADP dans les mitochondries. On sait aussi que ce couplage n'est pas de 100 % et qu'une partie de l'énergie des oxydations est dissipée sous forme de chaleur via un découplage partiel de la respiration. Des gènes et des protéines participant à ce découplage partiel de la respiration ont été identifiés. Il s'agit de la famille des protéines découplantes ou UCPs ^(153,154). Les UCPs sont des protéines de la membrane interne des mitochondries qui activent la vitesse d'oxydation des substrats et favorisent la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Les UCPs représentent de nouvelles cibles pour des molécules anti-obésité.

Pour essayer de comprendre pourquoi les humains présentent de grandes variations interindividuelles de gain de poids en réponse à la suralimentation, Levin *et coll.* ⁽¹⁵⁵⁾ ont étudié des obèses acceptant d'absorber un surcroît de 1000 kilocalories par jour pendant 8 semaines. Certains sujets ont accru leur poids de 4 kg alors que d'autres n'ont pris que 300 g. La conclusion de leur étude est surprenante : il semble qu'en présence d'un excès d'énergie alimentaire, les individus ayant résisté à la prise de poids aient activé fortement leur thermogenèse liée à l'activité physique normale non volontaire (NEAT ou nonexercise activity thermogenesis). Ainsi, le métabolisme de base ou la thermogenèse métabolique

induite par l'alimentation ne seraient pas déterminants dans le contrôle du poids corporel, alors que l'activité physique spontanée (activités associées à une vie normale, au fait de bouger plus ou moins) le serait.

Mécanisme de contrôle de la prise alimentaire

On connaît maintenant de très nombreux peptides provoquant la satiété ou l'inhibant. Le neuropeptide Y est un puissant stimulateur de la prise alimentaire ⁽¹⁵⁶⁾. Il existe une boucle régulatrice entre ce neuropeptide et la leptine qui a l'effet contraire. Il existe plusieurs sous-types de récepteurs de neuropeptide Y. Certaines études ont été effectuées sur des souris dont le gène du récepteur NPY-Y5 a été détruit par recombinaison homologue ⁽¹⁵⁷⁾. En fait, contrairement à ce qui était attendu, ces souris ont un poids corporel normal et une sensibilité à la leptine non altérée. Il semble donc que ce sont d'autres sous-types de récepteurs de neuropeptide Y qui contrôlent la prise alimentaire. Les souris transgéniques déficientes en récepteur 4 de la mélanocortine sont boulimiques et obèses, et l'injection d'un agoniste de ce récepteur inhibe la prise alimentaire ⁽¹⁵⁸⁾. Ces résultats démontrent donc que la mélanocortine inhibe la prise alimentaire. Un autre modèle de souris très étudié est celui des souris Agouti qui développent une obésité ⁽¹⁵⁹⁾. La protéine Agouti agit en inhibant l'activité des récepteurs de la mélanocortine, ce qui provoque une augmentation de la prise alimentaire.

En résumé, de nombreux résultats récents démontrent que la recherche dans le domaine de l'obésité est devenue très active. Une véritable approche multidisciplinaire de

l'obésité est en marche. Des progrès certains ont été faits aussi bien dans le domaine de la génétique que dans celui du développement des tissus adipeux, ou encore celui des mécanismes de dissipation d'énergie ou de régulation centrale de la prise alimentaire. Il est maintenant évident que les causes de l'obésité sont diverses et complexes et ne se réduisent pas uniquement à un simple excès de la prise alimentaire que les patients pourraient contrôler.

Obésité associée à l'hypertension

Il est bien connu que l'obésité est un facteur de risque majeur pour le développement de l'hypertension artérielle chronique ^(111,160). L'association de l'obésité et de l'hypertension a été documentée par un grand nombre d'études. Le dépistage effectué par « The nationwide Community Hypertension Evaluation Clinic » (CHEC) qui a inclus plus d'un million d'Américains, démontre que la prévalence de l'hypertension est de 0,5 à 3 fois plus élevée chez les patients qui ont un surplus de poids corporel comparativement à ceux qui ont un poids faible ou normal ⁽¹⁶¹⁾. Les données dérivées de l'étude NHANES III, qui comprend plus de 30 000 patients, démontrent que la pression systolique et diastolique augmente avec l'indice de masse corporelle (BMI) ⁽¹⁶²⁾. Dans l'étude de Framingham qui inclut plus de 5000 hommes et femmes âgés entre 30 et 59 ans, la prévalence de l'hypertension augmente directement avec l'augmentation de la sévérité de l'obésité ⁽¹¹¹⁾. De plus, après huit ans, le risque de développer l'hypertension ainsi qu'une hypertrophie cardiaque dans le groupe le plus obèse (avec un poids relatif de 120 %) était de 3 à 10 fois plus élevé que celui du groupe qui a un poids corporel normal. Un support additionnel à la thèse de l'hypertension associée à l'obésité est donné par les études qui démontrent qu'une

perte de poids conduit à une baisse de pression artérielle ⁽¹⁶³⁾. Par contre, la relation entre l'obésité et l'hypertension opère dans les deux directions. C'est-à-dire que les sujets hypertendus ont une plus grande tendance à l'obésité, alors que les patients obèses sont plus sujets au développement de l'hypertension. D'ailleurs, l'étude de « Coronary Artery Risk Development in Young Adults » (CARDIA) ⁽¹⁶⁴⁾ a démontré que les jeunes normotendus qui avaient un historique familial d'hypertension avaient un poids corporel significativement plus élevé que ceux sans historique familial d'hypertension.

Des évidences substantielles de données épidémiologiques supportent le lien entre l'obésité et l'hypertension. Cependant, la relation entre les deux pathologies n'est pas nécessairement aussi directe que l'on voudrait le croire. Cette relation est une interaction de facteur démographique, génétique, hormonal, rénal, et de facteur hémodynamique. De plus, l'âge, la race et le sexe de la personne modulent également la force de l'association entre l'obésité et l'hypertension. Par exemple, l'hyperinsulinémie, qui est caractéristique de l'obésité, peut contribuer à la probabilité de développer l'hypertension en activant le système nerveux sympathique (SNS) et causer, entre autres, une rétention de sodium. D'autre part, la leptine, dont les niveaux sont augmentés chez la plupart des patients obèses, peut contribuer à l'hypertension chez les obèses par son effet sur l'insuline, le SNS et l'excrétion de sodium ⁽¹⁶⁵⁾. Par contre, la plupart des anomalies liées à l'obésité et à l'hypertension sont réversibles par une perte de poids et à un retour au poids corporel normal de la personne. D'ailleurs, la perte de poids peut prévenir, ou plutôt retarder le développement de l'hypertension chez les patients qui ont une pression artérielle normale élevée. Conséquemment, la perte de poids devrait être le premier traitement au sein des obèses hypertendus ⁽¹⁶⁶⁾. Cependant, la majorité des patients auront besoin d'un traitement pharmacologique en conjonction avec la réduction du poids corporel. Dans l'optique d'un meilleur traitement et contrôle de l'hypertension, la sélection des agents antihypertensifs chez les patients obèses devrait tenir compte des mécanismes qui ont conduit au

développement de l'hypertension ainsi que les anomalies métaboliques qui mène à l'obésité. Il est donc très important de tenter d'élucider et de comprendre les différents mécanismes complexes qui conduisent à l'obésité et à l'hypertension artérielle.

Étude génétique de la leptine

Différentes souches de rongeurs développent une obésité spontanée héréditairement transmise, le plus souvent, sur un mode récessif. Les plus connues sont celles des souris ob/ob et db/db et du rat fa/fa. Ces rongeurs développent une obésité massive et précoce associée à des altérations métaboliques et hormonales majeures comme un hyperinsulinisme très précoce, une insulino-résistance, un hypercorticisme, une hyperglycémie ainsi qu'une infertilité ⁽¹⁶⁷⁾. L'expression du phénotype de l'obésité chez ces rongeurs est indépendante des conditions d'environnement et d'alimentation qui ne déterminent que le degré du surpoids ⁽¹⁶⁸⁾. Les expériences réalisées par Coleman ⁽¹⁶⁹⁾ avaient montré que la mise en circulation croisée de la souris ob/ob et de la souris db/db entraînait une perte de poids, une réduction de la prise alimentaire, une diminution de la glycémie et finalement le décès par cachexie de la souris ob/ob. Ces constatations laissaient supposer que le produit du gène ob était une substance capable d'agir de façon systémique sur les centres impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire voir plus globalement sur le système de régulation de la balance énergétique. L'utilisation des outils de biologie moléculaire et de la stratégie de la génétique inverse a permis en 1994 l'identification du gène ob, de sa protéine la leptine ⁽¹¹⁶⁾ et plus tard de son récepteur ^(170,171). Ces stratégies reposent sur l'établissement d'une carte physique et génétique des régions respectives des gènes ob et db, qui ont été isolés par le clonage positionnel, et les

mutations responsables de l'obésité de ces souris ont été identifiées ^(116,171,170,172). Le gène *ob* situé sur le chromosome 6 de la souris consiste en 3 exons et 2 introns et est transcrit en un ARNm de 4,5 kb exprimé uniquement dans le tissu adipeux. En fonction de la souche, la souris *ob/ob* est porteuse de deux types d'anomalies génétiques. Dans la souche originale, l'ARNm contient un codon « stop » en position 105 qui indique un arrêt de la traduction et conduirait à la formation d'une protéine tronquée inactive. Dans l'autre souche, le transcrit d'ARNm est absent, suggérant des altérations dans le promoteur du gène qui prévient la synthèse de la protéine. La structure de la protéine codée par le gène *ob* que l'on appelle leptine (du grec *leptos* qui signifie mince) paraît bien conservée entre les espèces, et une forte homologie est notée (84 %) entre la protéine de souris et la protéine humaine. Donc, ceci soulève la question : est-ce que l'obésité humaine pourrait être due à une déficience en leptine ? Aucune étude sur des populations obèses n'a réussi à démontrer des mutations du gène de la leptine chez l'humain ^(173,174,175). Par contre, une séquence polymorphique du gène de la leptine a été rapportée comme étant associée avec l'obésité morbide ⁽¹⁷⁶⁾. En 1997, deux patients souffrant d'obésité morbide ont été identifiés comme ayant une mutation qui inactive le gène de la leptine. Mais, ce type de mutation conduisant directement à l'obésité semble être extrêmement rare.

La leptine se retrouve à un niveau plutôt bas (5 à 15 µg/ml) chez les individus minces, alors qu'il est plus élevé chez les individus obèses. Il existe une forte corrélation entre le niveau de la leptine circulante et la quantité de masses adipeuse que l'on retrouve chez les patients. Ceci suggère qu'il existe un mécanisme de résistance à la leptine dans la pathophysiologie de l'obésité ^(177,178). En plus de participer à la régulation de la masse adipeuse, la leptine agit également sur d'autres systèmes complexes tels que les systèmes cardiovasculaire et rénal. La leptine augmente la sensibilité à l'insuline ainsi que l'excrétion du sodium et de l'eau par le rein ⁽¹⁷¹⁾.

Effet de la leptine sur le système cardiovasculaire

Les animaux qui sont traités avec des injections de leptine ont une température corporelle plus élevée ainsi qu'un métabolisme accéléré comparativement aux animaux témoins ⁽¹⁷⁹⁾. Collins *et coll.* ont démontré que la leptine augmentait l'activité sympathique par une augmentation du taux de norépinéphrine dans les tissus adipeux ⁽¹⁸⁰⁾. Par contre, aucune élévation de la pression artérielle n'a été notée quand elle est injectée en forte concentration ⁽¹⁸¹⁾. De plus, il a été démontré que la leptine augmente la production d'oxyde nitrique endothéliale *in vitro* dans des vaisseaux sanguins isolés ⁽¹⁸²⁾. Ceci confirme qu'il existe bien un effet vasodilatateur de la leptine alors que l'effet chronique de la leptine semble être de façon prédominante hypertenseur ⁽¹¹⁵⁾. L'infusion de leptine chez les rats « Sprague-Dawley » pour une période de douze jours augmente la pression artérielle en dépit d'une baisse de l'apport alimentaire. Une augmentation du rythme cardiaque et de la résistance rénale vasculaire a été également notée, ce qui est en relation avec l'augmentation de l'activité sympathique causée par la leptine. De plus, les souris transgéniques, qui surexpriment la leptine, développent aussi une hypertension artérielle qui est abolie par un inhibiteur des récepteurs alpha n'ayant aucun effet sur la pression artérielle de souris non-transgéniques ⁽¹¹⁴⁾.

L'effet de la leptine sur les reins

L'ARNm qui code pour la formation du récepteur de la leptine a été détecté dans le rein ⁽¹⁸³⁾, suggérant que la leptine ait un effet direct sur cet organe. Jackson et Li ont décrit

que l'infusion de la leptine (à concentration de 0,3 μg -30 $\mu\text{g}/\text{min}$), directement dans l'artère rénale de rat, produit une augmentation de l'excrétion du sodium, du volume urinaire, alors que le taux de filtration glomérulaire (GFR) ne subit pas de modification significative ⁽¹⁸⁴⁾. Lorsque la leptine est donnée de façon systématique (0,4 à 0,5 mg/kg), elle cause un accroissement de la sécrétion de sodium de 40 % et du volume urinaire de 50 % ⁽¹⁸⁵⁾. Cependant, une infusion à long terme augmente la pression artérielle, le rythme cardiaque, ainsi qu'une protéinurie, sans toutefois causer une natriurèse chez les rats spontanément hypertendus (SHR) ⁽¹⁸⁶⁾. En revanche, les doses utilisées dans ces études chez les animaux sont beaucoup plus élevées que les niveaux physiologiques humains. Il reste donc à démontrer si les concentrations physiologiques normales de leptine contribuent au maintien homéostatique du sodium et de l'eau chez l'humain.

En résumé, la leptine ne contrôle pas seulement l'appétit et le taux de masse adipeuse au sein d'un individu, mais elle est impliquée également dans l'augmentation de l'activité sympathique, dans l'excrétion rénale et dans la sensibilité à l'insuline. Puisque la leptine augmente la sensibilité à l'insuline et inhibe la sécrétion d'insuline contrôlée par le glucose, elle permet donc de contrôler l'hyperinsulinémie ⁽¹⁸⁷⁾. Cependant, la résistance à la leptine, chez les patients obèses, peut contribuer directement à leur profil clinique tel que dépense énergétique faible, rétention du sodium, hausse du volume intravasculaire, qui induit une hypertension artérielle ainsi qu'une résistance à l'insuline menant au diabète et à l'hyperlipidémie. Voilà pourquoi le gène de la leptine est un bon gène candidat pour la compréhension de l'hypertension artérielle dans une population obèse.

TNF- α

Le TNF- α (tumor necrosis factor- α) est un facteur pléiotropique qui exerce une variété d'effets tels que la promotion et l'inhibition de la croissance cellulaire, l'angiogenèse, cytotoxicité, l'inflammation et l'immunomodulation. Cette cytokine est synthétisée principalement par les macrophages en réponse à des stimuli invasifs. Le peptide sous la forme bioactive d'un trimère de 51 kDa, peut être reconnu par deux récepteurs différents, soit TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) ou p55 (55kDa) et TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2) ou p75 (75 kDa). Les formes humaines sont reconnues comme étant p60 et p80 respectivement. Tous ces récepteurs liés à la membrane cellulaire, sont glycosylés et sont présents dans la majorité des types cellulaires. Par contre, la proportion des deux récepteurs varie entre les différents tissus. En plus de lier l'hormone TNF- α , ces mêmes récepteurs peuvent lier d'autres cytokines ce qui leur confèrent un fort potentiel pléiotropique. Bien que les fonctions biologiques de ces deux récepteurs ne soient pas totalement révélées, il a été suggéré que le TNFR1 joue un rôle important dans les mécanismes proinflammatoires ainsi que dans les réponses cytotoxiques ⁽¹⁸⁸⁾. En plus des récepteurs liés à la membrane cellulaire, il existe des formes solubles des deux récepteurs qui correspondent au domaine extracellulaire du récepteur généré par protéolyse. Ces formes de récepteurs se retrouvent chez des patients normaux et en santé ^(189,190). Cette forme soluble démontre une plus grande affinité de liaison pour le TNF- α que les récepteurs couplés à la membrane cellulaire. Lorsque que le TNF- α est lié à cette forme de récepteur soluble, il ne peut plus interagir avec les récepteurs membranaires. Il est donc proposé que la présence de ces récepteurs solubles serait une forme de régulation de l'action du TNF- α ⁽¹⁹¹⁾. On retrouve une concentration plus élevée des récepteurs solubles dans le développement du SIDA ⁽¹⁹²⁾, de l'endotoxémie ⁽¹⁹³⁾ ainsi que dans le cancer, ⁽¹⁹⁴⁾ ce qui suggère un mécanisme de régulation pour contrebalancer la production du TNF.

Hotamisligil *et coll.* ⁽¹⁹⁵⁾ ont démontré que le TNFR2 était surexprimé dans les adipocytes des patients obèses avec une forte corrélation avec l'indice de masse corporelle (BMI), l'hyperinsulinémie ainsi que les niveaux d'ARNm des tissus adipeux. Le taux d'expression du TNFR2 est six fois plus élevé chez les sujets obèses comparativement aux sujets normaux. Les mêmes auteurs ne rapportent aucune différence dans le niveau d'ARNm du TNFR1 ainsi que dans les taux circulants du récepteur soluble entre les obèses et les patients normaux. Alors, ces résultats suggèrent que le TNFR2 puisse jouer un rôle dans l'obésité en modulant l'action du TNF- α .

TNF- α et l'obésité

Le TNF- α est une cytokine proinflammatoire qui, en plus d'être impliquée dans la réponse immunitaire et le cancer, joue un rôle dans le développement de l'expression phénotypique de l'obésité. Il a été suggéré que le TNF- α pouvait agir en tant qu'adipostat ^(196,197,198), c'est-à-dire que l'expression du TNF- α par le tissu adipeux est proportionnelle au degré d'adiposité. Le TNF- α est ainsi exprimée pour tenter de limiter la progression de la masse adipeuse ⁽¹⁹⁷⁾. Cette hypothèse est supportée par une grande quantité d'études qui démontrent clairement que l'expression de TNF- α est augmentée de façon significative dans la pathogenèse de l'obésité et qu'il exerce un effet anti-adipogénique ^(199,200). Plusieurs études effectuées sur des animaux suggèrent que le TNF- α contrôle de façon centrale la régulation du poids corporel, soit en diminuant l'apport énergétique ou par induction de la thermogénèse ^(201,202,203). Un des effets périphériques du TNF- α est l'inhibition de l'activité de la LPL ^(204,205,206), la diminution de l'expression du transporteur de glucose GLUT-4 ⁽²⁰⁷⁾, l'inhibition de l'activité du récepteur de l'insuline ^(208,209) ainsi que

l'induction de la production de la leptine par les cellules adipeuses ⁽²¹⁰⁾. De plus le TNF- α inhibe la différenciation ⁽²¹¹⁾ et stimule l'apoptose des adipocytes ⁽²¹²⁾. L'absence complète de TNF- α ou de ces deux récepteurs résulte en une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses ^(213,214). Par conséquent, soit par l'action directe sur l'activité de la LPL ou en favorisant un état de résistance à l'insuline, la production du TNF- α par les adipocytes pourrait être un mécanisme aidant à limiter la progression de l'obésité.

L'implication de TNF- α dans l'hypertension a été étudiée chez le rat ^(215,119,216), mais moins chez l'humain. La majorité des études chez l'humain évalue son implication dans le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline. Il a été démontré que le TNF- α augmente la production de l'endotéline-1 ^(217,218) et de l'angiotensinogène ^(219,220). De plus, il a été démontré que le TNF- α est impliquée dans le développement de l'obésité associée à la résistance à l'insuline qui est un des mécanismes proposés de l'obésité associée à l'hypertension ⁽²²¹⁾.

Chapitre 2 : Étude structure-fonction du récepteur AT₁.

Article 1 : N-glycosylation requirements for the AT_{1a} angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane.

Benoit Deslauriers, Cecilia Ponce, Colette Lombard, Renée Larguier, Jean-Claude Bonnafous et Jacky Marie.

Biochem. J. (1999) 339, 397-405.

Version électronique : <http://www.biochemj.org/bj/339/0397/bj3390397.htm>

Reproduced with permission, from authors, 1999, Biochemical Journal, 339,397-405 © the Biochemical Society

N-glycosylation requirements for the AT_{1a} angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane.

Benoit Deslauriers*§, Cecilia Ponce§, Colette Lombard§, Renée Larguier§, Jean-Claude Bonnafous§ and Jacky Marie§¹.

* Laboratoire de médecine moléculaire, Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal, 3840 St-Urbain, Montréal, Québec, H2W 1T8, Canada.

§ INSERM Unité 439, 70 rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France

¹ To whom correspondence should be addressed (e mail marie@u401.montp.inserm.fr)

Abbreviation used: AII, angiotensin II; GPCR, G-protein-coupled receptor; SAR, sarcosine; IP, inositol phosphate; TBS. Tris-buffered saline; WT, wild-type; PNGase F, peptide-N⁴-(N-acetyl- β -glucosaminyl)asparagine amidase.

Keywords: COS-7, epitope tagging, mutagenesis, photolabelling.

Summary

The purpose of this work was to investigate the role of N-glycosylation in the expression and pharmacological properties of the the rat AT_{1a}, angiotensin II (AII) receptor. Glycosylation-site suppression was carried out by site-directed mutagenesis (Asn-»Gln) of Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸ (located on the second extracellular loop) and by the removal of Asn⁴ at the N-terminal end combined with the replacement of the first four amino acids by a 10 amino acid peptide epitope (c-Myc). We generated seven possible N-glycosylation-site-defective mutants, all tagged at their C-terminal ends with the c-Myc epitope. This double-tagging strategy, associated with photoaffinity labelling, allowed evaluation of the molecular masses and immunocytochemical cellular localization of the various receptors transiently expressed in COS-7 cells. We showed that: (i) each of the three N-glycosylation sites are utilized in COS-7 cells; (ii) the mutant with three defective N-glycosylation sites was not (or was very inefficiently) expressed at the plasma membrane and accumulated inside the cell at the perinuclear zone; (iii) the preservation of two sites allowed normal receptor delivery to the plasma membrane, the presence of only Asn¹⁷⁶ ensuring a behaviour similar to that of the wild-type receptor; and (iv) all expressed receptors displayed unchanged pharmacological properties (K_d for ¹²⁵I-sarcosine¹-AII; sarcosine¹-AII-induced inositol phosphate production). These results demonstrate that N-glycosylation is required for the AT₁ receptor expression. They are discussed in the light of current knowledge of membrane-protein maturation and future prospects of receptor overexpression for structural studies.

Introduction

Angiotensin II receptors are targets for the octapeptide angiotensin II (AII), one of the major components of the renin angiotensin system [1]. They belong to the G-protein-coupled receptor (GPCR) family, characterized by a seven-trans-membrane-domain topology. Cloned angiotensin receptors have been classified as AT₁ and AT₂ receptor subtypes on the basis of their G-protein coupling and binding of peptidic and non-peptidic drugs [2-5], with the exception of *Xenopus* and turkey receptors, which do not fit with this classification [6]. Extensive studies on structure-function relationships on the AT₁ receptor have already been performed. Molecular modelling and mutagenesis approaches have been widely used to dissect the molecular events underlying recognition of peptide and non-peptide ligands and the process of isomerization between inactive and active conformations involved in receptor activation [7-12].

The amino acid sequence of the rat AT₁ receptor contains three potential sites for N-glycosylation, one at the N-terminus (Asn⁴) and two on the second extracellular loop (Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸). It has been shown previously that a single mutation of any of these Asn residues preserves angiotensin recognition and hormone-induced inositol phosphate (IP) production [13]. In the present work we report a more complete analysis of the role of glycosylation in rat AT₁ receptor function through the construction of receptors corresponding to all possible combinations of saccharidic chain suppression. Mutagenesis experiments were performed on a receptor tagged with a peptide epitope. The effects of the mutations on the properties of the receptor were analysed by testing the ligand binding and coupling properties of the receptors, evaluating the molecular mass of the mutated proteins and checking their cellular localization after transfection in COS-7 cells. We demonstrate

that: (i) the three potential sites of glycosylation of the rat AT_{1a} receptor are utilized in COS-7 cells; (ii) their suppression does not significantly affect the ligand binding and coupling properties of the receptor; (iii) the roles of the various glycosylation sites are not equivalent and specific preservation of one or two of them, according to their localization, is required for the correct delivery of the receptor to the plasma membrane. Furthermore, this work demonstrates that epitope tagging of the AT₁ receptor is suitable not only for cellular visualization and characterization of the receptor but also for its immunoprecipitation, the latter being a prerequisite for purification of the receptor that will be required in future biochemical or biophysical studies.

Materials and methods

Receptor constructs and site-directed mutagenesis

A sequence encoding 10 amino acids (EQKLISEEDL) of the human c-Myc protein [14] was added at the N- or/and C-termini of the rat AT_{1a} receptor using PCR. In order to reduce the length of the primer encoding the c-Myc-epitope sequence, tagging of the receptor was generated by two steps of amplification with two sets of primers, as described below.

Tagging at the N-terminus

In the first amplification step the primers used were a forward oligonucleotide primer encoding the sequence of the last six amino acids of the c-Myc epitope followed by 21 nucleotides corresponding to amino acids 5-11 of the AT_{1a} receptor, 5'-ATCTCTGAGGAGGACCTGTCTTCTGCTGAAGATGGTATC-3' (primer 1) and a reverse primer corresponding to nucleotides 526-546 of the AT_{1a} receptor sequence, 3'-TTATAGTGTCACACGCGCAA-5' (primer 2). Primer 1 and primer 2 were used to amplify a 0.55kb fragment using the AT_{1a} receptor cDNA cloned in the PECE vector [15] as a template. PCR conditions were: 30 cycles at 94 °C for 1 min, 67 °C for 1.5 min, 72 °C for 2 min. The amplified fragment was gel purified and used as a template for a second PCR amplification step using a forward oligonucleotide primer encoding a *Bg*III site followed by an ATG initiation codon, the complete sequence of the c-Myc epitope and the first five nucleotides of the new AT_{1a} receptor sequence, 5'-ACGAAGATCTATGGAGCAGAAGCTGATCTCTGAGGAGGACCTGTCTTC-3' (primer 3). The reverse primer was primer 2 and PCR conditions were the same as in the first round of amplification. This second amplified fragment was digested with *Bg*III and *Dra*III sites. The PECE vector containing the cDNA sequence of the AT_{1a} receptor was also digested with *Bg*II and *Dra*III, gel-purified and the digested PCR fragment was inserted into the linearized plasmid. This construct contained an ATG initiation codon followed by the c-Myc-epitope sequence and the AT_{1a} receptor sequence starting at the fifth amino acid. The first four amino acids were excluded, including Asn⁴, which belongs to the consensus glycosylation site located at the N-terminus. This construct was named myc-N.

Tagging at the C-terminus

In the first round of amplification, the forward primer corresponded to nucleotides 388-405 of the AT_{1a} receptor cDNA: 5'-ATCGTCCACCCAATGAAG-3' (primer 4). The reverse primer matched the last 27 nucleotides of the AT_{1a} coding sequence, excluding the TGA stop codon (nucleotides 1056-1077), followed by a sequence encoding the first seven amino acids of the c-Myc epitope: 3'-CGGACGCAGAACAAAACCTCCACCTCCTCG-TCTTCGACTAAAGGCTC-5' (primer 5). Primers 4 and 5 were used to amplify a 0.72kb fragment using the AT_{1a} receptor cDNA cloned in the PECE vector as a template. PCR conditions was identical to those used for epitope tagging at the N-terminus. The amplified fragment was gel purified and used as a template for amplification, in conditions as already indicated, with primer 4 as the forward primer and a reverse primer matching the last 24 nucleotides of the fragment followed by the sequence encoding the missing part of the c-Myc-epitope sequence, a stop codon and a sequence encoding an *Sma*I site, 3'-CTCCTCGTCTTCGACTAAAGGCTCCTCCTGGACACTGGGCCCCCT-5' (primer 6). The amplified fragment was digested with *Dra*III. And *Xma*I (isoschizomer of *Sma*I). The PECE plasmid containing the AT_{1a} receptor sequence was digested with *Dra*III and *Xma*I, gel purified and ligated with the digested amplified fragment. This construct contained the complete AT_{1a} receptor cDNA sequence fused to the c-Myc-epitope sequence at its C-terminus; it was named myc-C.

The cDNA containing the c-Myc epitope at the N- and C-termini was obtained by inserting the digested *Dra*III-*Sma*I fragment of the PECE-myc-C construct into the PECE-myc-N construct, which was digested with *Dra*III and *Xma*I, and gel-purified. It was named myc-N-C.

The chimaeric cDNAs were excised from the PECE plasmid using *Bgl*III and *Xba*I restriction enzymes and subcloned into the *Bam*HI. and *Xba*I sites of the M13mp18 vector. Site-directed mutagenesis was performed by using the oligonucleotide-directed in vitro 'sculptor' mutagenesis system (Amersham). Oligonucleotides that changed Asn for Gln at positions 176 and 188 were 5'-CGCACACTGTGATTTGGGTGTTCTCGATG-3' and 5'-GGGAGCGTCGATTGCCGAGACTCATAAT-3', respectively. The sequences of the tagged cDNA constructs as well as the successful introduction of mutations were verified by sequencing using the dideoxynucleotide chain-termination method (T7 sequencing kit, Pharmacia Biotech). Wild-type (WT) and mutated receptors were subcloned into the *Xma*I site of the pCMV vector [16] for expression in COS-7 cells.

Expression of WT and mutated receptors In COS-7 cells

Receptors were transiently expressed in COS-7 cells by using the electroporation transfection method: briefly, 10^7 cells were resuspended in 300 μ l of electroporation buffer (50 mM K_2HPO_4 /20 mM KOH/20 mM CH_3COOK) and incubated for 10 min at room temperature in an electroporation cuvette (0.4-cm electrode gap, Bio-Rad) with 20 μ g of pCMV carrier and different amounts of pCMV containing cDNA receptor sequences (0.1-2 μ g range). Cells were submitted to an electric discharge (950 mF, 280 V, 50 ms) and cultured for 2 days in Dulbecco's modified Eagle's medium/4.5 g/l glucose/10% fetal calf serum/ 100 units/ml streptomycin.

Ligand-binding assays

Sarcosine (Sar¹)-AII (Bachem) was radioiodinated as described previously [17]. [¹²⁵I]Sar¹-AII binding experiments were performed on intact cells cultured in 12-well plates. Transfected COS-7 cells were washed twice with PBS and incubated at 4 °C for 4 h, with various concentrations (0.01-10 nM) of [¹²⁵I]Sar¹-AII in the presence or absence of a 200-fold excess of Sar¹-AII in PBS (pH 7.4)/5 mM MgCl₂/1 mg/ml bacitracin/1 mg/ml BSA. Bound radioactivities were evaluated after washing the cells twice with binding medium and collecting them in 500 µl of 0.1 M NaOH.

IP assays

COS-7 cells expressing the WT and mutant receptors were grown in 6-well plates and labelled for 24 h with myo-[2-³H]inositol (1.5 ml/plate, 1 mCi/ml; DuPont NEN) in Medium 199 deprived of serum. Before stimulation, cells were incubated at 37 °C for 1h in IP buffer [116mM NaCl/4.7 mM KCl/1.2mM MgSO₄/2.5mM CaCl₂/1.2mM KH₂PO₄ /5 mM NaHCO₃/20 mM Hepes/11 mM glucose/0.5 mg/ml bacitracin/0.5 mg/ml BSA (pH 7.4)]. After 15 min of preincubation in IP medium containing 10 mM LiCl, cells were incubated for 15 min at 37 °C, in the same medium in the presence or absence of Sar¹-AII. Pooled IPs were extracted and measured as described previously [18].

Photoaffinity labelling and Immunoblotting analysis

Photoaffinity labelling of WT and mutated receptors

COS-7 cells grown on 15-cm plates were washed twice with PBS and incubated in the dark for 4 h at 4 °C in binding buffer containing 3 nM [¹²⁵I]Sar¹,(4'-N₃)Phe⁸-AII [19] in the presence or absence of 5 x 10⁻⁷ M Sar¹-AII. Cells were washed twice with PBS/5 mM MgCl₂ (pH 7.4). Then the medium was removed and the cell layer was irradiated with UV light (254 nm) for 7 min on ice. Photolysed cells were scraped with a rubber policeman in 1.5ml of 10 mM Tris/HCl (pH 7.4)/1 mM PMSF/5 mM EDTA/1% SDS (SDS solubilization buffer), homogenized and incubated for 20 min at room temperature to ensure solubilization of the receptors with a maximal yield (approximately 85%). Then cell lysates were centrifuged at 14000 g for 20 min at 15°C.

Photolabelled proteins were separated by SDS/PAGE (10 % gel) under denaturing conditions according to Laemmli's protocol [20]. Gels were fixed in a methanol/glycerol/water mixture (20:1:79, by vol.), dried and exposed to Kodak XAR-5 film at -80°C.

Immunoprecipitation of photolabelled receptors

COS-7 cells grown on 15-cm plates were washed twice with PBS and then homogenized in 1.5ml of 10 mM Tris/HCl (pH 8)/1 mM PMSF/5 mM EDTA/137mM NaCl/10% glycerol/ 1% Triton X-100 (Triton solubilization buffer). Homogenates were incubated at room temperature for 20 min to ensure optimal solubilization of the receptors (receptor solubilization yield approx. 60%), then centrifuged at 14000 g for 20 min. Solubilized COS-7 cell extracts (500 μ l) containing receptors photolabelled with [125 I]Sar¹,(4'-N₃)Phe⁸-AII were incubated overnight at 4 °C with a monoclonal anti-c-Myc antibody 9E10 [14] (10 μ l of ascites fluid), then for 2 h at 4 °C with 100 μ l of a suspension of Protein A-Sepharose beads (2 mg of Protein A/ml of Sepharose beads; Sigma). The sedimented beads were washed three times with 1 ml of cold Triton solubilization buffer, then resuspended in 100 μ l of Laemmli buffer and heated at 100 °C for 5 min. Samples were analysed on a 10% polyacrylamide gel. Immunoprecipitation yields were estimated from the radioactivities in gel slices corresponding to the covalent receptor complexes.

Immunoblotting

Transfected cells grown in 15-cm plates were washed twice with PBS (pH 7.4) and solubilized in 1.5ml of SDS solubilization buffer, as indicated for the photolabelling experiments. The cell lysates were submitted to SDS/PAGE (10% gel) and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 μ m; Bio-Rad) in 25 mM Tris/192mM glycine/20% methanol. The nitrocellulose membrane was incubated overnight at 4 °C with

an anti-c-Myc antibody 9E10 (dilution 1:100 of ascites fluid) in 50 mM Tris/HCl/150 mM NaCl/0.5 mg/ml sodium azide/10% low-fat milk (pH 7.4; Tris-buffered saline, or TBS buffer). After washing, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse IgG antibody (1:4000 dilution) coupled to peroxidase (Boehringer Mannheim) in TBS buffer containing 0.1% Tween-20. The membrane was washed and proteins were detected by chemiluminescence using the bioluminescence kit from Boehringer Mannheim.

Enzymic deglycosylation

Transfected cells (1.5×10^7) were homogenized in 1 ml of 5 mM Tris/HCl/1 mM $MgCl_2$ /protease inhibitors: 10 mg/ml leupeptin/20 mg/ml antipain/100 mg/ml benzamidine/ 10^5 units of aprotinin (pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 100 g for 5 min at 4 °C and the supernatants were centrifuged at 40000 g for 10 min at 4 °C. The protein pellets were solubilized in 1 ml of 5 mM Tris/HCl/1 mM $MgCl_2$ /1 % Triton X-100/1 mM PMSF (pH 7.4). Samples (50 μ l) containing 50 μ g of protein were treated with 1.5 units of peptide- N^4 -(N-acetyl- β -glucosaminy)asparagines amidase (PNGase F; Genzyme) for 18h at 32 °C before SDS/PAGE analysis.

Subcellular localization of tagged receptors In COS-7 cells

Transfected cells were grown on glass coverslips. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 1 h at room temperature. Fixed cells were washed three times with PBS. Cell permeabilization was carried out by incubating fixed cells for 4 min with 0.2% Triton X-100 in PBS and washing them three times with PBS. Cells were incubated for 30 min in PBS containing 3% BSA and incubated overnight with the anti-c-Myc antibody 9E10 (1:100 dilution) in PBS containing 0.5% BSA. After extensive washings, the cells were incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-mouse antibody coupled to Rhodamine (1:500 dilution; GamIg TRITC, Nordic) in PBS containing 0.5% BSA. After three 30 min washes, the cells were rinsed with PBS. Conventional immunofluorescence microscopy was performed using a Zeiss Axiophot microscope equipped with a Zeiss Neofluar 63 x 1.25 objective.

RESULTS

Expression and pharmacological properties of WT and mutated receptors

The AT₁ receptor amino acid sequence possesses three potential sites for N-glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr): one at the N-terminal end of the receptor (Asn⁴) and two on the second extracellular loop (Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸). Figure 1 shows the different receptors that we used in this study with combined mutations at the three consensus N-glycosylation sites. All modified receptors were generated on the AT₁ receptor bearing a sequence encoding a 10 amino acid epitope (c-Myc) at its C-terminal end (myc-C). The receptor lacking the first potential glycosylation site was generated by deleting the first four amino acids, including Asn⁴, and introducing at the N-terminus an additional c-Myc epitope (myc-N-C). The purpose of this modification was to allow receptor detection from the outside of the cell, the absence of proximate bulky saccharidic chains being liable to favour c-Myc-epitope recognition by a specific antibody. As indicated below, elimination of Asn⁴ and addition the c-Myc epitope at the N-terminus of the receptor had no effect on function and expression of the receptor and allowed efficient receptor detection.

Epitope tagging of the receptor at the N- or C-termini did not modify the binding properties of the receptor, as shown by unchanged dissociation constants (K_d) for [¹²⁵I]Sar¹AIID and maximal binding capacities (B_{max}) of WT and tagged receptors measured on intact transfected COS-7 cells (for details, see Table 1). Expression levels of the various

constructs were checked after COS-7 cell transfection with variable amounts of cDNA up to 2 μg (Table 1 and Figure 2). All the receptors possessing two glycosylation sites were expressed at levels similar to that of the WT receptor. The suppression of two glycosylation sites drastically reduced receptor expression with the exception of the receptor possessing Asn¹⁷⁶ (myc-N-C, Q188) (Table 1 and Figure 2), which emphasizes the essential role of this site. The expression level of the fully defective mutant (myc-N-C, Q176,Q188) was only 3% of the WT receptor (Table 1 and Figure 2). These results indicate that the glycosylation site at the Asn¹⁷⁶ residue is sufficient but not necessary for normal expression of the receptor and suggest that N-glycosylation is required for efficient expression of the receptor at the surface of the cell. When binding was detectable, all the defective glycosylation site mutants displayed unchanged binding affinities for [¹²⁵I]Sar¹AII as compared with the WT receptor (see K_d values shown in Table 1).

Angiotensin-stimulated IP production of cells transfected with WT and mutant receptors

COS-7 cells were transfected with 100 ng of cDNA of WT, myc-C, myc-N-C, myc-N-C, Q176 and myc N-C, Q188 and 2 μg of cDNA of myc-N-C, Q176, Q188 in order to obtain similar expression levels of the WT and mutant receptors [(2-3) $\times 10^5$ sites/cell]. As shown in Table 1, the extent of maximal IP production was very similar for WT and mutant receptors when stimulated with Sar¹-AII (10^{-7} M), suggesting that N-glycosylation does not play a significant role in AII-stimulated IP production via receptor coupling to phospholipase C.

Evaluation of carbohydrate addition at the potential N-glycosylation sites by molecular-mass determination of WT and mutant receptors

Analysis of photolabelled receptors by SDS/PAGE and autoradiography

Photoaffinity labelling of WT and mutant receptors were carried out using the iodinated photoreactive probe [^{125}I]Sar¹,(4'-N₃)phe⁸-AII. This agonist probe of the AT₁ receptor has been shown to be suitable for specific covalent labelling of the AT₁ receptor [19] and has been used for molecular-mass determination of AT₁ receptors from different tissues and species [19,21,22].

As shown in Figure 3, photoaffinity labelling of c-Myc-epitope-tagged receptor expressed in COS-7 cells followed by SDS/PAGE and autoradiography analysis led to the detection of a protein with a molecular mass of 153±12kDa, similar to the WT receptor (Figure 3A, lanes a and b). This labelling was specific, and was suppressed when performed in the presence of excess Sar¹AII. The molecular mass of the detected protein, which was much higher than the one calculated from its amino acid sequence [41 kDa (WT receptor) + 1.2 kDa (c-Myc epitope)], as well as the breadth of the band, indicated that the AT₁ receptor was highly glycosylated when expressed in COS-7 cells. The molecular mass of the photolabelled mutant lacking Asn⁴ (myc-N-C) was reproducibly lower than that of myc-C, but the shift could not be accurately estimated due to the low resolution of polyacrylamide gels in the corresponding range of molecular mass (Figure 3A). The contribution of Asn⁴ to the shift in molecular mass could more easily be seen for mutants

lacking an additional glycosylation site [compare myc-N-C, Q176 and myc-N-C, Q188 with myc-C, Q176 and myc-C, Q188 (Figure 3B)]; it was estimated to 25-30 kDa. N176Q and N188Q mutations induced decreases in the molecular masses of the photolabelled receptors (85 ± 6 and 80 ± 1 kDa for myc-N-C, Q176 and myc-N-C, Q188 mutants respectively; Figure 3B), indicating that Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸ are sites for carbohydrate addition. Taken together these data demonstrate that each of the three potential N-glycosylation sites is utilized in COS-7 cells.

As the fully glycosylation-defective mutant (myc-N-C, Q176, Q188) was poorly expressed at the plasma membrane, its molecular mass could not be evaluated through photolabelling and autoradiography.

Immunoblotting detection of WT and mutant receptors

Single tagging (N- or C-terminal) of the AT₁ receptor did not allow its efficient detection through SDS/PAGE analysis of COS-7 cell extracts and immunoblotting. However, the epitope-tagged receptors solubilized in 0.1% Triton X-100 detergent could be immunoprecipitated with anti-c-Myc antibodies adsorbed on Protein A-Sepharose beads, with a yield of 40% (results not shown). These results indicate that the epitope was not easily accessible when the protein was denatured in SDS and transferred to nitrocellulose membrane. Double tagging of the receptor (myc-N-C) not only increased the yield of receptor immunoprecipitation up to 60% (results not shown), but also increased the sensitivity of immunoblotting detection. Thus only receptors bearing the epitope at the two

N- and C-terminal ends (lacking Asn⁴) were analysed by Western blotting. As shown in Figure 4, two major bands were detected by the c-Myc antibody for myc-N-C, myc-N-C, Q176 and myc-N-C, Q188: low-molecular-mass forms (35-43 kDa), present in the three mutants, and higher-molecular-mass forms with sizes varying with the analysed receptor. As shown in Figure 4 (lane a), the staining was specific for the c-Myc epitope; no band was detected in cell extract containing the WT receptor. The high-molecular-mass bands detected by the c-Myc antibody corresponded to those detected by receptor photolabelling; they probably represented molecular forms of receptors that had reached the plasma membrane and were accessible to labelling on intact cells. As already found in photolabelling experiments (Figure 3), a shift of these immuno-detected bands was observed for the N176Q and N188Q mutants (Figure 4, lanes c and d), confirming that Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸ bear carbohydrate chains. The low-molecular-mass band was heterogeneous except for the case of the fully defective glycosylation-site mutant (myc-N-C, Q176, Q188; Figure 4, lane e), this latter was characterized by a 35 kDa entity corresponding to the lower-molecular-mass component detected for the other mutants (Figure 4, lanes b, c and d). This band is characteristic of the fully deglycosylated receptor, as it was not significantly shifted upon PNGase F treatment (Figure 5, lane b); it was obtained through enzymic treatment of the glycosylated receptor (Figure 5, lane a). One must notice that this value is significantly lower than expected from the amino acid sequence of the tagged receptor (41 kDa and 1.8 kDa for the AT₁ receptor and c-Myc epitope, respectively). Such a difference between theoretical and experimental molecular masses has already been observed for angiotensin receptors [23-25] and histamine H₂ receptors [26]. Besides a possible inaccurate estimation of molecular masses by SDS/PAGE, one cannot exclude proteolysis of the receptor, which might be facilitated in the absence of N-linked sugars and would agree with the well-known protecting role of saccharidic chains [27,28]. Such a hypothesis would imply the loss of one of the two c-Myc epitopes; immunoblotting detection in this situation would be facilitated by increased

accessibility of the remaining epitope, as compared with the detection of the glycosylated receptor, which required both tags.

Surprisingly, in some experiments a 64 ± 5 kDa molecular-mass band was detected in cellular extracts prepared from cells expressing the receptor lacking the three consensus N-glycosylation sites (myc-N-C, Q176, Q188; Figure 4, lane e). One can speculate that this band corresponds to aggregated forms of the receptor (its size is consistent with that of a dimer); this hypothesis is supported by data reporting the existence of multimeric forms of GPCR resistant to denaturing conditions [29-31]. The very-high-molecular-mass bands detected for other mutants might reflect the presence of aggregated forms of fully or partially glycosylated receptors.

Subcellular localization of WT and N-glycosylation-site-defective receptors

In order to verify the fate of mutant receptors that could not be detected through radioligand binding, their expression was checked in intact COS-7 cells by indirect immunostaining using a monoclonal anti-c-Myc antibody and a Rhodamine-labelled anti-mouse antibody. Staining of COS-7 cells transfected with the receptor bearing the c-Myc epitope at its C-terminus was only visible when they were permeabilized (Figure 6, row 2). The intracellular staining, localized at the inner face of the plasma membrane and inside the cell, was specific, as shown by its absence on cells transfected with the WT receptor (Figure 6, row1). As expected, the same pattern was obtained with cells transfected with

receptor tagged at both ends (myc-N-C; Figure 6B, row 3). However, this latter could be detected from the outside without cell permeabilization (Figure 6A, row 3). These results indicate that the receptor lacking the Asn⁴ residue was normally expressed at the plasma membrane, thus confirming the [¹²⁵I]Sar¹-AII-binding experiments. As shown in Figure 6, receptors mutated at both Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸ (myc-C, Q176, Q188) or lacking the three consensus glycosylation sites (myc-N-C, Q176, Q188) were not detected on the surface of non-permeabilized cells, but could be stained inside permeabilized cells. These data are in agreement with the very low or undetectable [¹²⁵I]Sar¹-AII-binding (see binding experiments, Table 1), demonstrating that these mutants displayed impaired trafficking to the plasma membrane. Although the identification of the stained intracellular compartments requires further studies, the perinuclear localization of these mutants suggests that they might be sequestered to the endoplasmic reticulum.

DISCUSSION

The role of N-glycosylation in the pharmacological properties and expression of GPCR has been investigated for some members of this family [26,32-39]. As do most heptahelical receptors, the rat AT₁ AII receptor possesses several potential consensus sites for N-glycosylation [6,9], one located at the N-terminus (Asn⁴) and two located in the second extracellular loop (Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸). A preliminary study of Yamano *et coll.* [13] reported that individual mutations of these sites had no effect on receptor function. The purpose of the more detailed mutagenesis study reported in the present work was to investigate the role of N-linked saccharidic chains on receptor functions: expression at the plasma membrane. All recognition and phospholipase C-coupling properties. The work

involved photoaffinity labelling, and epitope tagging of the WT and mutant receptors for their detection through immunoblotting and immunocytochemical cellular localization. All the mutants were generated on a receptor bearing a 10 amino acid c-Myc epitope at the C-terminal end of the receptor. Asn¹⁷⁶ and Asn¹⁸⁸ were mutated into Gln while Asn⁴ was removed by deleting the first four amino acids and replacing them with an additional c-Myc sequence. This double tagging was shown to amplify the sensitivity of receptor immune-detection by Western blotting. The introduction of these tags, including N-terminal tagging associated with Asn⁴ suppression, did not modify [¹²⁵I]Sar¹-AII-binding, phospholipase C coupling or processing properties of the receptor. SDS/PAGE analysis of photolabelled receptors and immunoblotting detection together with enzymic deglycosylation demonstrated that the three potential N-glycosylation sites actually bear carbohydrate chains in COS-7 cells, as assessed by the striking changes in the molecular masses of mutant receptors. An extensive analysis of the properties of mutant receptors lacking one or several glycosylation sites allowed us to draw conclusions about the requirements for normal expression. N-glycosylation is required for receptor expression at the plasma membrane as the receptor lacking the three sites could be detected neither by ligand binding nor by immunocytochemical detection in non-permeabilized intact cells. We also demonstrated that the presence of two sites, irrespective of their localization, allowed an expression level similar to that of the WT receptor. Interestingly, only the preservation of Asn¹⁷⁶ insured optimal expression. The same was not found for Asn⁴ and Asn¹⁸⁸, demonstrating that the roles of the saccharidic chains at the various sites are not equivalent. All the mutant receptors that were expressed at the plasma membrane displayed unchanged pharmacological properties (K_d for [¹²⁵I]Sar¹-AII-binding; Sar¹-AII-induced IP production) as compared with the WT receptor.

Epitope tagging has allowed us to monitor the cellular localization of the various receptors. The validity of the strategy and experimental conditions can be verified; N-

terminal tagging with the c-Myc epitope proved to be appropriate for the specific detection of expressed receptors from the outside of the cell, whereas intracellular receptors were detected in permeabilized cells. We confirmed that mutant receptors that were undetectable by ligand binding to intact cells were not expressed at the plasma membrane; moreover they were normally detected intracellularly, indicating that their biosynthesis was not affected by glycosylation-site suppression. The immunochemical staining was more concentrated near the nucleus, suggesting that the protein accumulates in the endoplasmic reticulum of the cell. As a consequence, the lack of delivery of some glycosylation-deficient mutants can be interpreted as resulting from their impaired folding. Indeed, the role of N-glycosylation on protein maturation has been documented widely and a folding process based on the binding of the lectins calnexin and calreticulin to the newly synthesized glycoprotein has been described [40,41]. Although calnexin-dependent and -independent mechanisms have been postulated to participate in the conformational maturation of the vasoactive intestinal peptide 1 receptor [35], studies on the relationships between N-glycosylation and molecular chaperones, such as lectins present in the ER, remain to be extended to other GPCRs. Up to now, a general role for N-glycosylation within this family has not been clarified. Whereas N-glycosylation requirements for the trafficking of the β_2 adrenergic receptor [32-34], vasoactive intestinal peptide 1 receptor [35], rhodopsin [36] and gonadotropin-releasing hormone receptor [37] have been reported, N-glycosylation is not essential for the processing of m_2 muscarinic receptor [38], histamine H_2 receptor [26] or parathyroid receptor [39]. The role of N-glycosylation in the AT_1 -receptor trafficking might explain the difficulties we encountered for its expression in SF9 insect cells (D. Solier, J. C. Bonnafous and J. Marie, unpublished work) and *Escherichia coli* (B. Berlin, J. Marie and D. Strosberg, personal communication), which are cell systems in which oligosaccharide processing is lacking (*E. coli*) or differs from that of mammalian cells (SF9 cells) ([42] and references cited therein). The difficulty of expressing functional receptors in *E. coli* could be overcome by forcing their accumulation in inclusion bodies and reconstituting them in lipid vesicles, as shown by an elegant study

of an olfactory receptor [43]. Nevertheless, the development of eukaryotic systems for GPCR overexpression appears the most straightforward, as shown for rhodopsin [44]. The development of overexpression and purification systems [42] remains, to date, a challenge for most of the laboratories working on structure-function relationships of GPCRs, including their physicochemical or biophysical characterization. In this respect, the present work constitutes a prerequisite for future structural studies, in as much as it has delineated a set of receptor constructs that allow preservation of expression properties and are adapted to their purification using c-Myc antibodies.

This work was supported by INSERM, CNRS and Laboratoires Fournier (Daix, France). We thank A. Cohen Solal and B. Mouillac for supplying the ascites fluid containing the 9E10 antibody.

REFERENCES

- 1 Valloton, M. B. (1987) *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 69-74
- 2 Mukoyoma, M., Nakajima, M., Hioriuchi, M., Sasamura, H, Pratt, R. E. and Dzau, V, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 24539-24542
- 3 Kambayashi, Y., Barhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Hiroshi, I., Hamakubo, T. and Inagami, T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 24543-24546
- 4 Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. and Bernstein, K. E. (1991) *Nature (London)* 351, 233-236

- 5 Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N, Murry, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T. (1991) *Nature (London)* 351, 230-233
- 6 Sandberg, K. (1994) *Trends Endocrinol. Metab.* 5, 28-35
- 7 Marie, J., Maigret, B., Joseph, M. P., Languier, R., Nouet, S., Lombard, C. and Bonnafous, J. C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 21583-21586
- 8 Joseph, M. P., Maigret, B., Bonnafous, J. C., Marie, J. and Scheraga, H. A. (1995) *J. Protein Chem.* 14, 381-398
- 9 Hunyady, L, Balla, T. and Catt, K. J. (1996) *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 135-140
- 10 Noda, K., Feng, Y. H., Liu, X. P., Saad, Y., Husain, A. and Karnik, S. S. (1996) *Biochemistry* 35, 16435-16442
- 11 Groblewski, T., Maigret, B., Languier, R., Lombard, C., Bonnafous, J. C. and Marie, J. M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 1822-1826
- 12 Inoue, Y., Nakamura, N. and Inagami, T. (1997) *J. Hypertens.* 15, 703-714
- 13 Yamano, Y., Ohyama, K., Shigeyuki, C., Deng-Fu, G. and Inagami, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1426-1431
- 14 Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M. (1985) *Mol Cell Biol* 53610-3616
- 15 Ellis, L, Clauser, E., Morgan, D., Edery, M., Roth, R. A. and Rutter, W. J. (1986) *Cell* 45, 721-732
- 16 Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H. W., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H., Kohr, W. J. and Goeddel, D. V. (1990) *Cell* 61, 361-370

- 17 Bonnafous, J. C., Tence, M., Seyer, R., Marie, J., Aumelas, A. and Jard, S. (1988) *Biochem. J.* 251, 873-880
- 18 Paquet, J. L, Baudouin-Legros, M., Brunelle, G. and Meyer, P. (1990) *J. Hypertens.* 8, 565-572
- 19 Guillemette, G., Guillon, G., Marie, M., Balestre, M. N., Escher, E. and Jard, S. (1986) *Mol. Pharmacol.* 30, 544-551
- 20 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685
- 21 Carson, M. C., Harper, C. M., Baukal, A. J., Aguilera, G. and Catt, K. J. (1987) *Mol. Endocrinol.* 1, 147-153
- 22 Marie, J., Seyer, R., Lombard, C., Desarnaud, F., Aumelas, A., Jard, S. and Bonnafous, J. C. (1990) *Biochemistry* 29, 8943-8950
- 23 Desarnaud, F., Marie, J., Lombard, C., Larguier, R., Seyer, R., Lorca, T., Jard, S. and Bonnafous, J. C. (1993) *Biochem. J.* 289, 289-297
- 24 Servant, G., Dudley, D. T., Escher, E. and Guillemette, G. (1994) *Mol. Pharmacol.* 45 1112-1118
- 25 Servant, G., Dudley, D. T., Escher, E. and Guillemette, G. (1996) *Biochem. J.* 313, 297-304
- 26 Fukushima, Y., Oka, Y., Saitoh, T., Katagiri, H., Asano, T., Matsuhashi, N., Takata, K., Breda, E. V., Yazaki, Y. and Sugano, K. (1995) *Biochem. J.* 310, 553-538
- 27 Us, H. and Sharon, N. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218, 1-27
- 28 Gahmberg, C. G. and Tolvanen, M. (1996) *Trends Biochem. Sci.* 21, 308-311

- 29 Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C. and Bouvier, M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 16384-16392
- 30 Maggio, R., Barbier, P., Fornai, F. and Corsini, G. U. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 31055-31060
- 31 Cvejic, S. and Devi, L. A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26959-26964
- 32 George, S. T., Ruoho, A. E. and Malbon, C. C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 16559-16564
- 33 Boege, F., Ward, M., Jurss, R., Hekman, M. and Helmeich, E. J. M. (1986) *J. Biol. Chem.* 263, 9040-9049
- 34 Rands, E., Candelore, M. R., Cheung, A. H., Hill, W. S., Srader, C. D. and Dixon, R. A. F. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10759-10764
- 35 Couvineau, A., Fabre, C., Gaudin, P., Maoret, J. J. and Laburthe, M. (1996) *Biochemistry* 35, 1745-1752
- 36 Kaushal, S., Ridge, K. D. and Khorana, H. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4024-4028
- 37 Davidson, J. S., Flanagan, C. A., Zhou, W., Becker, I. I., Elario, R., Emeran, W., Sealfon, S. C. and Millar, R. P. (1995) *Mol. Cell. Endocrinol.* 107, 241-245
- 38 Van Koppen, G. J. and Nathanson, N. M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20887-20892
- 39 Bisello, A., Greenberg, Z., Behar, V., Rosenblatt, M., Suva, L. J. and Chorev, M. (1996) *Biochemistry* 35, 15890-15895
- 40 Hoist, B., Bruun, A. W., Kielland-Brandt, M. C. and Winter, J. R. (1996) *EMBO J.* 15, 3538-3546

- 41 Helenius, A., Trombetta, E. S., Hebert, D. N. and Simons, J. F. (1997) *Trends Cell Biol.* 7, 193-200
- 42 Grishamer, R, and Tate, C. G. (1995) *Q. Rev. Biophys.* 28, 315-422
- 43 Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J. D., Von Heijne, G., Prestwich, G. and Breer, H. (1996) *Biochemistry* 35, 16077-16084
- 44 Reeves, P. J., Thurmond, R. L and Khorana, H. G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11487-11492

Figures et légendes

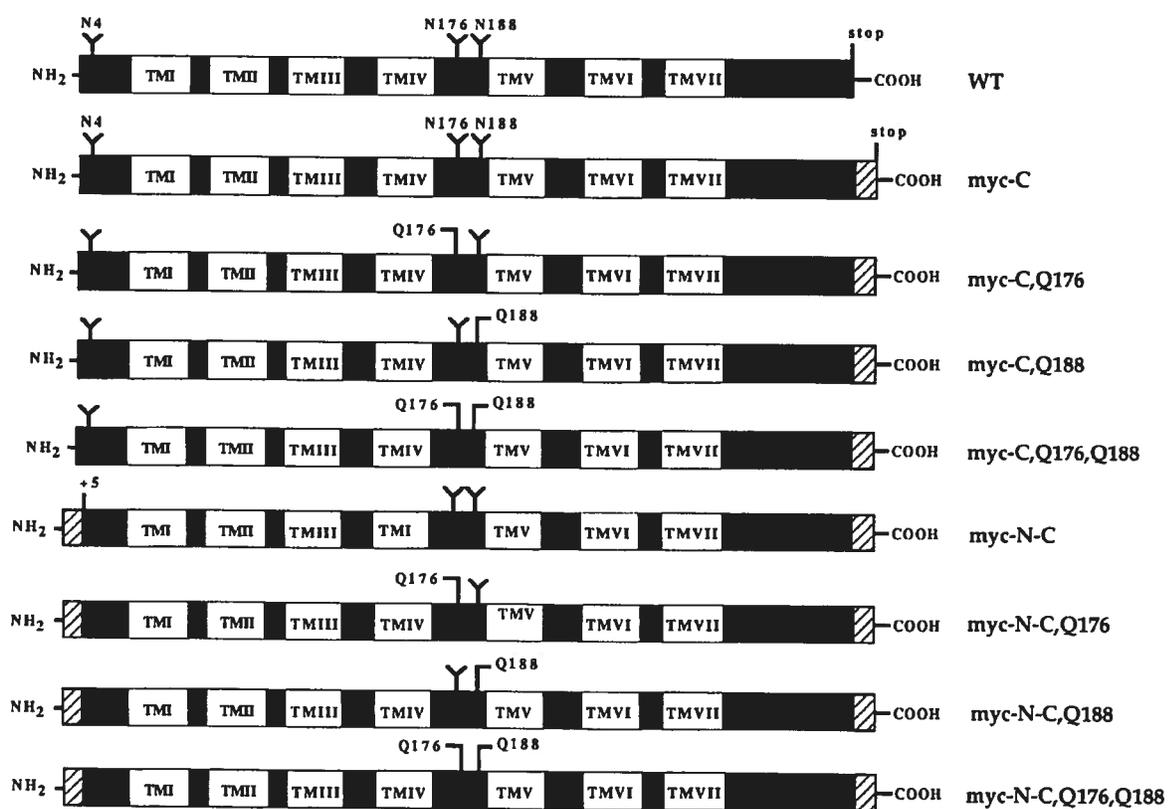


Figure 1

Figure 1 : Schematic representation of N-glycosylation-site-defective receptors

This Figure represents the WT and N-glycosylation-site-defective mutant receptors with their seven transmembrane domains (TM). All the receptors were epitope-tagged with the peptide c-Myc (hatched boxes on right) at their C-termini (myc-C). Asn residues of the consensus sequence Asn-Xaa-Ser/Thr for potential N-glycosylation are Asn⁴ (N4) Asn¹⁷⁶ (N176) and Asn¹⁸⁸ (N188). An Asn⁴-site-defective mutant was obtained by deletion of the first four amino acids [the AT₁ receptor sequence starting at its fifth amino acid (+5)] and addition of a second c-Myc epitope (myc-N-C; hatched boxes on left). Q176, Q188 and Q176,Q188 represent Asn → Gln mutations at positions 176, 188 or both, respectively.

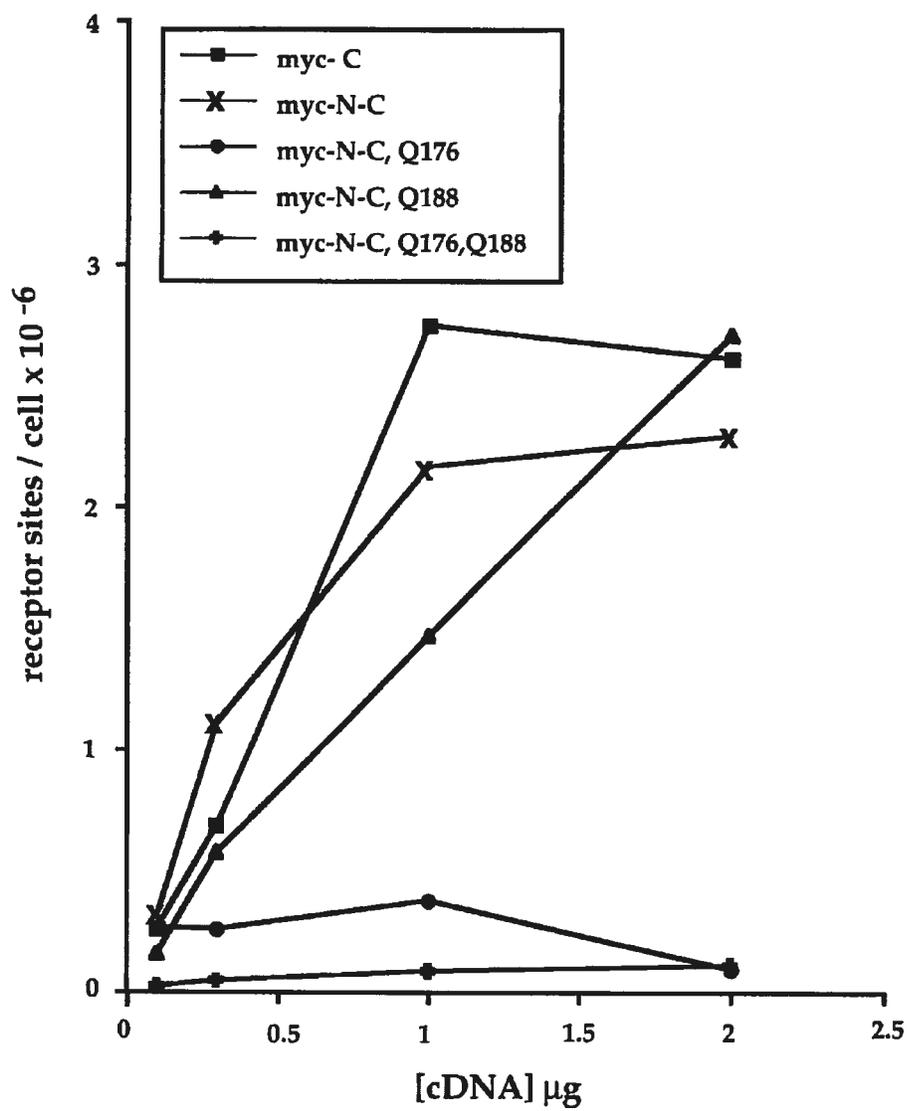


Figure 2

Figure 2: Expression of mutant receptors in COS-7 cells

COS-7 cells were transfected with the indicated amounts of cDNAs encoding the various N-glycosylation-site-defective mutants and the expression levels were determined in intact cells incubated with a saturating concentration of [¹²⁵I]Sar¹-AII (10⁻⁸ M). Non-specific binding was estimated in the presence of a 100-fold excess of unlabelled Sar¹-AII as indicated in the Materials and methods section. Similar results were obtained in three separate experiments.

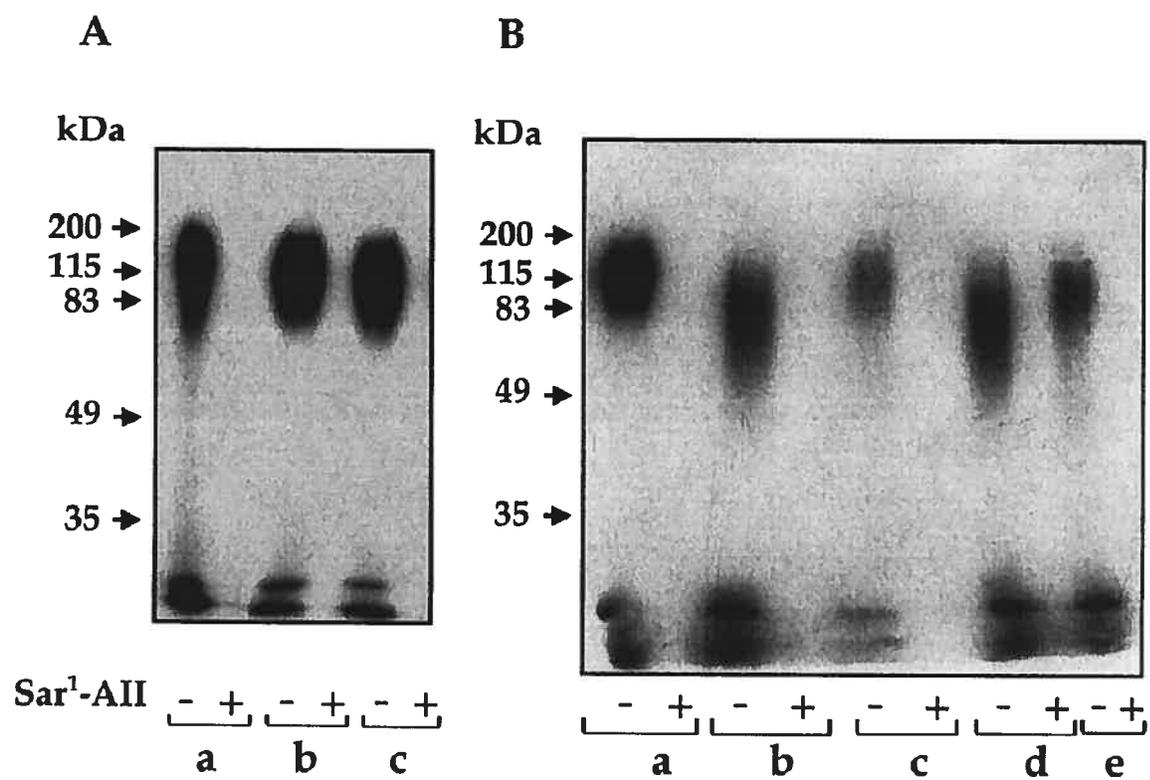


Figure 3

Figure 3 : Electrophoresis pattern of photolabelled mutant receptors

COS-7 cells expressing the receptors at maximal levels were photolabelled with 5 nM [¹²⁵I]Sar¹,(4'-N₃)Phe⁸-AII in the presence (+) or absence (-) of a 100-fold excess of Sar¹-AII. Cell extract containing 10-15fmol of labelled receptors submitted to photolysis [(40-60) x 10³ d.p.m.] were prepared and analysed by SDS/PAGE (10% gel) followed by autoradiography as described in the Materials and methods section. Prestained molecular-mass markers (Bio-Rad) are indicated by arrows. **(A)** Electrophoretic pattern of WT and c-Myc-epitope-tagged receptors. Lane a, WT receptor; lane b, receptor tagged at its C-terminus (myc-C); and lane c, receptor tagged at both N- and C-termini (myc-N-C). **(B)** Electrophoretic pattern of N-glycosylation-site-defective mutants. Lane a, myc-N-C; lane b, myc-N-C, Q176; lane c, myc-C, Q176; lane d, myc-N-C, Q188; and lane e, myc-C, Q188.

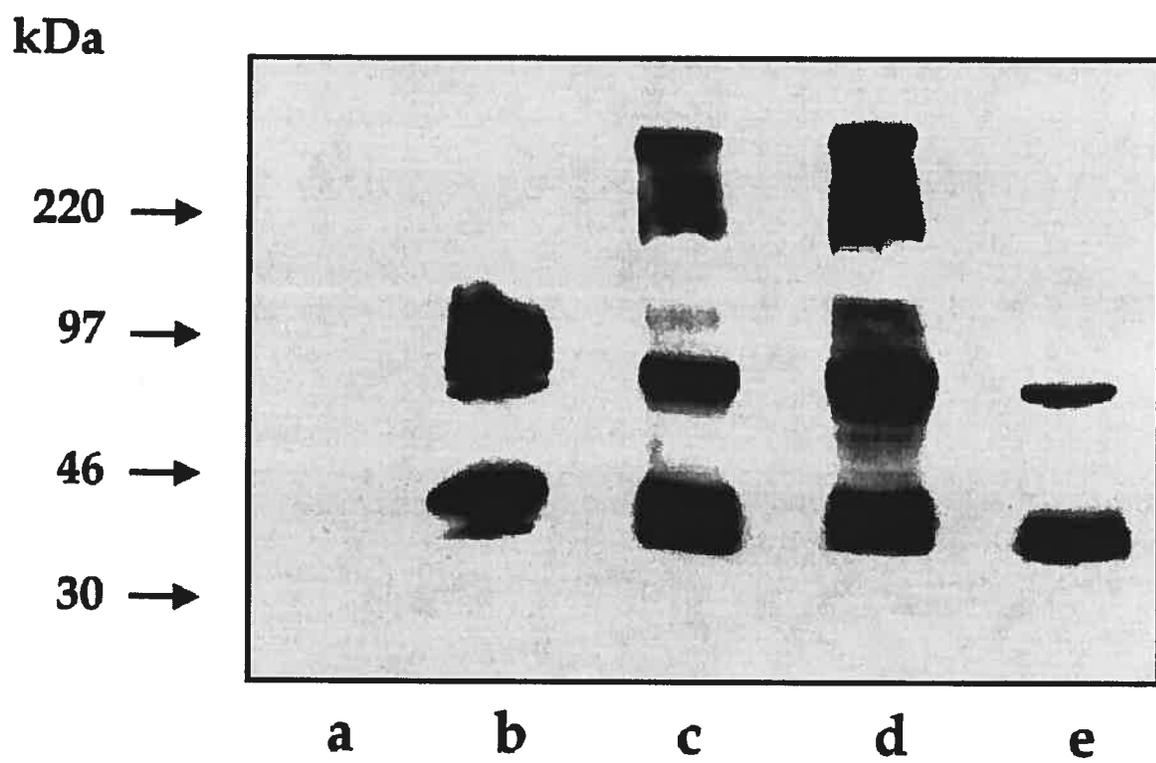


Figure 4

Figure 4 : Western-blot analysis of WT and mutant receptors

COS-7 cells expressing the WT or epitope-tagged mutant receptors were homogenized in SDS solubilization buffer. Extracts (40-50 μg of protein) were submitted to SDS/PAGE (10% gel) and proteins were electroblotted on to a 0.45 μm nitrocellulose membrane. Epitope-tagged proteins were revealed by immunoblotting using anti-c-Myc antibody with chemiluminescence detection as described in the Materials and methods section. Arrows indicate the position of prestained markers (rainbow markers from Amersham). Lane a, WT; lane b, myc-N-C; lane c, myc-N-C, Q176; lane d, myc-N-C, Q188; and lane e, myc-N-C, Q176,Q188. This experiment is representative of four independent experiments which gave similar results.

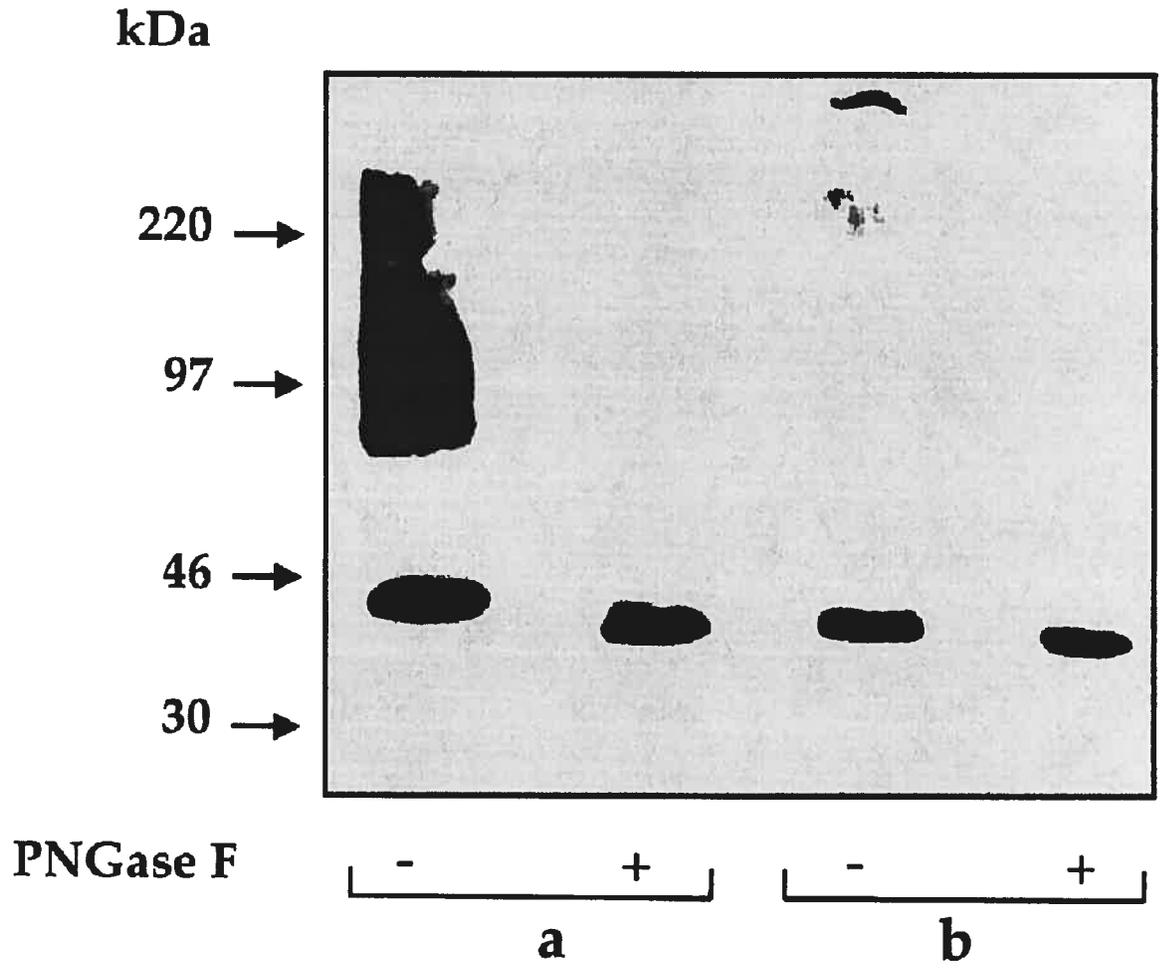


Figure 5

Figure 5 : Enzymic deglycosylation of the receptors

Cell lysates were prepared from COS-7 cells as described in the Materials and methods section. Samples (50 μ g of protein) were incubated for 18 h at 32 °C in the presence (+) or absence (-) of 1.5 units of PNGase F. Samples were submitted to SDS/PAGE (10% gel) and immunoblotted with an anti-c-Myc antibody with chemiluminescence detection as described in the Materials and methods section. Lane a, myc-N-C; and lane b, myc-N-C, Q176,Q188. Prestained markers (rainbow markers, Amersham) are indicated by arrows.

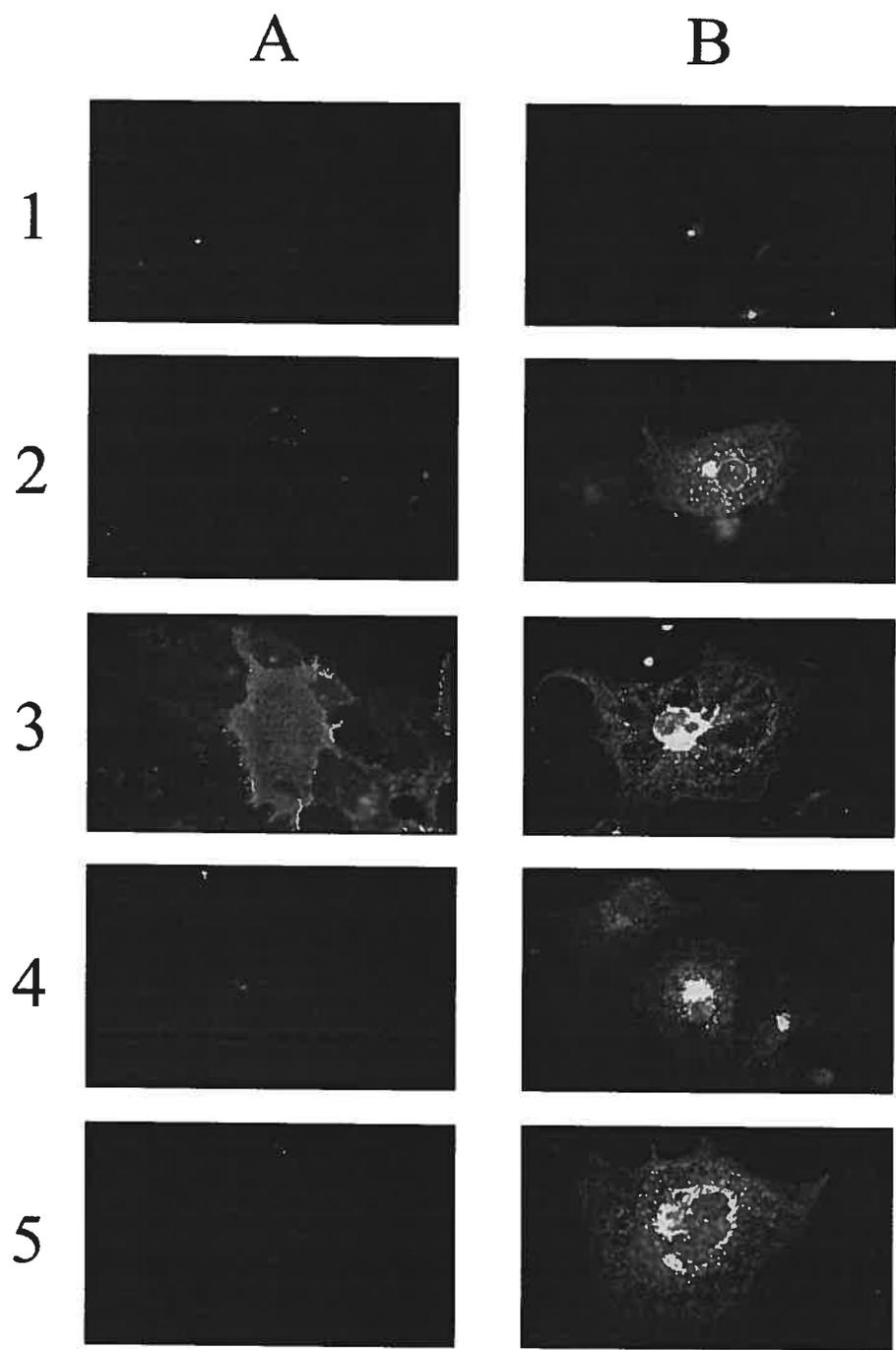


Figure 6

Figure 6 : Cellular localization of the WT and mutant receptors

COS-7 cells expressing the WT or epitope-tagged mutant receptors were incubated with the anti-c-Myc antibody 9E10. Immunostaining was performed with an anti-mouse antibody coupled to Rhodamine, as described in the materials and methods section. Row 1, WT; row 2, myc-C; row 3, myc-N-C; row 4 myc-C, Q176, Q188; and row 5, myc-N-C, Q176, Q188. (A) Non-permeabilized cells; (B) permeabilized cells. Photographs were taken at the same magnification with the same objective and are samples from the same experiment. They are representative of a large number of specimens obtained from three independent experiments. Magnification x 630.

Receptor	[¹²⁵ I]Sar ¹ -All binding		IP production (% of WT maximal)
	K _d (nM)	B _{max} (% of WT)	
WT	0.79 ± 0.25	100	100
myc-N	0.82 ± 0.23	98 ± 15	—
myc-C	0.46 ± 0.09	100 ± 5	95 ± 4
myc-C, Q176	0.50 ± 0.15	97 ± 19	—
myc-C, Q188	0.63 ± 0.12	95 ± 17	—
myc-C, Q176,Q188	ND	ND	—
myc-N-C	0.79 ± 0.12	83 ± 5	97 ± 7
myc-N-C, Q176	0.74 ± 0.18	16 ± 5	90 ± 1
myc-N-C, Q188	0.63 ± 0.12	86 ± 13	150 ± 49
myc-N-C, Q176,Q188	0.84 ± 0.10	3 ± 0.5	92 ± 28

Table 1

Table 1: Ligand binding and coupling properties of WT and mutant receptors expressed in COS-7 cells

[¹²⁵I]Sar¹-AII binding was performed on intact COS-7 cells transfected with cDNA amounts that ensured maximal expression levels for each receptor (2 µg of cDNA for WT myc-C, myc-N-C, myc-N-C, Q188 and myc-N-C, Q176, Q188 and 1 µg for myc-N-C, Q176) as indicated in the Materials and methods section. Dissociation constants (K_d) and maximal binding capacities (B_{max}) were determined by Scatchard analysis. Values are means ±S.D. of four independent experiments performed in triplicate. Total (T) and non-specific (NS) binding determined for 1×10^5 cells incubated with a saturating concentration of [¹²⁵I]Sar¹-AII (10 nM, 180Ci/mmol) were: T, 195000 ±1000 c.p.m. and NS, 4360 ± 350 c.p.m. for the WT receptor; T 37500±500 cpm and NS, 3500 ±550 c.p.m. for the myc-N-C, Q176 mutant; and T, 9200 ±650 c.p.m. and NS, 3400 ±400 c.p.m. for the myc-N-C, Q176,Q188 mutant (values are means ±S.D. of triplicates obtained in a representative experiment). Sar¹-AII-induced IP production was measured in COS-7 cells expressing the WT or N-glycosylation-site-defective-mutant receptors [(200-300) × 10³ sites/cell]. Cells were stimulated for 15 min by 10⁻⁷ M Sar¹-AII and pooled IPs were extracted and measured as described in the Materials and methods section. Values are means ± S.D. of three independent experiments performed in triplicate. Basal and Sar¹-AII-stimulated IP production values were: 478 ±28 (basal) and 2052 ±200 (stimulated) d.p.m and 608 ±100 (basal) and 1880 ±150 (stimulated) d.p.m. for cells expressing WT receptor (200 × 10³ sites/cell) and myc-N-C, Q176 mutant receptor (195 × 10³ sites/cell), respectively (means ±S.D. from one typical experiment performed in triplicate). ND, non-detectable binding; -, not determined.

Résumé de l'article 1

Le but de cette étude est d'étudier le rôle des sites de glycosylation dans l'expression ainsi que dans les propriétés pharmacologiques du récepteur AT_{1a} chez le rat. La suppression des sites de glycosylation a été effectuée par mutagenèse dirigée pour (Asn → Gln) l'Asn¹⁷⁶ et l'Asn¹⁸⁸ (qui se retrouve sûr la deuxième boucle extracellulaire). L'enlèvement du site de glycosylation de l'Asn⁴ a été effectué par le remplacement des quatre premiers acides aminés par une séquence d'épitope c-Myc de 10 acides aminés en N-terminal du récepteur. Nous avons généré sept mutants dont les sites potentiels de glycosylation ont été remplacés, tous étaient marqués en C-terminal avec l'épitope c-Myc. Cette stratégie de double marquage (c-Myc en N- et C- terminal), associé avec le photomarquage, a permis l'évaluation de la masse moléculaire des récepteurs, alors que l'immunohistochimie la localisation cellulaire des différents mutants exprimés de façon transitoire dans les cellules COS-7. Nous avons démontré que : (i) chacun des trois sites potentiels de glycosylation est utilisé dans les cellules COS-7 ; (ii) le récepteur mutant qui ne possède plus aucun site de glycosylation n'est pas (ou pratiquement pas) exprimé à la surface de la membrane plasmique, et est accumulé à l'intérieur de la cellule dans la zone périnucléaire ; (iii) la conservation de deux sites de glycosylation permet une incorporation normale du récepteur à la membrane plasmique, alors que la seule présence de l'Asn¹⁷⁶ assure un comportement similaire au récepteur de type sauvage.; et (iv) tous les récepteurs exprimés démontrent des propriétés pharmacologiques inchangées (K_d pour [I¹²⁵]-sarcosine¹-AII; sarcosine¹-AII qui induit la production d'inositol phosphate). Ces résultats démontrent que les sites de glycosylations sont nécessaires pour l'expression du récepteur AT₁.

Chapitre 3 : Étude génétique du gène candidat de TNF- α

Article #2 : Role of tumor necrosis factor- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in french canadians.

Zdenka Pausova, Benoit Deslauriers, Daniel Gaudet, Johanne Tremblay, Theodore A. Kotchen, Pierre Larochelle, Allen W. Cowley, Pavel Hamet.

Publié dans : Hypertension 2000;36 :14-19

Disponible en version électronique :

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/36/1/14>

Role of tumor necrosis factor- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in french canadians

Zdenka Pausova¹, Benoit Deslauriers¹, Daniel Gaudet², Johanne Tremblay¹, Theodore A. Kotchen³, Pierre Larochelle¹, Allen W. Cowley³, Pavel Hamet¹.

¹ Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM),
Montreal, Quebec, Canada.

² Centre hospitalier de la Sagamie, Chicoutimi, Quebec, Canada.

³ Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, United States.

Correspondence to Dr. Pavel Hamet, centre de recherche CHUM-Hôtel-Dieu,
laboratory of molecular medicine, 3850 St-Urbain, Montréal, Québec, Canada,
H2W 1T8.

E-mail:pavel.hamet@umontreal.ca

Keywords: tumor necrosis factor, hypertension, obesity, genes

Summary

Obesity represents a serious risk factor for the development of cardiovascular diseases, including hypertension. Segregation studies suggest that obesity and obesity-associated hypertension may share some genetic determinants. The results of the present candidate gene investigation suggest that in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin, one such determinant is the tumor necrosis factor (TNF)- α gene locus. Gender-pooled quantitative sib-pair analysis demonstrated a significant effect of the gene locus on 3 global and 7 regional measures of obesity ($P=0.05$ to 0.0004).

Gender-separate quantitative sib-pair analyses showed that the impact of the locus on obesity is most significant in the abdominal region in men and in the thigh region in women. Furthermore, the haplotype relative-risk test demonstrated a significant association between the TNF- α gene locus and both obesity ($P=0.006$) and obesity-associated hypertension ($P=0.02$). These effects were most significant in individuals with nonmorbid obesity. In conclusion, the results of linkage and association analyses suggest that in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin, the TNF- α gene locus contributes to the determination of obesity and obesity-associated hypertension. In addition, the data indicate that gender modifies the effect of the locus on the regional distribution of body fat.

Introduction

Obesity is a leading risk factor for the development of essential hypertension. It has been estimated in the Framingham Heart Study that for each 4.5 kg of weight gain, there is an accompanying increase of 4 mm Hg in systolic blood pressure in both men and women.¹ Several mechanisms have been implicated in the pathogenesis of obesity-associated hypertension, including insulin resistance, salt sensitivity, and activation of the sympathetic nervous system.²

The pathogenesis of both obesity and hypertension is complex, characterized by the involvement of several genes and environmental factors.^{3,4} Genetic analyses suggest that some of the genes that determine obesity may also contribute to the development of obesity-associated hypertension.^{5,6} One such gene may be that coding for tumor necrosis factor (TNF)- α .

TNF- α is a proinflammatory cytokine that, in addition to its role in the immune response and cancer, is involved in the development and phenotypic expression of obesity. It has been suggested that TNF- α functions as an adipostatic factor that is induced by increasing obesity to limit its further progression.⁷ This hypothesis is based on a large body of research that demonstrates TNF- α expression is heightened in obesity^{8,9} and that TNF- α exerts antiadipogenic effects. Thus, the exposure of adipose tissue and cells to TNF- α in vitro dramatically suppresses the gene expression of key enzymes involved in fatty acid uptake and lipogenesis.¹⁰⁻¹² In addition, TNF- α inhibits differentiation¹¹ and stimulates apoptosis of adipocytes.¹³

In obesity, some of these antiadipogenic effects may be mediated by TNF- α -induced insulin resistance. The complete absence of TNF- α or of both of its receptors results in a significant improvement in insulin sensitivity in mice with dietary, hypothalamic, or genetic obesity.^{14,15} In obese humans, elevated TNF- α expression in adipose and muscle tissues is positively correlated with the level of fasting hyperinsulinemia.⁹⁻¹⁶

The role of TNF- α has not been studied in hypertension as extensively as in obesity and insulin resistance. It has been demonstrated that TNF- α increases the production of endothelin-1^{17,18} and angiotensinogen.^{19,20} In addition, as described, TNF- α has been related to the development of obesity-associated insulin resistance, which is one of the proposed mechanisms of obesity-associated hypertension.² The goal of the present study was to investigate whether the TNF- α gene locus is involved in the determination of obesity and obesity-associated hypertension in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin.

Methods

Fifty pedigrees of French descent were selected from a genetically isolated population of the Chicoutimi/Lac St-Jean region in the Canadian province of Quebec.²¹ The pedigrees were ascertained through "hypertension-affected" sib pairs. "Affected" status was defined by the presence of (1) early-onset essential hypertension (onset at the age of ≤ 5 years) and (2) dyslipidemia (total cholesterol of ≥ 5.2 mmol/L, HDL cholesterol of ≤ 0.9 mmol/L, or both). In addition, affected status was characterized by the absence of (1) secondary hypertension, (2) diastolic blood pressure of >110 mm Hg while on blood pressure-lowering medication, (3) gross obesity (body mass index [BMI] of >35 kg/m²), (4) diabetes mellitus (fasting blood glucose of >6 mmol/L or the use of insulin or oral hypoglycemic agents), (5) renal dysfunction (serum creatinine of >180 mmol/L), (6) liver disease, (7) malignancy, (8) pregnancy, and (9) substance abuse, including alcohol. Furthermore, to ensure genetic homogeneity, only sib pairs with both parents of Catholic French-Canadian origin were selected. Once an affected sib pair was identified, other family members, including siblings, parents, children, and aunts and uncles, were also included. This collection included a total of 262 individuals. The study was approved by the local ethics committee, and the subjects gave their informed consent.

In these individuals, 3 global and 11 regional measures of obesity were collected through standardized procedures. The global measures included BMI, total body fat (TBF) derived from skinfold measurements,²² and TBF determined with bioimpedance (RJL Systems, Inc). The regional measures included 6 trunk and extremity circumferences and 5 skinfold measurements. Descriptive statistics on obesity-related phenotypes are presented in Table 1.

The TNF- α gene locus was investigated with the use of three polymorphisms; (1) an *NcoI* polymorphism located in the promoter region of the TNF- α gene at position -308 (index of heterozygosity 0.18),²³ (2) an *NcoI* polymorphism located ≈ 3 kb upstream of the gene (index of heterozygosity 0.40),²³ and (3) a CA-dinucleotide repeat polymorphism located ≈ 6.6 kb upstream of the gene (index of heterozygosity 0.88).²⁴

Quantitative sib-pair analysis was conducted with use of the SIBPAL computer program (Version 2.8, S.A.G.E. package; Department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University). This nonparametric linkage analysis is based on regression of the squared trait difference on the proportion of marker alleles shared between 2 siblings. One-tailed Student's *t* test is used to test the significance of the regression. Before linkage analyses, all variables were adjusted for significant covariates, such as age, gender, and height, by means of linear regression. The allele frequencies of DNA markers were estimated in the total sample of individuals ($n=262$). To control for possible bias, we used the more conservative unweighted option for sib-pair analysis. Given the fact that a candidate gene approach was used here, we chose $P<0.05$ as our initial criterion for linkage.

The power to detect linkage with quantitative sib-pair analysis is concentrated in sib pairs either concordant or discordant for high or low values of the trait, or both.²⁵ Therefore, only individuals with either "low" (≤ 22 kg/m²) or "high" (≥ 27 kg/m²) BMI were selected for quantitative sib-pair analyses (Figure 1). These individuals created a total of 152 sib pairs, including 102 sib pairs concordant for high BMI, 8 sib pairs concordant for low BMI, and 42 sib pairs discordant for low and high BMI. BMI values of 22 and 27 kg/m² were chosen because it has been demonstrated that individuals with BMI of ≤ 22

kg/m² rarely have metabolic conditions, such as insulin resistance,²⁶ and that Canadian adults with BMI of <27 kg/m² have nearly twice the prevalence of hypertension as those with BMI of <27 kg/m².²⁷

Association analysis was performed with use of the TRANSMIT program (Version 2.3; D. Clayton, MRC Biostatistics Unit). This program tests for associations between a genetic marker and disease by examining the transmission of multipoint haplotypes from parents to affected offspring. The χ^2 statistic is used to compare multipoint haplotype frequencies observed in affected offspring with those expected under mendelian transmission. The TRANSMIT program can also be used when parental genotypes are unknown; in this case, data from unaffected siblings are used.

Results

Quantitative sib-pair analysis (SIBPAL) demonstrated significant effects of the TNF- α gene locus on all global and most regional measures of obesity (Figure 2). With respect to global measures of obesity, the most significant result was observed for BMI ($t = -2.74$, $P=0.004$) and less significant data were obtained for TBF derived from skinfold measurements ($t = -1.79$, $P=0.04$) and TBF determined through bioimpedance ($t = -1.63$, $P=0.05$) (Figure 2). In regard to the regional obesity measures, the TNF- α gene locus demonstrated the most significant impact on thigh circumferences ($t = -3.10$ to -3.47 , $P=0.001$ to 0.0004). Upper arm, waist, and hip circumferences were also linked to the locus but less significantly. Among skinfold measurements, thigh skinfold was the only one that reached statistical significance ($t = -2.55$, $P=0.007$) (Figure 2).

To confine this obesity-related effect of the locus closer to the TNF- α gene, an association-based analysis (TRANSMIT) was conducted. This analysis demonstrated that marker haplotype frequencies observed in affected offspring ($BMI \geq 27 \text{ kg/m}^2$) differ significantly from those expected under mendelian transmission ($\chi^2 = 10.45$, 3 df, $P=0.02$). Taken together, the results of both linkage and association analyses suggest that the TNF- α gene locus is involved in the determination of obesity in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin.

Among individuals with BMI of $\geq 27 \text{ kg/m}^2$ ($n=110$), 88% had early-onset hypertension, whereas among the individuals with BMI of $\leq 22 \text{ kg/m}^2$ ($n=30$), 38% were affected ($\chi^2 = 18.03$, 1 df, $P=0.00002$). The difference in the prevalence of hypertension

between the 2 groups indicated a close relationship between obesity and early-onset hypertension in our data set.

To explore the possibility that the TNF- α gene locus is involved in the development of obesity-associated hypertension, association analysis (TRANSMIT) was conducted. This analysis showed that haplotype frequencies observed in affected offspring (BMI of ≥ 27 kg/m² and hypertension diagnosed at the age of ≤ 55 years) do not significantly differ from those expected under mendelian transmission ($\chi^2 = 6.25$, 3 df, P=0.1), suggesting that the TNF- α gene locus is not involved in the pathogenesis of obesity-associated hypertension. However, on the basis of the known actions and the presumed role of TNF- α in obesity and hypertension, the TNF- α gene is not likely to be involved in the development of hypertension in subjects with severe obesity. Therefore, we carried out association analysis, with affected status being assigned to hypertensive individuals with nonmorbid obesity (BMI 27 to 35 kg/m²). This analysis revealed a significant association between the TNF- α gene locus and obesity-associated hypertension ($\chi^2 = 9.6$, 3 df, P=0.02) (Table 2). Furthermore, the selection of only individuals with nonmorbid obesity (BMI 27 to 35 kg/m²) as affected offspring also increased the significance of the association between the locus and obesity ($\chi^2 = 12.6$, 3 df, P=0.006) (Table 2). In this analysis, the haplotype 1.2.10 was significantly associated with obesity ($\chi^2 = 4.57$, 1 df, P=0.03). These results suggest that the TNF- α gene locus is a significant determinant of both obesity and obesity-associated hypertension and that this effect is limited mainly to individuals with nonmorbid obesity.

Furthermore, descriptive statistics on obesity-related phenotypes demonstrate that men and women differ in most measures of regional body fat distribution (Table 1). The average values of all skinfold measurements were found to be higher in women than in men, with the most significant difference being observed in the thigh skinfold (P = 3.0x10⁻

¹⁶). In contrast, most of the circumference measures were greater in men than in women. Among them, the most significant difference was noticed in waist circumference ($P=0.0003$) and the waist/hip ratio ($P=8.6 \times 10^{-15}$). To further explore the issue of gender, we performed gender-separate quantitative sib-pair analyses. They showed that in male sib pairs, the TNF- α gene locus exerts the most significant effects on waist circumference ($t = -1.58$, $P=0.06$), the waist/hip ratio ($t = -1.77$, $P=0.04$), and suprailiac skinfold ($t = -2.87$, $P=0.004$). In contrast, in female sib pairs, the locus has the most significant impact on upper thigh circumference ($t = -3.02$, $P=0.002$), middle thigh circumference ($t = -3.00$, $P=0.002$), and thigh skinfold ($t = -2.39$, $P=0.01$) (Figure 3). Thus, the TNF- α gene locus appears to most significantly influence the accumulation of fat in the abdominal region in men and in the thigh region in women.

Discussion

The results of the present linkage and association analysis suggest that in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin, the TNF- α gene locus is involved in the pathogenesis of obesity and obesity-associated hypertension. Although these results do not provide direct evidence for the involvement of the TNF- α gene, in consideration of the known actions of TNF- α , this gene represents the best candidate within the chromosomal region.

The effect of the TNF- α gene locus on human obesity alone has been reported previously. A significant relationship between the gene locus and various global measures of adiposity was observed in populations as diverse as Pima Indians and European whites.²⁸⁻³⁰ These studies were performed in families or groups of unrelated individuals with obesity, non-insulin-dependent diabetes mellitus, or ischemic heart disease. The results of the current investigation extend the previous observations in that they demonstrate the effect of the locus in pedigrees with hypertension.

A role of the TNF- α gene locus in obesity-associated hypertension has not been previously demonstrated. However, it has been observed in an isolated Native Canadian population that a positive correlation exists between serum TNF- α concentration and both systolic blood pressure and insulin resistance in subjects with a wide range of adiposity.³¹ Furthermore, TNF- α has been implicated in the development of endothelial dysfunction. In vascular smooth muscle cells, TNF- α was shown to stimulate the production of a potent vasoconstrictor, endothelin-1.¹⁸ Consistent with this *in vitro* finding, significant positive

correlations were found between serum TNF- α and serum endothelin-1 levels in patients with android obesity.¹⁷ Moreover, in spontaneously hypertensive rats (SHR), several studies have reported that TNF- α synthesis and secretion in response to lipopolysaccharide stimulation are increased in comparison with normotensive controls.³² This effect was most marked in adipose tissue and was associated with increased angiotensinogen gene expression.²⁰ In addition, the body temperature response to lipopolysaccharide differs between SHR and its normotensive control,³³ and it has been demonstrated that this response is, at least in part, determined by the TNF- α gene locus.³⁴ Finally, the TNF- α gene locus as a part of the RT1 complex has been suggested in some,^{35,36} but not all,^{37,38} studies to contribute to the pathogenesis of hypertension in SHR and New Zealand genetically hypertensive rats.

In the present study, the effect of the TNF- α gene locus on both obesity and obesity-associated hypertension was found to be most significant in nonmorbidly obese individuals. This finding is consistent with the proposed actions of TNF- α in obesity. Enhanced activity of the cytokine due to the development of obesity is, on one hand, predicted to contribute to the development of hypertension but is, on the other hand, expected to limit the progression of obesity.⁷

Gender-separate linkage analyses indicate that the TNF- α gene locus influences regional accumulation of fat, most significantly in the abdominal region in men and in the thigh region in women. Such a gender-specific effect of the TNF- α gene could be the result of a gender difference in the regional expression of either the gene itself or any other element involved in the cascade of events that lead from activation of the gene to its action in the target tissue. At present, the only element in the TNF- α cascade that is known to have gender-specific regional effects is lipoprotein lipase (LPL).³⁹ This enzyme normally

promotes lipid accumulation in adipose cells. A significant proportion of the antiadipogenic effects of TNF- α are mediated through the inhibition of LPL.¹⁰ Amer et al³⁹ showed that both the mRNA level and the enzyme activity of LPL are higher in abdominal than in thigh adipose cells in men and vice versa in women. Notably, these gender-specific regional differences of LPL closely parallel those of the TNF- α gene effect on body fat accumulation observed in the present study, suggesting a possibility that LPL may be involved in determination of the gender-specific regional effects of the TNF- α gene.

In conclusion, the results of linkage and association analyses suggest that in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin, the TNF- α gene locus contributes to the pathogenesis of obesity and obesity-associated hypertension. Furthermore, the results also indicate that the locus influences regional body fat distribution differently in men and women.

Acknowledgments: This work was supported by the Medical Research Council of Canada (grant MT-14654) and the National Institutes of Health (US Public Health Service grant 5-P50-HL-54998-02). We thank Drs Alan Deng and Jean-Louis Chiasson for their helpful comments on the manuscript, Ginette Dignard for her secretarial help, and Ovid Da Silva for his editorial assistance. We thank Manon Bernard, Danielle DeGuise, Nicole Baribault, and Jacinthe Tremblay for their work on phenotype collection.

References

1. Higgins M, Kannel W, Garrison R, Pinsky J, Stokes JJ. Hazards of obesity: the Framingham experience. *Acta Med Scand Suppl.* 1988;723:23-36.
2. Mark AL, Correia M, Morgan DA, Shaffer RA, Haynes WG. Obesity-induced hypertension. *Hypertension.* 1999;33:537-541.
3. Hamet P, Pausova Z, Adarichev S, Adaricheva K, Tremblay J. Hypertension: genes and environment. *J Hypertens.* 1998;16:397-418.
4. Pausova Z, Tremblay J, Hamet P. Gene-environment interactions in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 1999; 1:42-50.
5. Rice T, Province M, Pérusse L, Bouchard C, Rao DC. Cross-trait familial resemblance for body fat and blood pressure: familial correlations in the Quebec family study. *Am J Hum Genet.* 1994;55:1019-1029.
6. Allison DB, Heshka S, Neale MC, Tishler PV, Heymsfield SB. Genetic, environmental, and phenotypic links between body mass index and blood pressure among women. *Am J Med Genet.* 1995;55:335-341.
7. Spiegelman BM, Hotamisligil GS. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF- α . *Cell.* 1993;73:625-627.
8. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259:87-91.

9. Saghizadeh M, Ong JM, Barvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF- α by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest.* 1996;97:1111-1116.
10. Price SR, Olivecrona T, Pekala PH. Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by cachectin. *Biochem J.* 1986;240:601-604.
11. Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. *Science.* 1985;229:867-869.
12. Pape ME, Kim K.-H. Transcriptional regulation of acetyl coenzyme A carboxylase gene expression by tumor necrosis factor in 30A-5 preadipocytes. *Mol Cell Biol.* 1989;9:974-982.
13. Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K., O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes.* 1997;46:1939-1944.
14. Uysal K.T, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature.* 1994;389:610-614.
15. Ventre J, Doebber T, Wu M, Macnaul K, Stevens K., Pasparakis M, Kollias G, Moller DE. Targeted disruption of the tumor necrosis factor- α gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes.* 1997;46:1526-1531.
16. Hotamisligil GS, Amer P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409-2415.

17. Winkler G, Lakatos P, Salamon F, Nagy Z, Speer G, Kovacs M, Harnos G, Dworaks O, Cseh K. Elevated serum TNF- α level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. *Diabetic Med.* 1999; 16:207-211.
18. Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol.* 1997; 15:163-167.
19. Brasier AR, Li J, Wimbish KA. Tumor necrosis factor activates angiotensinogen gene expression by the Rel A transactivator. *Hypertension.* 1996;27:1009-1017.
20. Nyui N, Tamura K., Yamaguchi S, Nakamaru M, Islugami T, Yabana M, kihara M, Ochiai H, Miyazaki N, Umemura S, Ishii M. Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;30:859-867.
21. Gradie MI, Jorde LB, Bouchard G. Genetic structure of the Saguenay, 1852-1911: evidence from migration and isonymy matrices. *Am J Phys Anthropol.* 1988,77:321-333.
22. Dumin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr.* 1974;32:77-97.
23. Bouma G, Xia B, Crusius JBA, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BME, Meuwissen SGM, Pena AS. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* 1996; 103:391-396.

24. Udalova IA, Nedospasov SA, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RL. Highly informative typing of human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics*. 1993;16:180-186.
25. Risch N, Zhang H. Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science*. 1995;268:1584-1589.
26. Bray GA. Obesity. In: Fauci AS, Braunwald E, Iseelbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1998:454-462.
27. Joffres MR, Hamet P, Rabkin SW, Gelskey D, Hogan K, Fodor G. Prevalence, control and awareness of high blood pressure among Canadian adults. *Can Med Assoc J*. 1992; 146:1997-2005.
28. Norman RA, Bogardus C, Ravussin E. Linkage between obesity and a marker near the tumor necrosis factor-alpha locus in Pima Indians. *J Clin Invest*. 1995;96:158-162.
29. Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernandez-Castaner M, Vendrell J, Richart C, Soler J. The TNF- α gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes*. 1997;46:1468-1472.
30. Hermann S-M, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets J-B, Luc G, Bara L, Parra H-J, Poirier O, Cambien F. Polymorphisms of the tumour, necrosis factor- α gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest*. 1998;28:59-66.

31. Zinman B, Hanley AJG, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating tumor necrosis factor- α concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:272-278.
32. Hallenbeck JM, Dutka AJ, Vogel SN, Heldman E, Doron DA, Feuerstein G. Lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor activity in rats with and without risk factors for stroke. *Brain Res.* 1991;541:115-120.
33. Pravenec M, Sun YL, Kunes J, Kong D, Kren V, Klir P, Tremblay J, Hamet P. Environmental susceptibility in hypertension: potential role of HSP70 and TNF α genes. *J Vasc Med Biol.* 1991;3:297-302.
34. Pausova Z, Kunes J, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Tremblay J, Hamet P. Contribution of the TNF alpha gene region of rat chromosome 20 to the body temperature response to endotoxin. *Transplant Proc.* 1999;31:1622-1623.
35. Hamet P, Kong D, Pravenec M, Kunes J, Kren V, Klir P, Sun YL, Tremblay J. Restriction fragment length polymorphism of hsp70 gene, localized in the RT1 complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1992; 19:611-614.
36. Harris EL, Grigor MR, Thompson CM. Cosegregation of the TNF-alpha locus with cardiovascular phenotypes in the F2 generation of a New Zealand genetically hypertensive and Brown Norway cross. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25:204-207.
37. Lodwick D, Kaiser MA, Harris J, Privat P, Vincent M, Sassard J, Samani NJ. Failure of the heat-shock protein 70 locus to cosegregate with blood pressure in spontaneously hypertensive rat X Wistar-Kyoto rat cross. *J Hypertens.* 1993; 11:1047-1051.

38. Kren V, Pravenec M, Lu S, Krenova D, Wang JM, Wang M, Merriouns T, Wong A, St Lezin E, Lau D, Szpirer C, Szpirer J, Kurtz TW. Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest.* 1997;99:577-581.
39. Amer P, Lithell H, Wahrenberg H, Bronnegard M. Expression of lipoprotein lipase in human subcutaneous adipose tissue regions. *J Lipid Res.* 1991;32:423-429.

Figures, tables and legends

TABLE 1. Obesity-Related Phenotypes in Individuals Selected for Sib-Pair Analysis

Obesity Measure	All (n=140)	Men (n=59)	Women (n=81)	Gender Difference (P)
Global obesity measure				
Body mass index, kg/m ²	28.5±5.4	28.7±4.0	28.3±6.2	NS
Body fat (skinfolts), %	36.6±7.6	33.2±5.9	40.3±7.5	9.2×10 ⁻⁷
Body fat (bioimpedance), %	31.8±12.2	24.1±5.9	39.2±12.2	1.2×10 ⁻¹¹
Regional obesity measure: circumference, cm				
Upper arm	33.2±4.7	34.2±3.6	32.5±5.2	0.03
Waist	94.9±14.7	99.9±10.5	91.4±16.2	0.0003
Hip	102.8±9.9	100.8±6.1	104.1±11.7	0.03
Waist/hip	0.92±0.10	0.99±0.07	0.87±0.09	8.6×10 ⁻¹⁵
Proximal thigh	58.8±7.1	57.9±5.4	59.5±8.1	NS
Middle thigh	53.3±6.4	53.7±5.0	53.1±7.2	NS
Distal thigh	40.9±5.2	40.9±3.9	40.9±6.0	NS
Regional obesity measure: skinfold, mm				
Triceps	28.6±13.6	20.6±9.3	36.6±12.6	4.9×10 ⁻¹¹
Biceps	18.2±11.1	12.1±6.7	24.2±11.3	2.1×10 ⁻⁹
Subscapular	27.6±11.7	25.1±8.9	30.1±13.6	0.03
Suprailiac	27.3±11.9	25.6±11.3	29.1±12.3	NS
Thigh	32.2±16.3	20.9±9.3	43.9±13.5	3.0×10 ⁻¹⁶

*Essential hypertension with onset at the age of ≤55 years.
Values are mean±SD.

Table 1

Table 1 : Obesity-related phenotypes in individuals selected for sib-pair analysis

*Essential hypertension with onset at the age of ≤ 55 years. Values are mean \pm SD.

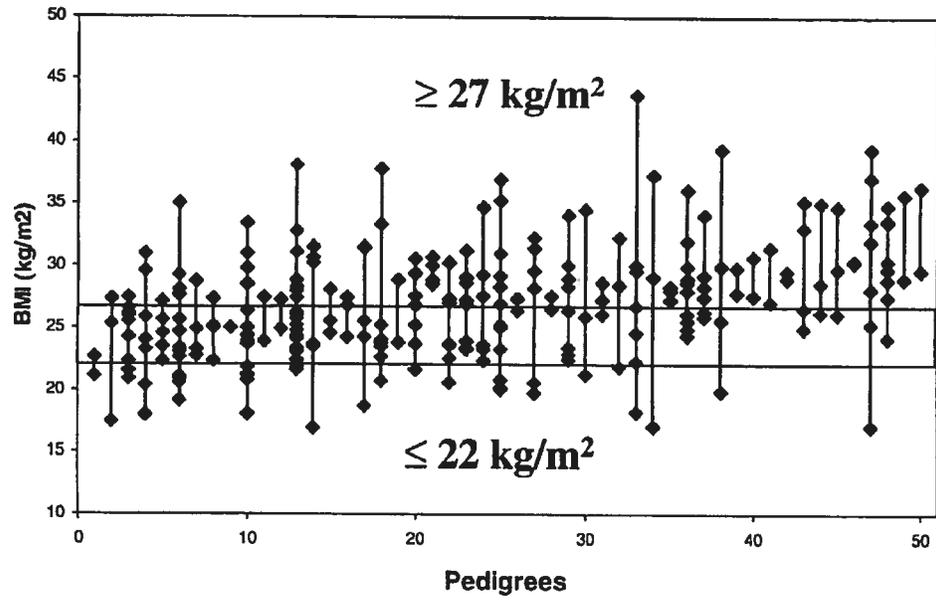
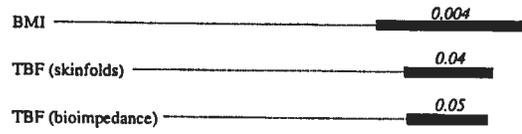


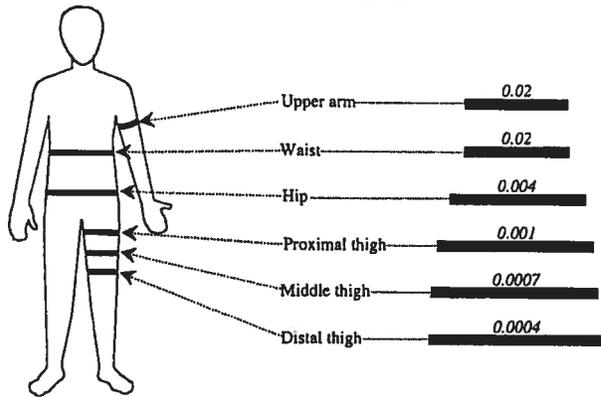
Figure 1

Figure 1 : Pedigrees ranked by their average BMI. The horizontal lines indicate selection criteria for quantitative sib-pair analysis (BMI ≤ 22 kg/m² and ≥ 27 kg/m²)

Global obesity measures



Circumferences



Skinfolds

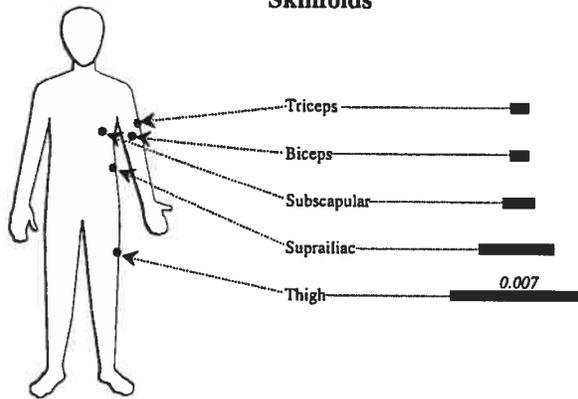


figure 2

Figure 2 : Gender-pooled quantitative sib-pair analysis : an effect of the TNF- α gene locus on global and regional obesity measures. Results obtained with a CA-dinucleotide repeat polymorphism are show: negative t values (providing evidence for linkage) are shown as black bars, and the lengths of the bars are proportionate to the values. In cases of statistically significant results, probability values are also shown as numbers above the bars.

Haplotype*	Observed Haplotype Frequency	Expected Haplotype Frequency	χ^2 Statistics	<i>df</i>	<i>P</i>
Obesity					
1.1.6	9	11.427	1.6267	1	NS
1.2.2	17	14.300	2.6986	1	NS
1.2.10	16	12.217	4.5722	1	0.03
1.2.11	6	10.056	3.7000	1	NS
Global χ^2 test			12.553	3	0.006
Obesity-associated hypertension					
1.1.6	9	9.461	0.0811	1	NS
1.2.2	12	11.089	0.6204	1	NS
1.2.10	12	9.327	3.0990	1	NS
1.2.11	5	8.1229	2.8464	1	NS
Global χ^2 test			9.5941	3	0.02

table 2

Table 2 : Association analysis (TRANSMIT) : effect of the TNF- α gene locus on obesity and obesity-associated hypertension. *Marker alleles within haplotypes are ordered as follows: 1, NcoI polymorphism located within the promoter region of the TNF- α gene; 2, NcoI polymorphism located ≈ 3 kb upstream of the gene; and 3, CA-dinucleotide polymorphism located ≈ 6 kb upstream of the gene. Obesity is defined as body mass index of ≥ 27 kg/m² and ≤ 35 kg/m², and obesity-associated hypertension is defined as hypertension with onset at the age of ≤ 55 years and body mass index of ≥ 27 kg/m² and ≤ 35 kg/m²

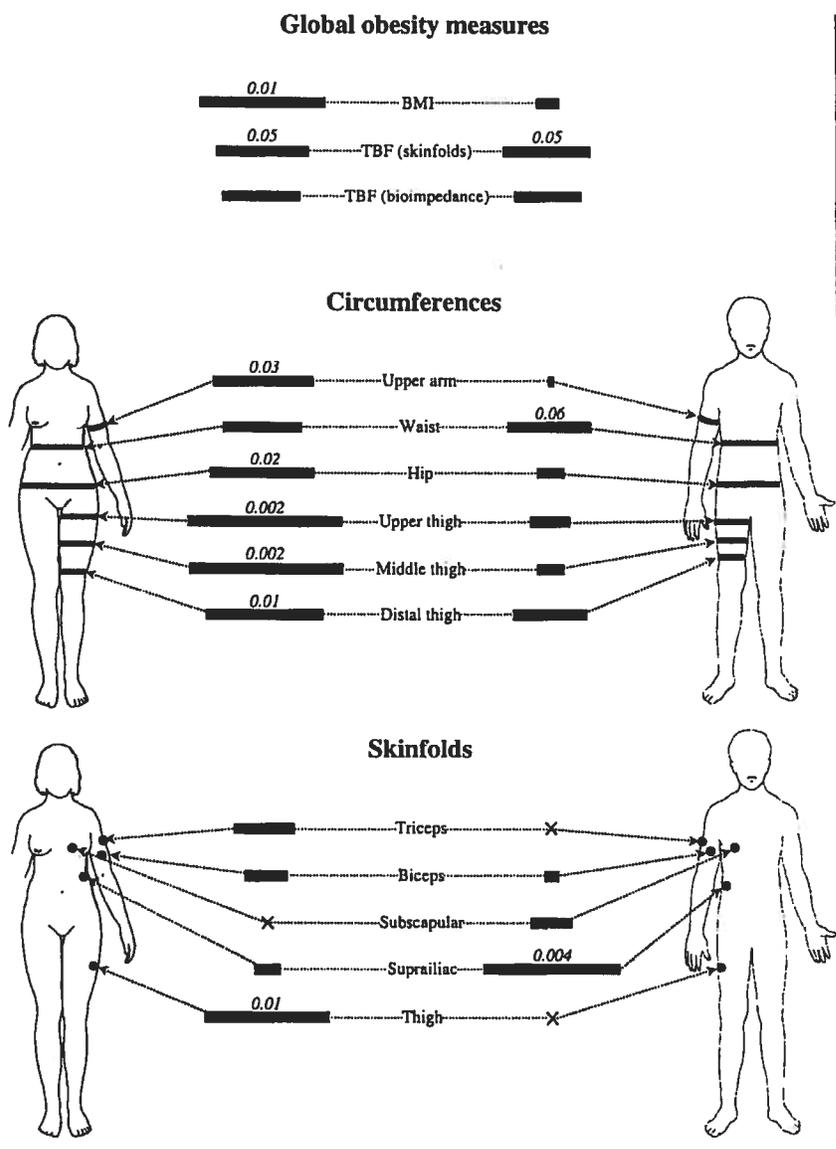


figure 3

Figure 3 : Gender-separate quantitative linkage analysis : an effect of the TNF- α gene locus on global and regional obesity measures. Results obtained with a CA-dinucleotide repeat polymorphism are shown. They are presented as follows: negative T-values (providing evidence for linkage) are shown as black bars, and the lengths of the bars are proportionate to the values. In case of statistically significant results, probability values are also shown as number above the bars. Positive t values or t values equal to zero (providing evidence against linkage) are indicated by a X sign.

Résumé de l'article 2

L'obésité représente un facteur de risque très important dans le développement de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires en général. Les résultats de notre étude génétique, chez des familles hypertendues d'origines canadiennes-françaises, suggèrent que le locus du gène de TNF- α soit relié à l'obésité et à l'obésité associée à l'hypertension. Les études de liaison quantitative par paire de germains démontrent un effet significatif du locus du gène sur 3 mesures globales et 7 mesures locales d'obésité ($p = 0,05$ à $0,0004$). Les mêmes analyses génétiques quantitatives, effectuées séparément pour les hommes et les femmes, démontrent clairement, que l'impact du locus de TNF- α sur l'obésité est plus significatif dans la région abdominale chez les hommes et fémorale chez les femmes. De plus, des études d'associations par haplotype démontrent une association significative entre le locus du gène de TNF- α , l'obésité ($p= 0,006$) ainsi que l'obésité associée à l'hypertension ($p= 0,02$). Cet effet d'association est plus significatif chez les individus souffrant d'obésité modéré. En conclusion, les résultats des études de liaisons et d'associations effectuées sur des familles hypertendues d'origines canadiennes-françaises, suggèrent que le locus du gène de TNF- α contribue au développement de l'obésité et de l'obésité associées à l'hypertension.

Chapitre 4 : Étude génétique du gène candidat de la leptine

Article #3 : Contribution of the leptin gene locus to the development of obesity in hypertensive French-Canadian families.

Benoit Deslauriers, Giuliano Antoniol, Ettore Merlo, Zdenka Pausova, Francis Gossard, Daniel Gaudet, Johanne Tremblay, Pavel Hamet.

L'article sera soumis en janvier 2004.

Abstract

Human obesity is a complex, multifactorial disorder with both genetic and environmental determinants. Obesity represents a serious risk factor for the development of cardiovascular diseases, including hypertension. Segregation studies suggest that obesity and hypertension may share some genetic determinants. The results of the present candidate gene investigation suggest that in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin, the leptin gene locus is one such determinant. Quantitative sib-pairs analysis demonstrate a significant effect of the leptin gene locus on all the global measure of obesity. The most significant results were observed for the body mass index (BMI) ($T = -2.18$, $p = 0.01$) and the total body fat (TBF) measured by bioimpedance ($T = -1.98$, $p = 0.02$). When we observed the distribution of body fat by regional obesity measures, the leptin gene locus had an impact on all the circumferences of the upper and central part of the body. The most significant result was the hip circumference ($T = -2.28$, $p = 0.01$), the waist circumference ($T = -2.01$, $p = 0.02$) and less significant the upper arm circumference ($T = -1.73$, $p = 0.04$). Among the skinfold measures, the only significant result is the skinfold of the biceps with a $T = -1.98$ and $p = 0.02$. We also demonstrated an effect of the leptin gene locus on blood pressure (diastolic blood pressure $p = 0.005$ $T = -2.72$, systolic blood pressure $p = 0.02$, $T = -2.12$). To confine this obesity-related effect of the locus closer to the leptin gene, we run an association-based analysis. We observed significant results of association of the leptin genotype with total body fat measured by bioimpedance ($\chi^2 = 10.3$, 2 df, $p = 0.005$) and the waist circumferences ($\chi^2 = 10.9$, 2 df, $p = 0.004$) confirming that the leptin gene locus is associated with a higher percentage of body fat and fat accumulation in the abdominal region. The results of the present study suggest that, in hypertensive families of French-Canadian origin, the leptin gene locus has a significant impact on both the degree and the distribution of obesity. Furthermore, the results suggest that the locus is involved in the pathogenesis of upper and central body obesity, which is an important risk factor for the development of cardiovascular diseases. We can now consider that the leptin gene

locus might be a player in the development of obesity and hypertension in families of French-Canadian origin.

Introduction

Human obesity is a complex, multifactorial disorder with both genetic and environmental determinants. Environmental risk factors, related to sedentary lifestyle and unlimited access to food, apply constant pressure in subjects with a genetic make-up predisposing to gaining weight ¹. Moreover, our bodies are better adapted to combat weight loss than to combat weight gain, since for thousands of years our species evolved in circumstances where nutrients were in short supply ². Obesity is a big problem in the western population; over 30% of the US population is at least 20% above ideal weight ³ and is commonly associated with medical problems, such as hyperlipidemia, hypertension, and type II diabetes ⁴. It has been estimated in the Framingham Heart Study that for each 4.5 kg of weight gain, there is an accompanying increase of 4 mm Hg in systolic blood pressure in both men and women ⁵. Obesity has a high cost to the society. Direct cost of obesity is more than 6% of the American health budget. Weight reduction in large subset of patients results in substantial improvement in the associated medical problems. Because of its growing prevalence and associated morbidity, obesity could become the most common health problem of the 21st century ².

The response of each individual to diet and other environmental factors varies considerably depending on the characteristics of his/her body weight control mechanisms.

Evidence for genetic control of body weight and composition in man has come from several sources: adoption studies, twin studies, and family studies. One of the most compelling observations is that there is a significantly stronger correlation between the body weights of twin adoptee and their biological parents in comparison to their adoptive parents, in spite of a shared domestic environment in the latter case ⁶.

Several candidate genes have been implicated in the pathogenesis of obesity. The leptin gene is one of them. This gene, encoding the hormone leptin, is expressed mainly by the adipose tissues. Its product is a soluble protein of 16 kDa (167 amino acids) that is considered to be an important regulator of food intake and energy expenditure ⁷. Leptin exerts its appetite-suppressive function through its receptor in the hypothalamus ⁸⁻¹². Direct proof that the leptin is involved in controlling satiety was provided by the obese ob/ob mouse model, where it is undetectable in plasma because of a nonsense mutation at codon 105 ¹³. Homozygotes rapidly gain body weight and are recognized as early as 4 weeks after birth ¹⁴. They are hyperphagic, hyperglycemic, hypoactive, and have elevated plasma insulin levels ¹⁵. Daily recombinant leptin protein delivery was shown to induce weight reduction, suppress appetite, and decrease blood insulin and glucose levels in these mice ^{13, 16-19}. This mutation in the mouse is the cause of obesity, which can be reversed by the administration of recombinant leptin ^{20, 7}. Several studies have been done to demonstrate the implication of the leptin in the control of blood pressure in rodents. Despite body weight nearly twice as high as their lean control, the leptin-deficient ob/ob mice had lower arterial pressure. Aizawa-Abe et al. ²¹ subsequently reported that administration of leptin to ob/ob mice (so-called leptin reconstitution) increased systolic blood pressure by as much as 25 mmHg despite a decrease in food intake and body weight.

The human *ob* gene is structurally similar to the mouse gene^{19, 18} and human leptin is 84% homologous to mouse leptin²²⁻²⁴. Although the human *ob* gene is most highly expressed in adipose tissues, it has also been detected in the heart and placenta²⁵⁻²⁶. The amount of *ob* gene mRNA in adipocytes from obese individuals is greater than that in adipocytes from lean subjects²⁷ and there is a significant positive correlation with both percent body fat and body mass index (BMI)^{23, 27-29}. However, studies in humans have found that peripheral blood leptin concentration is higher in obese than in lean individuals and that women have higher levels than men^{30, 9, 31}. It has been reported that weight lost reduces serum leptin levels in human³².

Many other genes are implicated in this complex, multifactorial disorder that is obesity. More than 100 genes can be implicated in obesity³³. We have shown in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin that the locus of another candidate gene for obesity, the *TNF- α* gene, has a significant effect on the degree and distribution of the adiposity. In that study, the results of linkage and association analysis suggest that in hypertensive pedigree, the locus of *TNF- α* gene contributes to the determination of obesity and obesity-associated hypertension and the gender modifies the effect of the locus on the regional distribution of body fat³⁴. The role of the *TNF- α* gene locus in obesity and obesity-associated hypertension was further supported by our rat studies³⁵.

The present study investigates the implication and the effect of the leptin gene locus in the same population of hypertensive pedigrees of French-Canadian origin.

Methods

One hundred and five pedigrees of French descent were selected from a relatively-geographically isolated population of the Chicoutimi/Lac St-Jean region in the Canadian province of Quebec ³⁶. The pedigrees were ascertained through “hypertension-affected” sib-pairs. “Affected” status was defined by the presence of (1) early-onset essential hypertension (onset at the age of ≤ 55 years) and (2) dyslipidemia (total cholesterol of ≥ 5.2 mmol/L, HDL cholesterol of ≤ 0.9 mmol/L, or both). In addition, affected status was characterized by the absence of (1) secondary hypertension, (2) diastolic blood pressure of > 110 mm Hg while on blood pressure-lowering medication, (3) gross obesity (BMI of > 35 kg/m²), (4) diabetes mellitus (fasting blood glucose of > 6 mmol/L or the use of insulin or oral hypoglycemic agents), (5) renal dysfunction (serum creatinin of > 180 mmol/L), (6) liver disease, (7) malignancy, (8) pregnancy, and (9) substance abuse, including alcohol. Furthermore to ensure genetic homogeneity, only sib pairs with both parents of Catholic French-Canadian origin were selected. Once an affected sib pair was identified other family members, including siblings, parents, children, aunts and uncles were also included. This collection included a total of 512 individuals. The study was approved by the local ethics committee, and the subjects gave their informed consent.

In these individuals, 3 global and 11 regional measures of obesity were collected through standardized procedures. The global measures included BMI, total body fat (TBF) derived from skinfold measurements ³⁷ and TBF determined with bioimpedance (RJL Systems, Inc. Clinton Twp., MI). The regional measures included 6 trunk and extremity circumferences and 5 skinfold measurements. Blood pressure was measured with an automated device (Accutraker, SunTech Medical Instruments, Inc., Raleigh, NC).

The leptin gene locus was investigated with the use of a tetranucleotide repeat polymorphism that is located in the 3' UTR of the gene (index of heterozygosity of 0,89³⁸ with 14 different alleles in our sample). A set of primers was synthesized to amplify the tetranucleotide repeats by the polymerase chain reaction (PCR). Primer sequences were: HOBf, 5'-AGT TCA AAT AGA GGT CCA AAT CA (forward primer) and HOBR, 5'-TTC TGA GGT TGT GTC ACT GGC A (reverse primer). One of the primers was radio-labeled prior of the PCR. The PCR reactions included 100 ng genomic DNA template, 0,2 $\mu\text{mol/L}$ of each primer, 2,0 mmol/L Mg^{2+} , 0,8 mmol/L each dNTP, 1,5U Taq-polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, N.J., USA) and reaction buffer in a total volume of 10 μL . The PCR reactions were performed for 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 sec at 54°C and 1 min at 72°C, with an initial denaturation of 3 min at 94°C and a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were run in sample buffer (95% formamide, 10 mmol/L EDTA, 0,05% bromophenol blue, 0,05% xylene cyanol) and deposited on 5% polyacrylamide gel in denaturing condition (TBE-Urea).

Quantitative sib-pair linkage analysis was conducted with use of the SIBPAL program (version 2.8, S.A.G.E. package department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University). This nonparametric linkage analysis is based on regression of the squared trait difference on the proportion of marker alleles shared between 2 siblings. One-tailed Student's t test is used to test the significance of the regression. Before linkage analysis, all variables were adjusted for significant covariates, such as age, gender and height, by means of linear regression. The allele frequencies of DNA markers were estimated in the total sample of individuals ($n=512$). To control for possible bias, we used the more conservative unweighted option for sib-pair analysis. Given the fact that a candidate gene approach was used here, we chose $P<0.05$ as our initial criterion for linkage.

The power to detect linkage with quantitative sib-pair analysis is concentrated in sib-pair either concordant or discordant for high or low values of the trait, or both ³⁹. Therefore, only individuals with either “low” (<22 Kg/m²) or “high” (>27 Kg/m²) BMI were selected for quantitative sib-pair analysis. BMI values of 22 and 27 Kg/m² were chosen because it has been demonstrated that individuals with BMI < 22 Kg/m² rarely have metabolic conditions, such as insulin resistance, and that Canadian adults with BMI > 27 Kg/m² have nearly twice the prevalence of hypertension as those with BMI < 27 Kg/m² ⁴⁰.

Association analysis was performed with the use of the TRANSMIT program (version 2.3; D. Clayton, MRC Biostatistics Unit). This program tests for associations between a genetic marker and disease by examining the transmission of multipoint haplotypes from parents to affected offspring. The χ^2 statistic is used to compare multipoint haplotype frequencies observed in affected offspring with those expected under Mendelian transmission. The TRANSMIT program can also be used when parental genotypes are unknown; in this case, data from unaffected siblings are used.

Results

Quantitative sib-pairs analysis (SIBPAL) demonstrated a significant effect of the leptin gene locus on all the global measure of obesity (figure 2). The most significant results was observed for the BMI (T= -2,18, p= 0,01) and the total body fat (TBF) measured by bioimpedance (T= -1,98, p= 0,02). Less significant data were obtained for TBF measure by skinfolds (T= -1,65, p= 0,049). When we observed the distribution of body fat by regional obesity measures, the leptin gene locus had an impact on all the

circumferences of the upper and central body parts (figure 3). The most significant results were the hip circumference (T= -2,28, p= 0,01), the waist circumference (T= -2,01, p= 0,02) and less significant the upper arm circumference (T= -1,73, p= 0,04). Among the skinfold measures, the only significant result is the skinfold of the biceps with a T= -1,98 and p= 0,02 (figure 4).

We also demonstrated an effect of the leptin gene locus on blood pressure (diastolic blood pressure p=0,005 T=-2,7177, systolic blood pressure p=0,02, T=-2,1230). To confine this obesity-related effect of the locus closer to the leptin gene, we run an association-based analysis (TRANSMIT). This kind of analysis tends to demonstrate that certain marker genotype observed in affected offspring differed significantly from those expected under Mendelian transmission. We carried out an association analysis on three different phenotypes: BMI, total body fat measured by bioimpedance, and the waist circumference. For the association with the BMI, we gave the status of affected to the individuals who have a BMI higher than 27 Kg/m² (218 affected individuals). The analysis of association of the leptin locus with the BMI showed no significant result, suggesting that the leptin gene locus is not associated with the BMI. With body fat measured by bioimpedance, we gave the affected status to individuals that have total body fat higher than 25% (206 affected individuals). We observed significant results of association of the leptin genotype with total body fat measured by bioimpedance. The frequencies of allele 2 and 3 of the leptin polymorphism observed in the affected offspring differ significantly from those expected under Mendelian transmission ($\chi^2=10.3$, 2 df, p=0.005). Suggesting that the leptin locus is involved in obesity by association with higher percentage of body fat. We run another association analysis to investigate if the leptin gene locus is associated with fat accumulation in the abdominal area. For this, we used the waist circumference which is well recognized as being a good measurement of the cardiovascular disease risk⁴¹⁻⁴³. The affected status for men is a waist circumference higher than 88 cm, and for women that is higher than 80 cm. The results demonstrate a strong association of the waist

circumferences in men and women with the leptin gene locus ($\chi^2=10.9$, 2 df, $p=0.004$) confirming that the leptin gene locus is associated with fat accumulation in the abdominal region.

Discussion

The results of the present linkage and association analysis suggest that, in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin, the leptin-gene locus is involved in the pathogenesis of obesity and hypertension. Even if these results do not provide direct evidence for the involvement of the leptin gene, since we did not look for mutation in the gene or expression experiment, this gene represents the best candidate in this chromosomal region.

The effect of the leptin gene locus on human obesity has been reported previously in several studies. The leptin gene has been linked to severe obesity in some, but not all, family studies. Only two reports showing mutations in the human leptin gene revealed that the loss of leptin function results in increased food intake and massive hyperphagia, as it does in mice^{44,45}. Chronic administration of leptin decreases food intake and causes weight loss in individuals carrying the mutation⁴⁶. However, these cases make it clear that relevant defects in the leptin system are extremely rare in humans. In the majority of the human studies on obesity, no mutation in the leptin-coding sequence has been identified^{47,48}.

Our results demonstrate that the leptin gene locus has a significant impact on the degree of adiposity with a significant linkage of the total body fat measure by BMI, bioimpedance and skinfold, as well on the distribution of adiposity with linkage on upper and central body measurement especially waist and hip circumferences. The molecular basis for this linkage is unknown but could relate to difference in the amount of expression of leptin mRNA. We also demonstrate a strong association of the waist circumferences in men and women with the leptin gene locus ($\chi^2=10.9$, 2 df, $p=0.004$) confirming that the leptin gene locus is associated with fat accumulation in the abdominal region.

The waist circumference has been recognized as a good measure of abdominal fat, and particularly, the more metabolically active intra-abdominal fat^{41,49}. The abdominal visceral adipose tissue deposition is associated with an increase of the portal free fatty acid concentration, which leads to plasma disturbance as hyperinsulinemia^{41,42}. Intra-abdominal adipose tissue is not only more metabolically active, but also contains large insulin-resistant adipocytes while subcutaneous adipose tissues are associated with small insulin-sensitive adipocytes. Leptin mRNA levels are about twice as high in subcutaneous compared with omental adipose tissue, and this difference was consistently found in both lean and obese subjects. Because the leptin expression is regulated in part by insulin, now we can more understand the differences of expression of the leptin mRNA in the intra-abdominal region. This can be an explanation for the strong linkage specific in the region of the waist and the hip for the leptin gene locus in our study, that might be attributed to a change in the expression of the leptin gene in this region.

Obesity is now considered as an important and independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality, especially when it is of the visceral type⁴³. Excessive accumulation of adipose tissue is associated with profound alterations in the cardiovascular system, including increases in blood volume, heart rate, cardiac output,

cardiac mass, and systemic blood pressure^{50,51}. Although the pathophysiology of obesity-associated hypertension has been extensively studied for two decades, the molecular basis of the relationship between increased body fat mass and higher blood pressure remains poorly understood.

A recent study suggested that not only the degree but also the distribution of accumulated body fat is an important risk factor for the development of hypertension⁵². It has long been recognized that the prevalence of hypertension is higher in individuals with upper-body obesity than in individuals with lower-obesity⁵³⁻⁵⁵. In this work, because we have shown that the leptin gene locus was significantly link with the degree of adiposity and also with upper and central body obesity in the French Canadian population, we support the fact that the leptin gene is one of the players in the pathophysiology of obesity-associated hypertension.

Leptin produces both depressor and pressor actions, the chronic effects of leptin appear to be predominately pressor. Several studies have been done to demonstrate the implication of the leptin in the control of blood pressure in rodents. Arterial pressure in obese, leptin-deficient *ob/ob* mice and their wild-type, lean control have been evaluated⁵⁶. Despite body weight nearly twice as high as their lean controls, the leptin-deficient *ob/ob* mice had lower arterial pressure. Aizawa-Abe et al.⁵⁷ subsequently reported that administration of leptin to *ob/ob* mice (so-called leptin reconstitution) increased systolic blood pressure by as much as 25 mmHg despite a decrease in food intake and body weight. These studies demonstrate that leptin contributes physiologically to the regulation of arterial pressure.

Furthermore, our study demonstrates a significant linkage between leptin gene locus and blood pressure (diastolic blood pressure $p=0,005$ $T=-2,7177$, systolic blood pressure

$p=0,02$, $T=-2,1230$). There is evidence which indicates that the development of obesity and hypertension are genetically linked ⁵⁵. The leptin gene might be the cause of hypertension and obesity in this population via its action in the maintenance of blood pressure. Thus our team demonstrated in the same French-Canadian population, that siblings with or without early onset hypertension originating from the same families, showed that hypertension siblings were more obese than nonhypertensive sibling and that the body fat of hypertensive siblings was more centrally distributed ⁵⁵, which is directly related with the results of this linkage study of the leptin gene locus.

We have also shown in hypertensive pedigrees of French-Canadian origin that the locus of another candidate gene for obesity, the TNF- α gene, has a significant effect on the degree and distribution of the adiposity. In that study, the results of linkage and association analysis suggest that in hypertensive pedigree, the locus of TNF- α gene contributes to the determination of obesity and obesity-associated hypertension and the gender modifies the effect of the locus on the regional distribution of body fat ³⁴. The role of the TNF- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension was further supported by our rat studies ³⁵. The aim of the rat study was to establish whether a segment of rat chromosome 20 (RNO20), which also contains the TNF-alpha gene, determines diet-induced changes in adiposity and blood pressure (BP). The results showed that a transfer of the RNO20 segment from the normotensive Brown Norway (BN) rat onto the background of the spontaneously hypertensive rat (SHR) is associated with a significantly greater increase in adiposity, glucose intolerance, circulating leptin levels, and BP during 12-week, high-fat-diet feeding. In contrast, the transfer is not associated with significant changes in these variables during 12-week, normal-diet feeding ³⁵. These results shown that there is a link between TNF- α and leptin, and that the leptin can be affected by the environment factor like high fat diet.

The concept of selective leptin resistance

It has been shown that plasma leptin concentration correlates with body fat contents and is usually increased in obese subjects ^{27,58}. This suggests that human obesity is generally associated with an insensitivity to leptin.

These observations prompted the speculation that elevations in arterial pressure in obese states associated with hyperleptinemia might result in part from sympathetic pressor actions of leptin. But these speculations immediately raise a paradox. How can elevated leptin contribute to elevation of arterial pressure if the obese people are resistant to the effects of leptin?

To try to explain this phenomenon, we can look in several studies of the agouti mice. The agouti yellow obese mice have a mutation in the agouti gene that leads to ubiquitous over expression of agouti protein. The agouti protein blocks melanocortin-4 receptor in the hypothalamus and thus promotes obesity ⁵⁹. Agouti mice are resistant to the satiety and weight-reducing actions of leptin ⁶⁰, although they do not have any mutations in the leptin receptor gene.

The agouti obese mice have higher arterial pressure than their lean littermates ⁵⁶. These mice have compensatory hyperleptinemia ^{57,60}, and a recent study indicates that the elevated leptin contributes to the elevated arterial pressure ⁵⁷.

To explain this, the concept of selective leptin resistance was conceived. Specifically, this hypothesized that in agouti mice the sympathoexcitatory actions of leptin

are preserved despite resistance to the satiety and weight-reducing action of leptin. To test this hypothesis, Correia et al.⁶¹ compared effects of leptin on food intake, body weight, and renal sympathetic nerve activity (SNA) in agouti obese versus wild-type lean controls. Leptin-induced decreases in food intake and body weight was less in agouti obese mice than the lean littermates, but leptin-induced increases in renal SNA did not differ in obese and lean mice. This indicates that in agouti mice the phenomenon of selective leptin resistance reflects alterations in central neural pathways, presumably downstream from hypothalamic leptin receptor because the leptin receptor is not mutated in agouti mice. However, the molecular biologic mechanism for the phenomenon of selective leptin resistance remains unknown.

Potential implications for human obesity and hypertension

Several years ago, Reaven⁶², Landsberg⁶³ and others proposed the concept of selective insulin resistance or Syndrome X to explain the association of insulin resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia and hypertension. Patients with Syndrome X have selective resistance to the metabolic effects of insulin on glucose uptake, with preservation of the sympathoexcitatory action of insulin. It is speculated that the concept of selective leptin resistance may have similar implications for understanding the pathophysiology of hypertension in human obesity and may represent another component of the so-called metabolic syndrome. Common human obesity is often associated with hypertension⁶⁴ and increased sympathetic activity⁶⁵⁻⁶⁷, including increases in renal sympathetic activity⁶⁷. If leptin resistance is selective in human obesity, as in murine models, then the leptin could contribute to elevate sympathetic activity and arterial pressure, despite partial resistance to

its satiety and weight-reducing actions. This possibility is speculative and will require comparison of the sympathetic and metabolic actions of leptin in obese and lean humans.

Conclusion

The results of the present study suggest that, in hypertensive families of French-Canadian origin, the leptin gene locus has a significant impact on both the degree and the distribution of adiposity. Furthermore, the results suggest that the locus is involved in the pathogenesis of upper-body obesity, which is an important risk factor for the development of cardiovascular diseases. It has long been recognized that the prevalence of hypertension is higher on individuals with upper-body obesity than on individuals with lower-obesity. Thus we have shown that the leptin gene locus was linked to the arterial blood pressure in our population. We can now consider that the leptin gene locus might be a player in the development of obesity-associated hypertension in families of French-Canadian origin.

References

1. Froguel P. [Genomic approach to obesity: understanding a complex syndrome] *Approches genomiques de l'obesite: vers la comprehension d'un syndrome complexe. Ann.Endocrinol.* 2000;61 Suppl 6:50-55.
2. Palou A, Serra F, Bonet ML, Pico C. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur.J.Nutr.* 2000;39:127-44.
3. Naggert J, Harris T, North M. The genetics of obesity. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1997;7:398-404.
4. Morsy MA, Gu MC, Zhao JZ, Holder DJ, Rogers IT, Pouch WJ et al. Leptin gene therapy and daily protein administration: a comparative study in the ob/ob mouse. *Gene Ther.* 1998;5:8-18.
5. Higgins M, Kannel W, Garrison R, Pinsky J, Stokes J, III. Hazards of obesity--the Framingham experience. *Acta Med.Scand.Suppl* 1988;723:23-36.
6. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N.Engl.J.Med.* 1990;322:1483-87.
7. Solin MS, Ball MJ, Robertson I, de Silva A, Pasco JA, Kotowicz MA et al. Relationship of serum leptin to total and truncal body fat. *Clin.Sci.(Colch.)* 1997;93:581-84.

8. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF. Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics* 1996;98:201-03.
9. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996;348:159-61.
10. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D, Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat.Med.* 1996;2:589-93.
11. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes* 1996;45:992-94.
12. Couce ME, Green D, Brunetto A, Achim C, Lloyd RV, Burguera B. Limited brain access for leptin in obesity. *Pituitary.* 2001;4:101-10.
13. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269:543-46.
14. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *Obes.Res.* 1996;4:101.
15. Charlton HM. Mouse mutants as models in endocrine research. *Q.J.Exp.Physiol* 1984;69:655-76.

16. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995;269:546-49.
17. Rentsch J, Levens N, Chiesi M. Recombinant ob-gene product reduces food intake in fasted mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;214:131-36.
18. Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G et al. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J.Clin.Invest* 1995;96:2065-70.
19. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995;269:540-43.
20. Luke AH, Rotimi CN, Cooper RS, Long AE, Forrester TE, Wilks R et al. Leptin and body composition of Nigerians, Jamaicans, and US blacks [see comments]. *Am.J.Clin.Nutr.* 1998;67:391-96.
21. Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H et al. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J.Clin.Invest* 2000;105:1243-52.
22. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.

23. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Magosin SA, Bauer TL et al. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J.Clin.Invest* 1995;95:2986-88.
24. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M et al. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995;44:855-58.
25. Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y et al. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res.* 1995;5:5-12.
26. Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, Considine RV et al. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 1997;100:E1.
27. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N.Engl.J.Med.* 1996;334:292-95.
28. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat.Med.* 1995;1:950-53.
29. Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat.Med.* 1995;1:953-56.

30. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat.Med.* 1995;1:1155-61.
31. Zimmet P, Hodge A, Nicolson M, Staten M, de Courten M, Moore J et al. Serum leptin concentration, obesity, and insulin resistance in Western Samoans: cross sectional study. *BMJ* 1996;313:965-69.
32. Haffner SM, Gingerich RL, Miettinen H, Stern MP. Leptin concentrations in relation to overall adiposity and regional body fat distribution in Mexican Americans. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 1996;20:904-08.
33. Bray G, Bouchard C. Genetics of human obesity: research directions. *FASEB J.* 1997;11:937-45.
34. Pausova Z, Deslauriers B, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Larochelle P et al. Role of tumor necrosis factor-alpha gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 2000;36:14-19.
35. Pausova Z, Sedova L, Berube J, Hamet P, Tremblay J, Dumont M et al. Segment of rat chromosome 20 regulates diet-induced augmentations in adiposity, glucose intolerance, and blood pressure. *Hypertension* 2003;41:1047-55.
36. Gradie MI, Jorde LB, Bouchard G. Genetic structure of the Saguenay, 1852-1911: evidence from migration and isonymy matrices. *Am.J.Phys.Anthropol.* 1988;77:321-33.

37. Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br.J.Nutr.* 1974;32:77-97.
38. Udalova IA, Nedospasov SA, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RL. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics* 1993;16:180-86.
39. Risch N, Zhang H. Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* 1995;268:1584-89.
40. Joffres MR, Hamet P, Rabkin SW, Gelskey D, Hogan K, Fodor G. Prevalence, control and awareness of high blood pressure among Canadian adults. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *CMAJ.* 1992;146:1997-2005.
41. Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am.J.Cardiol.* 1994;73:460-68.
42. Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* 1984;288:1401-04.
43. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev.* 1994;74:761-811.

44. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat.Genet.* 1998;18:213-15.
45. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;387:903-08.
46. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N.Engl.J.Med.* 1999;341:879-84.
47. Clement K, Garner C, Hager J, Philippi A, LeDuc C, Carey A et al. Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes* 1996;45:687-90.
48. Reed DR, Ding Y, Xu W, Cather C, Green ED, Price RA. Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene. *Diabetes* 1996;45:691-94.
49. Ross R, Shaw KD, Martel Y, de Guise J, Avruch L. Adipose tissue distribution measured by magnetic resonance imaging in obese women. *Am.J.Clin.Nutr.* 1993;57:470-75.
50. Rocchini AP. Cardiovascular regulation in obesity-induced hypertension. *Hypertension* 1992;19:I56-I60.
51. Ferrannini E. The haemodynamics of obesity: a theoretical analysis. *J.Hypertens.* 1992;10:1417-23.

52. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP, Jr. Precursors of essential hypertension. The role of body fat distribution pattern. *Am.J.Epidemiol.* 1989;129:43-53.
53. Blair D, Habicht JP, Sims EA, Sylwester D, Abraham S. Evidence for an increased risk for hypertension with centrally located body fat and the effect of race and sex on this risk. *Am.J.Epidemiol.* 1984;119:526-40.
54. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch.Intern.Med.* 1989;149:1514-20.
55. Pausova Z, Gossard F, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Cowley AW et al. Heritability estimates of obesity measures in siblings with and without hypertension. *Hypertension* 2001;38:41-47.
56. Mark AL, Shaffer RA, Correia ML, Morgan DA, Sigmund CD, Haynes WG. Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *J.Hypertens.* 1999;17:1949-53.
57. Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H et al. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J.Clin.Invest* 2000;105:1243-52.
58. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat.Med.* 1995;1:1155-61.
59. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinerbic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;385:165-68.

60. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269:543-46.
61. Correia ML, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes* 2002;51:439-42.
62. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu.Rev.Med.* 1993;44:121-31.
63. Landsberg L. Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. *Q.J.Med.* 1986;61:1081-90.
64. Kannel WB, Brand N, Skinner JJ, Jr., Dawber TR, McNamara PM. The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. *Ann.Intern.Med.* 1967;67:48-59.
65. Scherrer U, Randin D, Tappy L, Vollenweider P, Jequier E, Nicod P. Body fat and sympathetic nerve activity in healthy subjects. *Circulation* 1994;89:2634-40.
66. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Bolla GB, Lanfranchi A, Colombo M et al. Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 1995;25:560-63.

67. Rumantir MS, Vaz M, Jennings GL, Collier G, Kaye DM, Seals DR et al. Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. *J.Hypertens.* 1999;17:1125-33.

Figures, tables and legends

Obesity Measure	All	Hypertensive	Normotensive	All females	All Males
Individuals (105 Families)	512	301	211	281	231
BMI (kg/m ²)	26,3±4,4	27,7±5,0	25,4±4,7	26,4±5,4	27,2±4,5
TBF skinfold (%)	31,9±8,9	33,5±9,8	29,9±8,7	36,4±10,0	26,4±8,3
TBF bioimp.(%)	29,6±11,0	31,4±11,0	26,3±10,6	34,6±11,0	23,2±7,6
Upper arm circum. (cm)	32,4±4,2	33,1±4,3	31,5±4,0	31,4±4,6	33,6±3,4
Waist circum. (cm)	90,3±14,3	92,8±14,5	85,9±13,6	84,5±14,4	96,3±11,7
Hip circum. (cm)	100,7±9,3	101,9±9,5	98,5±8,5	101,4±10,5	99,5±7,4
Proximal thigh circum. (cm)	58,2±6,4	58,5±6,1	58,0±6,8	58,8±6,8	57,6±5,9
Middle thigh circum. (cm)	52,7±5,8	53,0±5,7	53,3±5,8	52,5±6,0	53,0±5,4
Distal thigh circum. (cm)	40,1±4,4	40,7±4,5	39,7±4,1	40,3±4,8	40,3±3,8
Triceps skinfold (mm)	27,4±12,9	29,1±13,1	26,5±13,0	32,4±11,8	23,1±12,8
Biceps skinfolds (mm)	19,8±12,9	20,5±12,9	19,1±13,1	22,9±12,5	16,4±12,6
Subscapular skinfolds (mm)	25,3±11,4	27,0±11,3	23,5±11,7	26,5±12,6	24,3±10,3
Suprailiac skinfolds (mm)	24,3±11,6	26,0±11,4	22,8±13,1	25,7±12,1	23,4±12,5
Thigh skinfolds (mm)	33,5±16,0	34,3±16,3	32,5±15,5	41,6±12,7	25,0±14,7

Table1: Obesity-related phenotypes in individuals selected for the sib-pair analysis.



Figure 2: Quantitative linkage sib-pair analysis of the leptin gene locus on global obesity measures. Results were obtained with the tetra nucleotide repeat polymorphism that is located in the 3' utr of the leptin gene. Negative t values (providing evidence for linkage) are shown as black bars, and the lengths of the bars are proportionate to the values. In case of statistically significant results, probability values are also shown as number above the bars.

Circumferences

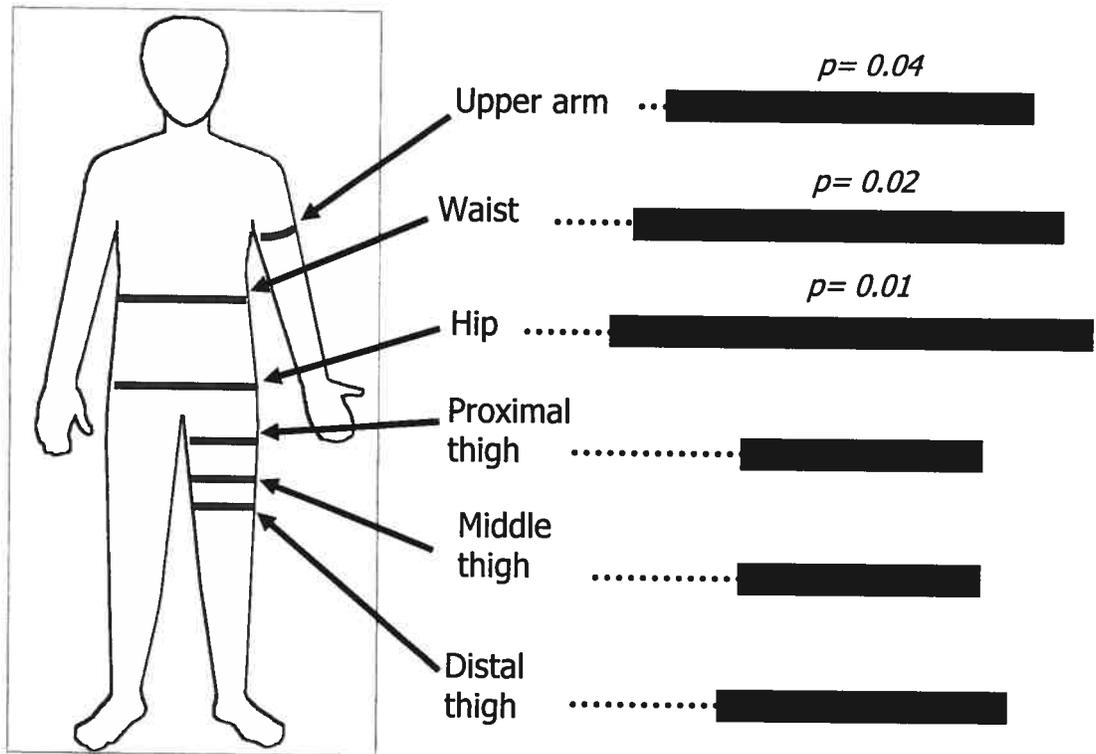


Figure 3: Quantitative linkage sib-pair analysis of the leptin gene locus on regional obesity measures (circumferences). Results were obtained with the tetra nucleotide repeat polymorphism that is located in the 3' utr of the leptin gene. Negative t values (providing evidence for linkage) are shown as black bars, and the lengths of the bars are proportionate to the values. In case of statistically significant results, probability values are also shown as number above the bars.

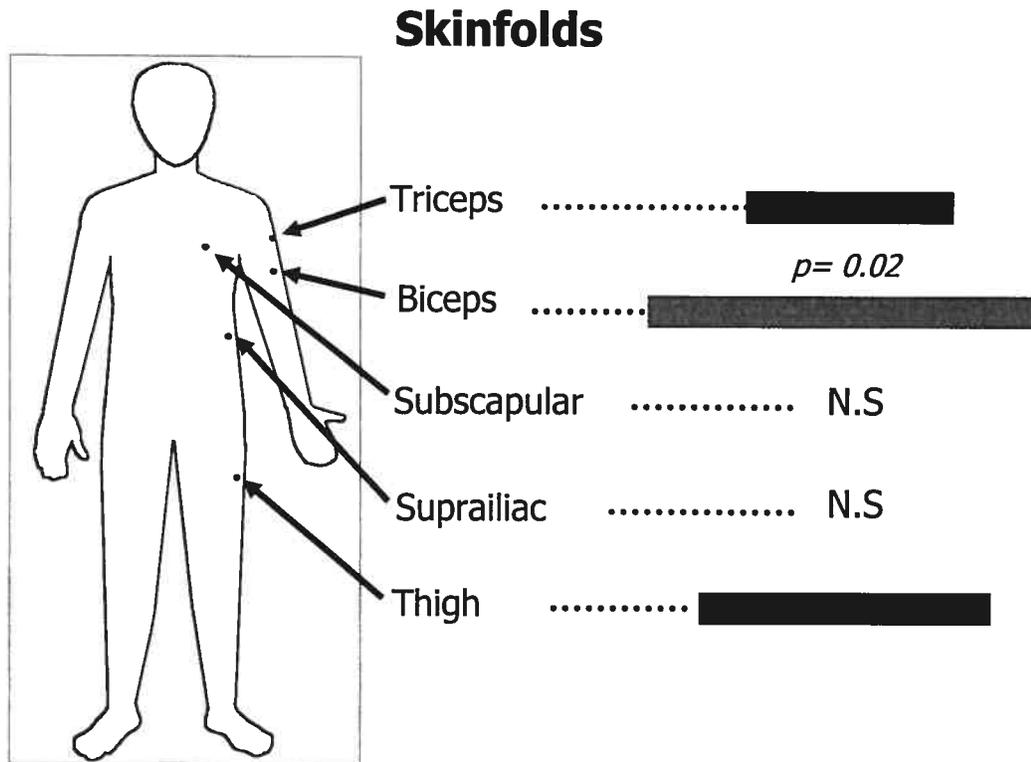


Figure 4: Quantitative linkage sib-pair analysis of the leptin gene locus on regional obesity measures (skinfolds). Results were obtained with the tetra nucleotide repeat polymorphism that is located in the 3' utr of the leptin gene. Negative t values (providing evidence for linkage) are shown as black bars, and the lengths of the bars are proportionate to the values. In case of statistically significant results, probability values are also shown as number above the bars.

Association analysis (TRANSMIT)					
Allele	Observed Haplotype Frequency	Expected Haplotype Frequency	χ^2 statistic	df	P
Affected status= BMI > 27 Kg/m² (218 affected individuals)					
2	15	14.1	0.35	1	0.3
3	4	5.4	3.3	1	0.03
8	7	6.4	0.18	1	0.3
Global χ^2 test			3.26	2	0.2
Affected status= body fat measure by bioimpedance >25% (206 affected individuals)					
2	13	10	6.5	1	0.005
3	0	2.7	9.82	1	0.0008
8	3	3.2	0.08	1	0.3
Global χ^2 test			10.3	2	0.005
Affected status= waist circumference > 88 cm in men and > 80 cm in women (340 affected individuals)					
2	23	19.3	9.7	1	0.0009
3	8	9.9	5.8	1	0.007
8	5	6.7	2.6	1	0.05
Global χ^2 test			10.9	2	0.004

Table 2: Association analysis (TRANSMIT): effect of the leptin gene locus on obesity

Résumé de l'article 3

L'obésité représente un facteur de risque très important dans le développement de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires en général. Les résultats de notre étude génétique, dans des familles hypertendues d'origine canadienne-française, suggèrent que le locus du gène de la leptine est relié à l'obésité et à l'hypertension. Les études de liaison quantitative par pair de germains démontrent un effet significatif du locus du gène sur toutes les mesures globales d'obésité (BMI, $p=0,01$; gras corporel total (TBF) par plis cutanés, $p=0,05$; TBF par bioimpédance, $p=0,02$) ainsi que sur les mesures de pression artérielle (pression diastolique, $p=0,005$; pression systolique, $p=0,02$). Lorsque l'on observe la distribution de la masse adipeuse, le locus du gène de la leptine est lié de façon significative aux circonférences du centre et du haut du corps. Plus particulièrement pour la circonférence de la taille ($p=0,02$) et des hanches ($p=0,01$). De plus, nous observons des résultats d'associations significatifs entre le génotype de la leptine et le TBF mesuré par bioimpédance ($\chi^2=10,3$, 2df, $p=0,005$) ainsi que la circonférence de la taille ($\chi^2=10,9$, 2df, $p=0,004$). Ceci confirme que le locus du gène de la leptine est associé à un fort pourcentage de gras corporel ainsi qu'à une accumulation de gras dans la région abdominale. Les résultats de la présente étude démontrent que le locus du gène de la leptine a un impact significatif sur le degré et la distribution de la masse adipeuse. De plus, ils suggèrent que le locus est impliqué dans la pathogenèse de l'obésité du haut du corps qui est un facteur important dans le développement des maladies cardiovasculaires. En conclusion, les résultats des études de liaison et d'association effectuées sur des familles hypertendues d'origine canadienne-française suggèrent que le locus du gène de la leptine contribue au développement de l'obésité et de l'hypertension artérielle.

Chapitre 5 : Étude génétique du récepteur AT₁ par liaison conventionnelle et liaison dynamique

Résultats non publiés.

Introduction

Comme il a été mentionné dans l'introduction de cette thèse, plusieurs études génétiques ont tenté de démontrer l'implication du SRA, et plus particulièrement celui du récepteur AT₁ dans le développement de l'hypertension essentielle ainsi que dans les maladies cardiovasculaires (Tableau 4). Beaucoup de ces résultats sont contradictoires^(138,139,140,144,145,146,147). Plusieurs études sont incapables de démontrer un lien génétique entre le récepteur AT₁ et l'hypertension artérielle^(142,144,146).

Souvent, les phénomènes pathophysiologiques sont indétectables au premier abord. Dans certains cas, ils peuvent être mis en évidence seulement par une intervention extérieure ou une stimulation environnementale. Plusieurs facteurs environnementaux, comme le stress et la diète, ont été reconnus pour avoir un impact sur des maladies complexes telles que l'hypertension artérielle^(97,98). Un exemple simple de ce type de phénomène est la détection de l'angine de poitrine. Au repos dans le bureau du médecin, il n'y a aucun signe sur l'électrocardiogramme de base, qui laisse croire que le patient peut souffrir d'angine de poitrine. Cependant, lors d'une stimulation extérieure telle que l'exécution d'efforts sur un tapis roulant, la détection de la pathologie devient évidente.

Nous croyons que le même principe peut être appliqué à la détection de liaison génétique de différents systèmes complexes. Dans les travaux qui suivent, le SRA sera utilisé à titre d'exemple. Pour ce faire, la liaison génétique doit être placée dans un contexte plus physiologique. Le phénotypage de la population doit être alors enrichi par des effets de stimulations extérieures et environnementales. Or, l'approche utilisée a été

d'effectuer le phénotypage dans le cadre d'un test de posture et d'un test de stress mathématique. Ces stimulations extérieures sollicitent les différents systèmes participant au maintien de la pression artérielle. Par exemple, dès qu'une personne se met en position debout suite à un certain moment de repos, la pression artérielle au niveau de la tête et du haut du corps tend immédiatement à chuter. Une baisse marquée de cette pression peut conduire directement à la perte de conscience. Cependant, cette baisse de pression provoque un réflexe au niveau des barorécepteurs. Ce réflexe causé par le changement de posture se traduit par une forte réponse sympathique qui a pour effet de minimiser cette diminution de pression artérielle au niveau de la tête et du haut du corps.

Une approche plus physiologique et temporelle est essentielle pour bien comprendre et décortiquer l'implication de tels systèmes complexes dans des pathologies multifactorielles comme l'hypertension artérielle. Avec ce paradigme, il a été possible de mettre au point une nouvelle approche d'évaluation de liaison génétique « temporelle », que nous avons nommée « liaison génétique dynamique ». Cette technique nous a procuré un regard nouveau qui pourrait expliquer, en partie, la source de nombreux résultats contradictoires dans les différentes études génétiques du SRA.

Objectif de l'étude

Le but de la présente étude est d'évaluer l'implication du gène du récepteur AT_1 dans l'hypertension essentielle, l'hypertrophie cardiaque ainsi que la fonction cardiaque dans des familles hypertendues d'origine canadienne-française.

Méthodes

Sélection de la population

Les études génétiques du récepteur AT₁ ont été effectuées auprès de la population du SLSJ. Cette population est originaire d'un petit nombre d'ancêtres français qui ont initialement migré dans la région de Charlevoix pour ensuite migrer vers la région du SLSJ. Le pool génique observé aujourd'hui dans Charlevoix et au Saguenay proviendrait d'un nombre relativement restreint d'ancêtres lointains. Ces circonstances en font aujourd'hui un des plus importants isolats relatifs d'Amérique du Nord.

Critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude

Cent dix-huit familles (896 individus) ont été sélectionnées dans la région de Chicoutimi/SLSJ. Les familles recrutées ont obligatoirement une « paire de germains affectés hypertendus ». Le statut affecté est défini par la présence de :

- 1) une hypertension essentielle développée avant 55 ans;
- 2) dyslipidémie, définie par un cholestérol total $\geq 5,2$ mmol/L et/ou un cholestérol HDL $\leq 0,9$ mmol/L.

Le patient qui bénéficie du statut affecté ne doit posséder aucun des critères d'exclusion de l'étude qui sont :

- 1) Hypertension secondaire
- 2) Pression diastolique supérieure à 110 mm Hg pendant la prise de médication antihypertenseur
- 3) Obésité définie par indice de masse corporelle (BMI) supérieure à 35 kg/m²
- 4) Diabète défini par un glucose sanguin à jeun supérieur à 6 mmol/L ou l'utilisation d'insuline ou d'agent hypoglycémiant
- 5) Dysfonction rénale définie par une créatinine sérique supérieure 180 mmol/L
- 6) Maladie hépatique
- 7) Cancer
- 8) Grossesse
- 9) Alcoolisme
- 10) Consommation de drogue illégale

De plus, pour assurer une certaine homogénéité génétique, seulement les paires de germains dont les deux parents sont d'origine catholique canadienne-française ont été sélectionnées. Lorsqu'une paire de germains obtenait le statut « affecté », les autres membres de la famille tels que les frères, les sœurs, les parents, les oncles et les tantes ainsi que les enfants pouvaient être également inclus dans l'étude. De cette population, soixante-quatre familles (172 individus) ont été incluses dans la présente étude de liaison dynamique. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique local et les patients ont signé le formulaire de consentement.

Phénotypage de la population

Les phénotypes utilisés pour réaliser cette étude sont la pression ambulatoire, des paramètres échocardiographiques ainsi que des données d'impédance cardiaque. Les pressions ambulatrices systoliques et diastoliques ont été mesurées à chaque 30 minutes pendant le jour, et à chaque 60 minutes pendant la nuit, à l'aide d'un moniteur Accutracker II (Sun Tech Medical Instruments). Le fondement de la prise de pression ambulatoire est de pouvoir évaluer la pression artérielle d'un patient sur une période de 24 heures dans son propre environnement. Différentes données échocardiographiques en deux dimensions ont été recueillies à l'aide de l'appareil Sonos 2500 de Hewlett Packard pendant la diastole cardiaque. À partir de ces données, différentes mesures phénotypiques ont été obtenues telles que le diamètre interne du ventricule gauche (LVID), l'épaisseur du septum interventriculaire (IVST), l'épaisseur de la paroi postérieure (PWT) ainsi que la masse ventriculaire gauche calculée de la façon suivante :

$$LVM = 1.04[(IVST + PWT + LVID)^3] - 14 \text{ g}$$

L'index de la masse ventriculaire gauche (ILVM) est obtenu en normalisant la LVM par la surface corporelle du patient.

Phénotypage pour l'étude de liaison dynamique

L'approche de la liaison dynamique repose sur l'évolution de la progression des liaisons génétiques dans le temps lors d'un événement physiologique. Les phénotypes de paramètres cardiaques évalués par l'impédance cardiaque pendant le test de posture sont appropriés pour ce genre d'étude. Les mesures d'impédance cardiaque ont été effectuées sur les 172 individus à l'aide d'un appareil de type SORBA Medical system inc. Cette méthode non invasive permet de mesurer rapidement les modifications des fluides thoraciques ainsi que des paramètres hémodynamiques lors d'un stimulus physiologique comme le test de posture ou le stress mental. Plusieurs paramètres sont dérivés à partir des mesures d'impédance cardiaque.

Les paramètres cardiaques sont recueillis automatiquement pendant le test de posture qui consiste en 60 minutes en position couchée, 10 minutes en position debout et 30 minutes en position assise. Suite au test de posture, le préposé procède au test de stress mathématique demandant au patient de résoudre des équations d'arithmétiques simples à voix haute pendant un temps donné.

Pour les besoins de la liaison dynamique, 17 phénotypes d'impédance cardiaque, dont chacun possède 45 lectures dans l'intervalle du protocole du test de posture et du stress mathématique, ont été recueillis pour un total de 765 points temporels par patient. Ce protocole a été effectué sur les 172 patients qui avaient été préalablement génotypés pour les polymorphismes du récepteur AT_1 . Dans le but de produire les résultats d'analyse de liaison dynamique, plus de 131 500 expériences (17 phénotypes x 45 lectures x 172

patients) de liaisons génétiques devaient être effectuées. Afin d'exécuter ce nombre impressionnant de liaisons génétiques, l'élaboration d'une collaboration avec le Dr Ettore Merlo, chercheur et professeur agrégé au département de génie informatique de l'École Polytechnique de Montréal, fut entreprise. Avec l'aide du Dr Guiliano Antonioli, professeur associé au département de génie logiciel de l'Université de Sanio en Italie, il a été possible de générer une base de données intégrée ainsi que d'automatiser complètement la chaîne de production de résultats de liaisons génétiques déjà en place. Cette approche a permis de produire plus de 70 graphiques de liaison dynamique. À notre connaissance, cette approche d'analyse de liaison dynamique n'a jamais été utilisée. Ces résultats permettront d'accélérer l'exécution d'études de liaisons génétiques obtenues lors de l'observation d'évènements physiologiques temporels. Néanmoins, les résultats obtenus à partir de l'index de contractilité cardiaque de Milwaukee et du rythme cardiaque sont décrits ici à titre d'exemple.

Génotypage

Le gène du récepteur AT₁ situé sur le chromosome 3 en position 3q21-25, a été étudié à l'aide de trois polymorphismes différents. Le premier, T573C, est un polymorphisme de type substitution d'un seul nucléotide (SNP). Ce polymorphisme est le fruit de la substitution d'une thréonine (T) en position 573 par une cystéine (C). Il est important de mentionner que ce polymorphisme est situé dans la région codante du gène (figure 6), tout en ne modifiant aucunement la structure finale en acides aminés. Le deuxième SNP est le A1166C qui substitue l'adénine (A) par une cytosine (C) à la position 1166 dans la région 3' non traduite du gène (figure 6). Depuis que Bonnardeaux *et coll.* ont

démontré en 1994 que le polymorphisme A1166C avait une fréquence plus élevée chez les individus hypertendus, ⁽¹³⁶⁾ ce polymorphisme est devenu le plus utilisé pour la réalisation des études génétiques impliquant le gène du récepteur AT₁. Le dernier polymorphisme utilisé dans notre étude est un VNTR de « CA » situé dans la région 3' non codante du gène (figure 6). Dans la population utilisée, 8 allèles différents ont été détectés.

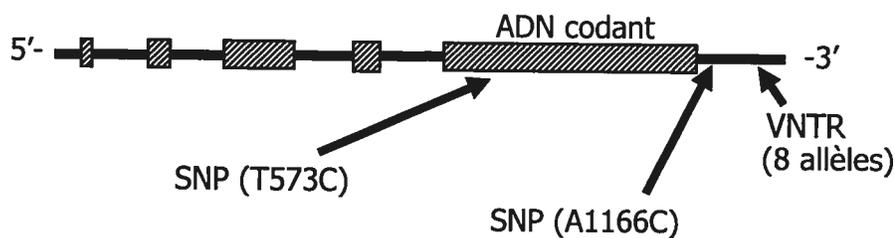


Figure 6 : **Représentation schématique du gène du récepteur AT₁.** Le gène du récepteur AT₁ est situé sur le bras long du chromosome 3 et fait plus de 55 kb (position 3q21-25). Le gène est composé de 5 exons et 4 introns. La région codante du récepteur est localisée dans le 5^e exon alors que les 4 premiers codes pour la région 5' non traduite du gène. Trois polymorphismes ont été utilisés dans cette étude, soit les deux polymorphismes de type SNP T573C et A1166C ainsi qu'un microsatellite de type répétition de « CA » (VNTR) en position 3' du gène dont 8 allèles différents ont été détectés dans notre population. Fait à noter, le SNP T573C est situé dans la région codante du gène sans modifier la séquence en acides aminés.

Condition de détection des polymorphismes T573C et A1166C par PCR.

La stratégie utilisée pour étudier ces polymorphismes a été l'amplification par PCR et la visualisation sur gel de polyacrylamide. À partir de l'ADN génomique des patients de notre population, nous avons utilisé 3 paires d'oligonucléotides qui nous permettent d'amplifier les 3 polymorphismes. Les 3 produits de PCR génèrent des fragments d'environ 300 pb chacun. Cinquante nanogrammes d'ADN génomique ont été utilisés pour un volume réactionnel total de 25µl contenant 50 mmol/L KCL, 5 mmol/L Tris-HCl (pH 8,3), 0,01 % gélatine, 1,5 mmol MgCl₂, 50 µmol/L dNTPs, 10 pmol de chacun des oligonucléotides (Tableau 5) et 0,5 Unité de Taq polymérase (Pharmacia). Pour la détection des différents polymorphismes par la technique de SSCP, chacun des oligonucléotides ont été marqués avec de l'ATP[γ -P³²].

Polymorphisme	Séquence des oligonucléotides	Enzyme de restriction	Fragment généré (pb)
T573C	S1-AATGCTTGTAGCCAAAGTCACCT A1-GGGGAATCCAGGAAAAGAAAAG	Sau3A	204 et 140
A1166C	S6-AGAAGCCTGCACCATGTTTTGAG A6-CCTGTTGCTCCTCTAACGATTTA	Hind III	191 et 219

Tableau 5 : Séquence des oligonucléotides du récepteur AT₁. Séquence des oligonucléotides utilisés pour amplifier les deux polymorphismes du récepteur de l'AII détecté par la méthode de polymorphisme de conformation à simple brin (SSCP).

Détection des polymorphismes par la technique SSCP

Les produits de PCR sont digérés pendant une nuit par l'ajout de 5 unités de l'enzyme de restriction approprié. Ensuite, le produit de digestion est dilué par un facteur deux dans du tampon d'échantillon qui contient 95 % de formamide, 10 mmol/L EDTA, 0,05 % de bleu de bromophénol et 0,05 % de xylène cyanol. Après une dénaturation des échantillons pendant 4 minutes à 94 °C, les échantillons sont placés immédiatement sur la glace. Quatre µl sont déposés sur un gel en condition non dénaturante de 5 % de polyacrylamide (polyacrylamide :bisacrylamide dans un ratio de 49 :1) contenant 5 % de glycérol. L'électrophorèse est migrée à la température de la pièce pendant 6 heures à une puissance constante de 40 W. Les gels sont séchés et la révélation est effectuée par autoradiographie.

Génotypage du polymorphisme microsatellite de type répétition de « CA » (VNTR).

La détection du VNTR a été effectuée par une amplification d'un fragment de 120 pb qui contient la répétition de type « CA » dans la région 3' du gène du récepteur AT₁. Les séquences des oligonucléotides utilisées pour la détection de ce polymorphisme sont : 5'-AGGAGAAATGTTCCAAGGGACAA-3' et 5'-GTATTCCATGTGAAACAGCTCCA-3'. L'amplification par PCR a été effectuée avec 50 ng d'ADN génomique dans un volume réactionnel de 25µl qui contient : 50 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,3), 0,01 % de gélatine, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 50 µmol/L dNTPs, 10 pmol de chacun des oligonucléotides, dont un est marqué avec de l'ATP[γ-P³²] et 0,5 unité de taq polymérase. Après une étape de dénaturation initiale de 4 minutes à 94 °C, 30 cycles de PCR sont effectués. Chacun des cycles de PCR consiste à 20 secondes à 94 °C et 30 secondes à 56 °C. À la fin des 30 cycles, une période d'élongation est ajoutée à 72 °C pendant 12

minutes. 50 μ l de tampon d'échantillon (95% formamide, 10mmol/L EDTA, 0,05% bleu de bromophénol et 0,05% xylène cyanol) est ajouté au produit de PCR et une dénaturation thermique est conduite à 94 °C pendant 4 minutes. Par la suite, 5 μ l de l'échantillon est chargé sur un gel de 6 % de polyacrylamide qui contient 7 mmol d'urée (condition dénaturante). L'électrophorèse est exécutée à 60 W pendant 4 heures et les gels sont séchés et révélés par autoradiographie.

Méthode d'analyse de liaison

Des analyses de liaison quantitative non paramétrique par paire de germains ont été effectuées à l'aide du logiciel SIBPAL version 2.8 du regroupement de logiciels S.A.G.E (Département d'épidémiologie et de Biostatistique, Case Western Reserve University). Le principe de cette méthode d'analyse est basé sur la régression linéaire du pourcentage de partage d'allèles entre deux germains et la différence quantitative du phénotype au carré. Un test *t* unilatéral de Student est effectué pour vérifier si la régression est significative et la valeur *p* associée est également communiquée par le logiciel. Préalablement aux analyses de liaison génétique par SIBPAL, les variables ont été ajustées par une moyenne de régression linéaire tracée en fonction de l'âge, du sexe et de la grandeur. La fréquence allélique des différents marqueurs a été estimée sur la totalité des échantillons soit $n=172$ individus. Le critère initial de liaison correspond à une valeur $p<0,05$, puisqu'une approche par gène candidat est utilisée dans cette étude. La puissance de détection de liaison dans les analyses de paires de germains à paramètre quantitatif est concentrée autant dans les paires de germains concordants que discordants⁽²²²⁾. Ceci explique pourquoi les membres de la même famille ont été inclus dans l'étude même s'il n'avait pas l'appellation affectée.

Pour mieux comprendre le mécanisme de détection de liaison, voici un exemple simple : si deux germains sont concordants pour le phénotype de la pression artérielle, leur différence au carré pour le phénotype sera faible. Alors, un pourcentage de partage allélique plus élevé entre les deux germains est attendu pour avoir liaison avec le phénotype. Inversement, si un germain a une pression artérielle élevée (hypertension) et l'autre a une pression artérielle normale (germains discordants), il y aura une plus grande différence au carré dans le phénotype entre les deux germains. Alors, le pourcentage de partage allélique devrait être beaucoup plus faible pour les polymorphismes causals impliqués. Toutes les paires de germains de la population sont comparées de cette façon par le logiciel SIBPAL. Par la suite, une régression linéaire est effectuée et les résultats des analyses statistiques confirment si la régression est significative. Si effectivement la régression est dite significative, ceci signifie que la majorité des paires de germains étudiées suivent cette règle pour un polymorphisme donné. Alors, il est donc possible de déclarer que le polymorphisme est lié de façon significative au phénotype étudié.

Résultats

Étude de liaison conventionnelle

Les études de liaison standard, par étude de paire de germains, démontrent des liaisons significatives entre des polymorphismes du récepteur AT₁, des paramètres d'échocardiographie, ainsi que des pressions artérielles ambulatoires. Pour les phénotypes

d'échocardiographie, on remarque que les liaisons significatives sont obtenues seulement avec le polymorphisme de type SNP A1166C (Tableau 6). En effet, le marqueur A1166C qui est situé dans la partie 3' non codante du gène est lié de façon significative avec les phénotypes LVMI et IVST qui ont une valeur p de 0,03 et 0,006 respectivement. Aucune liaison significative n'est obtenue entre le VNTR, le T573C et les différents phénotypes d'échocardiographie (Tableau 4).

Analyse de liaison par paire de germains (valeur-p)

échocardiographie

Phénotypes	A1166C	T573C	VNTR
LVMI	0.03	0.6	0.1
IVST	0.006	0.4	0.06
PWT	0.8	0.6	0.7

Tableau 6 : Résultats d'analyse de liaison génétique entre le récepteur AT₁ et les phénotypes d'échocardiographie. Les résultats de l'étude de liaison génétique quantitative par paire de germains, effectuée à l'aide du logiciel SIBPAL, sont exprimés en valeur p. Le critère initial de liaison est une valeur $p < 0,05$, puisqu'une approche par gènes candidats a été utilisée. Les phénotypes étudiés sont l'index de la masse ventriculaire gauche (LVMI), l'épaisseur du septum interventriculaire (IVST) et l'épaisseur de la paroi postérieure (PWT).

Pour les études de liaison de la pression artérielle ambulatoire, les deux marqueurs bialléliques sont liés avec certains phénotypes de pression artérielle (Tableau 7). De façon plus détaillée, le marqueur A1166C est celui qui obtient les liaisons génétiques les plus significatives pour ces phénotypes. Le polymorphisme A1166C est plus fortement lié aux phénotypes de pression ambulatoire de nuit comme la pression systolique de nuit ($p = 0,007$) ainsi que la pression moyenne de nuit ($p = 0,005$). Néanmoins, nous détectons une liaison ($p = 0,04$) entre le marqueur A1166C et le phénotype de la pression systolique de jour. Cependant, le polymorphisme T573C semble être lié de façon significative uniquement à la pression diastolique de jour avec une valeur $p = 0,04$. Aucune liaison significative n'est observée entre le VNTR et les phénotypes de pression ambulatoire.

Analyse de liaison par paire de germains (valeur-p)

Pression artérielle ambulatoire

Phénotypes	A1166C	T573C	VNTR
Jour SBP	0.04	0.5	0.2
DBP	0.3	0.04	0.3
MBP	0.09	0.6	0.5
Nuit SBP	0.007	0.5	0.1
DBP	0.08	0.4	0.08
MBP	0.005	0.4	0.06

Tableau 7 : Analyse de liaison génétique quantitative par paire de germains pour les polymorphismes du gène du récepteur AT₁ et les phénotypes de pression artérielle ambulatoire. Les résultats de l'étude de liaison effectués à l'aide du logiciel SIBPAL sont

exprimés en valeur p . Le critère initial de liaison est une valeur $p < 0,05$ puisque nous utilisons une approche par gènes candidats. Les phénotypes étudiés sont les pressions systoliques de jour et de nuit (SBP), les pressions diastoliques de jour et de nuit (DBP) et la moyenne de la pression artérielle de jour et de nuit (MBP).

Analyse de liaison dynamique du phénotype de l'index de Milwaukee (MI) pour le récepteur AT₁

La première analyse de liaison dynamique présentée dans cette thèse est celle du polymorphisme A1166C du récepteur AT₁ et du phénotype de MI qui est un index de contractilité cardiaque (Figure 7). Le graphique de liaison dynamique est un graphique de valeur p calculé à partir des liaisons génétiques en fonction du temps. Le graphique est séparé en deux catégories : 1) le test de posture qui consiste à placer le patient en position couchée pour 60 minutes, 10 minutes debout et 30 minutes assis et; 2) le test de stress mathématique. Ce test consiste à demander au patient de résoudre, à voix haute, des équations d'arithmétique simples dans un temps donné. *Le principe de notre approche de liaison dynamique est que chacun des points sur le graphique correspond à une analyse de liaison quantitative non paramétrique par paires de germains qui a été effectuée à l'aide du logiciel SIBPAL.* Comme une approche par gène candidat a été utilisée, notre seuil initial de liaison est une valeur $p < 0,05$. Dans le but de faciliter la lecture du graphique, une ligne symbolisant la valeur $p < 0,05$ a été placée sur les différents graphiques de liaison dynamique. Tous les points qui se retrouvent en deçà de cette ligne sont liés de façon significative. Les trois points (●) que l'on retrouve sur chacun des graphiques de liaison dynamique correspondent, respectivement, à l'explication du test de stress

mathématique au patient, au début du test et à la fin du test de mathématique. Grâce à ces points sur le graphique, il nous est possible de voir l'impact du stress mental apporté par ce test sur le système étudié.

À la figure 7, on remarque que le polymorphisme A1166C du récepteur AT_1 est lié de façon significative au paramètre de contractilité cardiaque de MI en position couchée. Les six analyses de liaison obtiennent une valeur p qui se situe entre $p=0,0001$ et $0,04$. Lorsque le patient passe en position debout, on remarque la disparition immédiate de toute liaison génétique significative. À l'instant où le patient passe en position assise, on remarque que 2 points sur 4 sont faiblement liés ($p=0,04$ et $p=0,01$), ce qui peut laisser sous-entendre une sorte de valeur intermédiaire entre la position couchée et la position debout. Pour ce qui est des résultats obtenus lors du test de stress mathématique, on observe qu'après l'explication du test de mathématique les deux lectures suivantes ne sont pas liées de façons significatives, alors qu'à la fin du test on remarque un point qui est faiblement lié ($p= 0,01$).

En résumé, on remarque que le polymorphisme du récepteur AT_1 est lié à la contractilité cardiaque lorsque le patient est en état de repos. Dans le but d'expliquer les résultats obtenus lors du test de mathématique, il est présumé qu'à la fin du test le patient serait soulagé impliquant une relaxation momentanée.

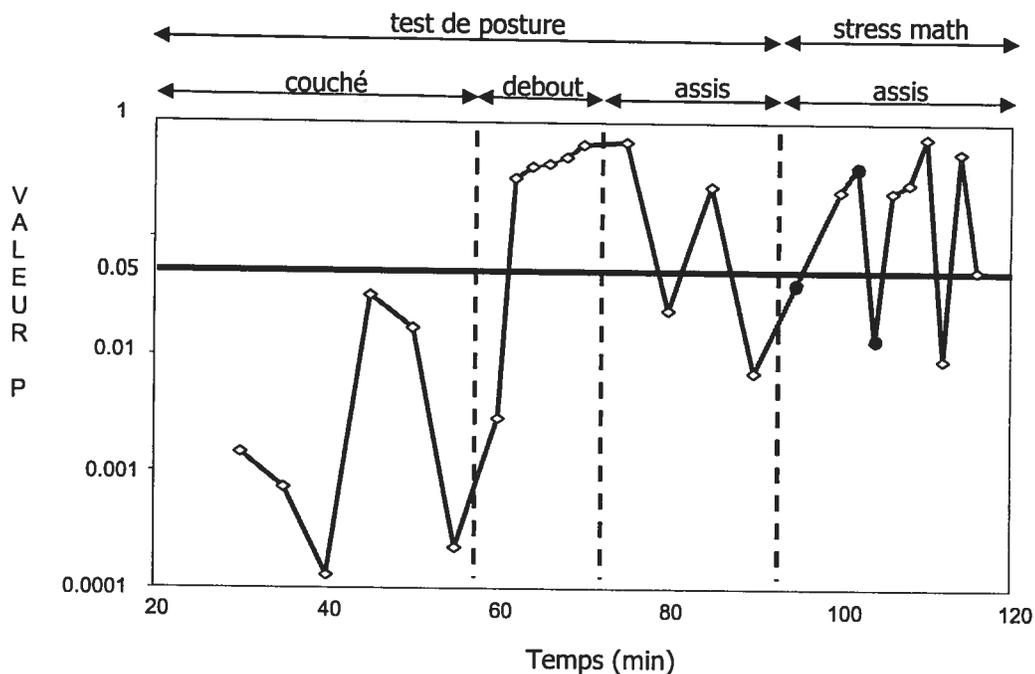


Figure 7 : **Graphique d'étude de liaison dynamique du gène du récepteur AT₁ pour le polymorphisme A1166C et du phénotype d'impédance cardiaque de l'index de Milwaukee (index de contractilité cardiaque).** Le graphique de liaison dynamique est un graphique de valeur p de liaison génétique en fonction du temps. Les analyses de liaison sont effectuées pendant un test de posture qui consiste en 60 minutes en position couchée suivie de 10 minutes en position debout, et de 30 minutes en position assise. Le test de posture est suivi d'un test de stress mathématique qui consiste à demander au patient de résoudre des équations d'arithmétiques simples à voix haute pendant un temps donné. Chaque point du graphique correspond à une analyse de liaisons quantitatives par paires de germains qui a été effectuée à l'aide du logiciel SIBPAL version 2.8 du regroupement de logiciel S.A.G.E. La valeur $p < 0,05$ correspond à notre critère initial de liaison qui est délimité par une ligne sur le graphique. Les 3 points (●) sur le graphique correspondent respectivement à l'explication du test de mathématique au patient, le début du test et la fin du test.

Il est intéressant de comparer le graphique de liaison dynamique avec le graphique de la valeur moyenne du phénotype de l'index de contractilité cardiaque (MI) (Figure 8). Le but de ce graphique est d'observer l'évolution de la moyenne de la contractilité cardiaque pour la cohorte de patients dans le temps. A priori il est remarqué qu'au repos, les valeurs de contractilité cardiaque sont plus élevées. Lorsque les patients passent en position debout, la moyenne de la valeur de MI chute immédiatement. Il est important de souligner que la chute de contractilité dans la population (Figure 8, panneau A) est synchrone dans le temps avec la disparition de valeurs significatives de liaison en position debout (Figure 8, panneau B). Pour ce qui est des moyennes de MI et le test de stress mathématique, on remarque une augmentation significative de l'index à la fin du test en question. Comme il a été mentionné ci-dessus, on présume que ce changement s'expliquerait par une relaxation momentanée provoquée par la fin du test de mathématique.

Lorsque la valeur moyenne de contractilité cardiaque est élevée, les valeurs p de liaison dynamique sont liées de façon significative. Tandis que, lorsque ces mêmes valeurs chutent (au changement de posture couchée-debout), il n'y a plus aucune liaison significative. Ceci suggère que le polymorphisme A1166C du récepteur AT_1 est lié significativement à la contractilité cardiaque et exclusivement à des valeurs élevées de MI.

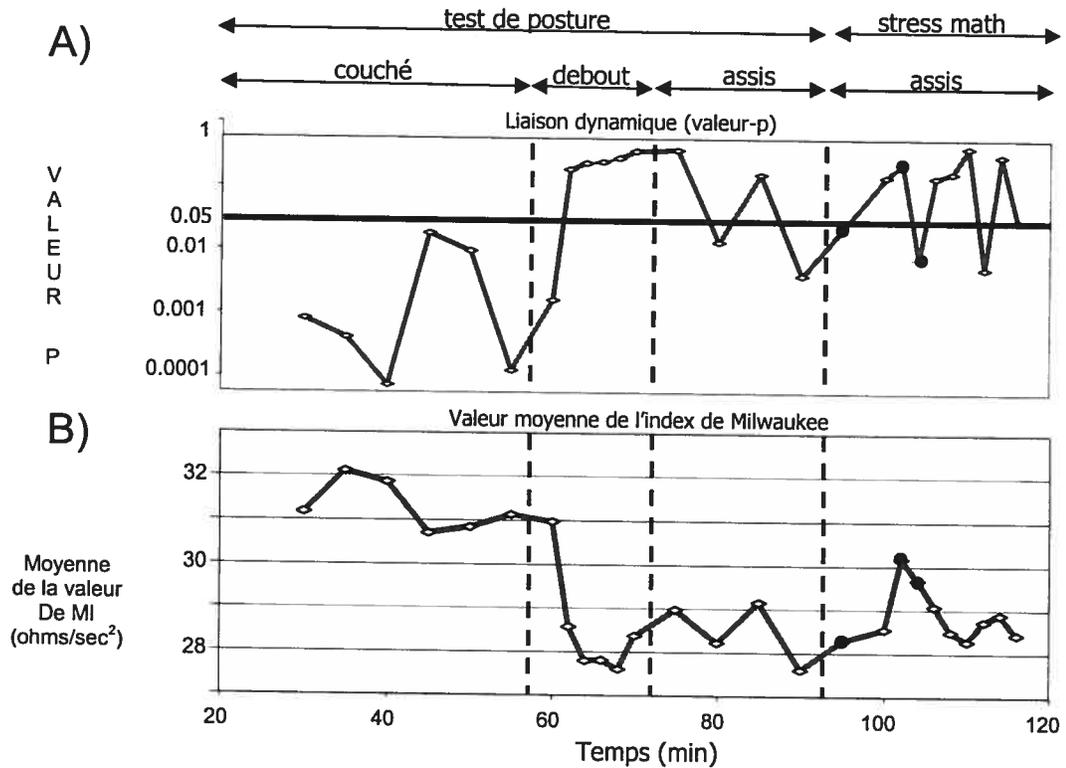


Figure 8 : Graphique comparatif entre la liaison dynamique du polymorphisme A1166C du récepteur AT₁ et de l'index de Milwaukee et la valeur moyenne de l'index de Milwaukee (index de contractilité cardiaque) en fonction du temps. A) Graphique de liaison dynamique de la figure 7. B) Graphique de valeur moyenne de l'index de Milwaukee. Chacun des losanges correspond à une moyenne de l'index de contractilité cardiaque de la cohorte de patients en un temps donné. Les 3 points (●) correspondent respectivement à l'explication du test de mathématique au patient, le début du test et la fin du test.

Analyse de liaison dynamique du phénotype du rythme cardiaque pour le récepteur AT₁

Le deuxième phénotype présenté dans cette thèse comme exemple de résultat de liaison dynamique est celui du rythme cardiaque. La figure 9 représente le graphique de dynamique du récepteur AT₁ pour le polymorphisme A1166C. Pour le test de posture en position couchée, on remarque qu'aucun point de liaison n'est significatif. Cependant, lorsque le patient passe en position debout, on remarque l'apparition rapide d'une liaison génétique dont la plus significative a une valeur $p=0,006$. Par la suite, en position assise, le regroupement de points est un intermédiaire entre la position debout et couchée; c'est-à-dire que la liaison génétique disparaît lentement au fur et à mesure que le patient atteint un état de relaxation. En ce qui concerne le test de stress mathématique, on constate qu'aucun des points du test n'est vraiment lié de façon significative. Les deux points qui correspondent à l'exécution du test ainsi que la fin du test ne sont pas liés au phénotype du rythme cardiaque.

En résumé pour ce qui est du phénotype du rythme cardiaque, le polymorphisme A1166C du récepteur AT₁ est lié de façon significative au test de posture, plus précisément lorsque le patient est en position debout et de façon moins prononcée en position assise.

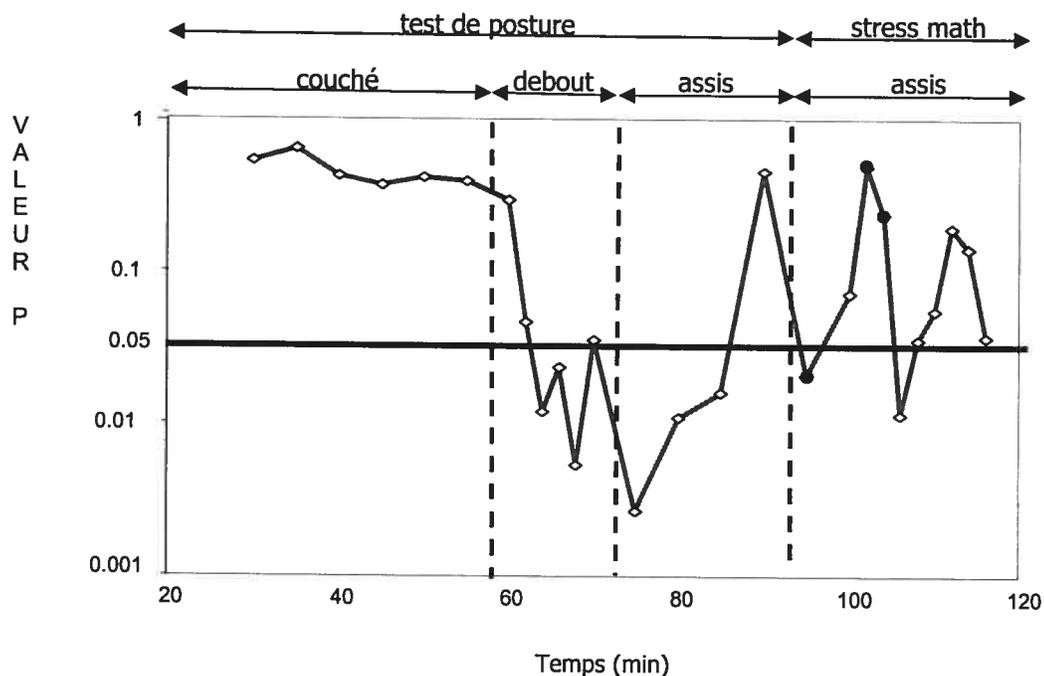


Figure 9 : **Graphique d'étude de liaison dynamique du gène du récepteur AT₁ pour le polymorphisme A1166C et du phénotype du rythme cardiaque.** Le graphique de liaison dynamique est un graphique de valeur p de liaison génétique en fonction du temps. Les analyses de liaison sont effectuées pendant le test de posture qui consiste en 60 minutes en position couchée suivie de 10 minutes en position debout et de 30 minutes en position assise. Le test de posture est suivi d'un test de stress mathématique qui consiste à demander au patient de résoudre des équations d'arithmétique simples à voix haute pendant un temps donné. Chaque point du graphique correspond à une analyse de liaisons quantitatives par paires de germains qui a été effectuée à l'aide du logiciel SIBPAL version 2.8 du regroupement de logiciel S.A.G.E. La valeur $p < 0,05$ correspond à notre critère initial de liaison qui est délimitée par une ligne sur le graphique. Les 3 points (●) sur le graphique correspondent respectivement à l'explication du test de mathématique au patient, le début du test et la fin du test.

La figure 10 compare le graphique de liaison dynamique (panneau A) avec la valeur moyenne du rythme cardiaque en fonction du temps dans la population (panneau B). Il est important de remarquer que l'augmentation du rythme cardiaque causée par le changement de posture des patients (le panneau B) est liée de façon significative (panneau A) au polymorphisme du récepteur AT_1 . Cependant, l'augmentation significative du rythme cardiaque causée par le stress mental du test de mathématique ne semble pas être sous le contrôle du récepteur de l'AII, puisque l'augmentation du rythme cardiaque pendant le test (deuxième et troisième points (●) sur le panneau B) n'est pas liée de façon significative sur le panneau A du graphique de liaison dynamique.

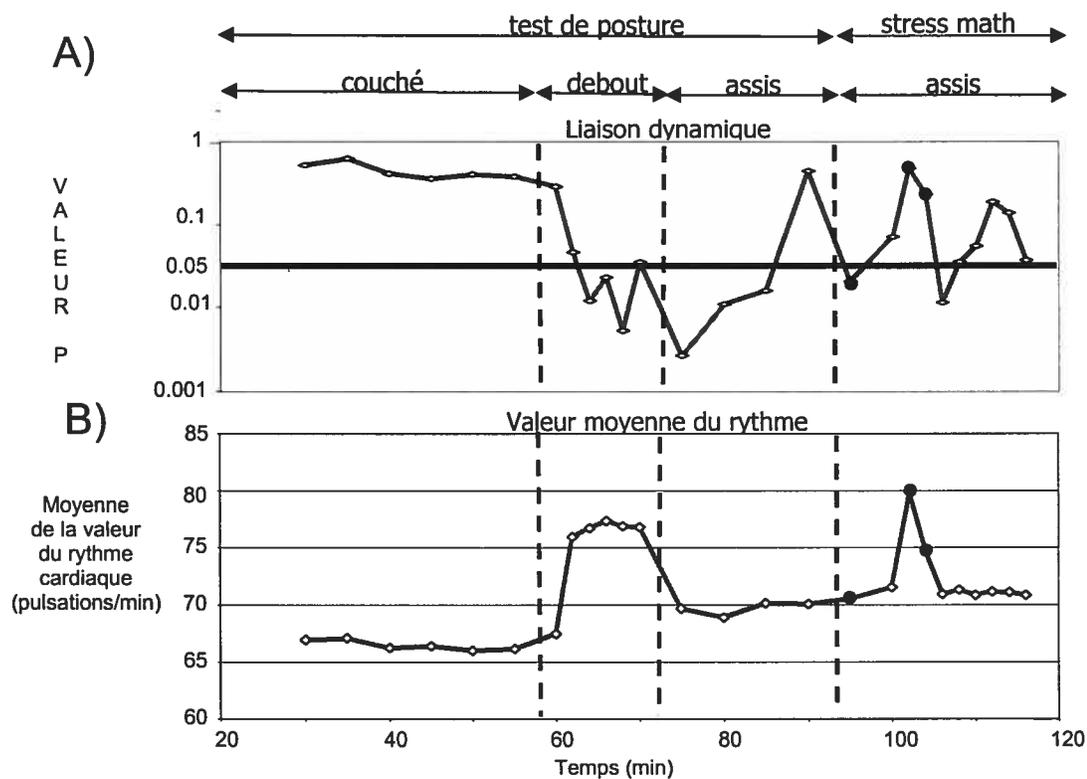


Figure 10 : **Graphique comparatif entre la liaison dynamique du polymorphisme A1166C du récepteur AT₁ et la valeur moyenne du rythme cardiaque en fonction du temps.** A) Graphique de liaison dynamique de la figure 9. B) Graphique de valeur moyenne du rythme cardiaque. Chacun des losanges correspond à une moyenne du rythme cardiaque de la cohorte de patients en un temps donné. Les 3 points (●) correspondent respectivement à l'explication du test de mathématique au patient, le début du test et la fin du test.

Conclusion de l'étude

Les études de liaison standard par paires de germains démontrent que le locus du gène du récepteur AT₁ joue un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle ainsi que dans l'hypertrophie cardiaque.

On remarque que d'après les évaluations temporelles de liaison dynamique, il est possible d'observer et de suivre la liaison génétique. L'apparition ou la disparition de liaison génétique significative causée par un changement de posture ou un stress mental est quasi immédiate. Cette particularité en fait une technique de choix pour évaluer et pour décortiquer l'implication et le fonctionnement de systèmes complexes tels que le SRA. À notre connaissance, il s'agit de la première étude de liaison dynamique.

D'autre part, cette technique permet de positionner le principe de liaison génétique dans un contexte physiologique global. Nous croyons que cette approche permet l'identification de liaisons génétiques qui serait normalement indécélables ou insoupçonnée avec la technique de liaison traditionnelle. Généralement, les phénomènes pathologiques sont indétectables au premier abord. Par contre, ils peuvent être mis en évidence par une intervention extérieure ou une stimulation environnementale. Nous croyons que certaines liaisons génétiques peuvent être détectées seulement lorsque que le système en question est stimulé par des facteurs environnementaux.

D'ailleurs, cette technique nous a révélé des résultats plutôt surprenants, qui peuvent, en partie, expliquer la source de nombreuses divergences dans les différentes études génétiques du SRA (Tableau 4).

Chapitre 6 : Discussion

Discussion de l'étude des sites de glycosylation du récepteur AT₁.

Le rôle et les propriétés pharmacologiques des sites de glycosylation ont été étudiés pour plusieurs membres de la famille des GPCR (223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239). La plupart des études de mutation des sites de glycosylation par mutagenèse dirigée ou traitement chimique causent une réduction de l'expression des récepteurs à la surface cellulaire. Cependant, cette suppression des sites de glycosylation a très peu de conséquences sur les propriétés de liaison des récepteurs ainsi que sur la transduction du signal vers les protéines G. Certains récepteurs font exception : le récepteur déglycosilé du calcium⁽²³⁵⁾, « glucagon-like peptide receptor » GLP-1⁽²³⁹⁾, « luteinizing hormone receptor » LH⁽²³⁴⁾ ainsi que le récepteur de tyrotropine⁽²³⁷⁾. Ces récepteurs subissent tous une réduction de leur expression à la surface cellulaire ainsi qu'une perte d'affinité pour leur ligand, sans compter les problèmes de voie de signalisation.

Comme la plupart des récepteurs à sept passages transmembranaires, le récepteur AT_{1a} de rat possède plusieurs sites potentiels de glycosylation^(71,67). Le premier site de glycosylation est situé en N-terminal sur l'Asn⁴, alors que les deux autres sont situés sur la seconde boucle extracellulaire en position Asn¹⁷⁶ et Asn¹⁸⁸. Une étude préliminaire de Yamano *et coll.*⁽⁷⁵⁾ rapporte que la monosubstitution de ces sites de glycosylation n'avait aucun effet sur l'affinité du récepteur envers [I¹²⁵]-[Sar¹-Ile⁸]Ang II. Dans notre étude, nous avons utilisé une approche de mutagenèse dirigée pour évaluer le rôle de chacun des sites potentiels de glycosylation sur la fonction du récepteur, l'expression du récepteur à la membrane plasmique, l'affinité du récepteur avec son ligand et finalement les propriétés de

couplage du récepteur avec la phospholipase-C. Ce travail implique des techniques de marquage par photoaffinité et de construction des récepteurs étiquetés mutants et sauvages, dans le but de les détecter par immunobuvardage de type western ainsi que par immunocytochimique.

Tous les mutants ont été générés à partir d'un récepteur portant un épitope de 10 acides aminés de l'oncogène c-Myc en position C-terminal du récepteur. L'Asn¹⁷⁶ et l'Asn¹⁸⁸ ont été mutées en Gln, alors que Asn⁴ a été simplement supprimée par l'enlèvement des quatre premiers acides aminés qui ont été remplacés par une séquence c-Myc additionnelle. L'introduction de ces épitopes, incluant l'épitope en N-terminal associé à la suppression de l'Asn⁴, ne modifie en aucun cas la liaison de la [¹²⁵I]-[Sar¹]Ang II ainsi que le couplage avec la phospholipase C. Les résultats d'analyse de SDS/PAGE et d'immunobuvardage de récepteurs photomarqués déglycosylés par réaction enzymatique, démontrent clairement que les trois sites potentiels de glycosylation sont utilisés dans les cellules COS-7.

Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de Yamano *et coll.* ⁽⁷⁵⁾ qui a démontré que la substitution individuelle des trois sites potentiels de glycosylation ne modifie pas l'affinité de liaison des récepteurs. Yamano *et coll.* n'a pas investigué l'effet de double ou triple mutation sur les propriétés pharmacologiques ainsi que sur les niveaux d'expression des différents récepteurs. Une analyse exhaustive des propriétés des récepteurs mutants qui ont un ou plusieurs sites de glycosylation manquants, nous permet de tirer des conclusions sur les exigences requises pour l'obtention d'une expression normale. Les glycosylations sont absolument nécessaires pour l'expression normale du récepteur AT₁ à la membrane plasmique, puisque le récepteur muté aux trois sites de glycosylation n'est aucunement détectable par liaison avec son ligand ainsi que par

immunocytochimie sur cellule intacte non perméabilisée. Nous démontrons également que la présence de deux sites de glycosylation, peu importe leur localisation, procure des résultats d'expression similaires à ceux du récepteur de type sauvage. Il est intéressant de constater que la conservation de l'Asn¹⁷⁶ assure, à elle seule, une expression optimale, ce qui n'est pas le cas des deux autres sites de glycosylation (l'Asn⁴ et l'Asn¹⁸⁸). Cela démontre clairement que le rôle des chaînes sacchariniques sur les différents sites potentiels n'est pas équivalent. Ces résultats sont également confirmés par deux autres études publiées quelques mois suivant la nôtre^(240,241). Par contre, de tous les récepteurs mutants exprimés à la surface membranaire des cellules COS-7, aucun d'entre eux ne démontre de modification de leurs propriétés pharmacologiques (K_d pour la liaison de [¹²⁵I]-Sar¹-AII et la production d'IP par la Sar¹-AII) comparativement au récepteur sauvage. Il est alors suggéré que les récepteurs mutants se couplent de façon efficace avec la machinerie intracellulaire. De plus, la baisse des taux de production d'inositol phosphate (IP) est expliquée simplement par la diminution du nombre de récepteurs exprimés à la surface cellulaire.

Ces récepteurs étiquetés ont permis l'évaluation de la localisation cellulaire des différents récepteurs. Les récepteurs étiquetés par l'oncogène c-Myc en N-terminal sont parfaitement appropriés pour la détection spécifique des récepteurs par l'extérieur de la cellule. D'autre part, les récepteurs confinés à l'intérieur de la cellule sont détectés au moyen de cellules perméabilisées. L'étude confirme que les récepteurs mutants indétectables à l'aide de la liaison du ligand sur des cellules intactes n'étaient tout simplement pas exprimés à la surface de la membrane plasmique des cellules. Cependant, sur des cellules perméabilisées, ces mêmes mutants étaient détectés par la technique d'immunocytochimie. Nous en concluons donc que la biosynthèse des récepteurs n'était pas affectée par la suppression des sites de glycosylation. De plus, la fluorescence causée par l'expression des récepteurs est plus concentrée près du noyau cellulaire, ce qui suggère

que les récepteurs mutants non transportés à la membrane s'accumulent au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule. Cette observation abonde dans le même sens des études qui ont démontré que la suppression des sites de glycosylation sur le récepteur de la prolactine, avait pour conséquence de séquestrer les récepteurs dans les organelles périnucléaires, et ainsi prévenir les récepteurs d'atteindre la membrane plasmique ⁽²⁴²⁾. Deux hypothèses sont suggérées afin d'expliquer le problème d'expression à la membrane plasmique de certains mutants déglycosylés. La première sous-entend un problème de dégradation. Il est connu que les sites de glycosylation ont un effet protecteur sur les protéines glycosylées en circulation ⁽²⁴³⁾. Il semble donc raisonnable de croire que ces sites protègent les récepteurs AT₁ d'une dégradation protéolytique à l'intérieur du réticulum endoplasmique. La deuxième hypothèse est liée au repliement de la protéine qui empêche celle-ci d'être transportée et incorporée à la membrane. En effet, plusieurs études dans la littérature décrivent le rôle des sites de glycosylation sur la maturation et le repliement des protéines. Le processus de repliement des protéines glycosylées, basé sur l'interaction de la protéine avec des chaperons moléculaires, telles la lectine, la calnexine et le calreticulin, a été décrit dans la littérature ^(244,245,246). Cependant, des mécanismes de repliement dépendant et indépendant de la calnexine ont été décrits, par exemple, dans le processus de maturation des protéines du récepteur du peptide-1 vasoactif intestinal ⁽²²⁶⁾. Or, les études mettant en relation les sites de glycosylation et les chaperons moléculaires comme la lectine présente dans le réticulum endoplasmique, doivent être étendues à d'autres membres de la famille des GPCR.

Jusqu'à présent, le rôle général des sites de glycosylation pour cette famille de récepteurs (GPCR) n'a pas été clarifié. Alors que les glycosylations sont nécessaires dans le trafic vers la membrane plasmique pour le récepteur β_2 -adrénergique ^(223,224,225), le récepteur du peptide vasoactif intestinal ⁽²²⁶⁾ ainsi que celui de la rhodopsine ⁽²²⁷⁾, il a été également rapporté que les glycosylations n'étaient pas nécessaires à la maturation des

récepteurs m_2 muscariniques ⁽²²⁹⁾, récepteurs H_2 histaminiques ⁽²⁴⁷⁾ ainsi que pour ceux de la parathyroïde ⁽²³⁰⁾. Notre étude démontre que les sites de glycosylations semblent être nécessaires dans la maturation et l'expression des récepteurs AT_1 . De plus, ces résultats ont été confirmés par Lanctôt *et coll.*, quelques mois après notre publication en 1999 ⁽²⁴⁰⁾. Le rôle des glycosylations sur la maturation du récepteur AT_1 peut également expliquer les difficultés que notre groupe a rencontré lors de tentatives d'exprimer ce récepteur dans les cellules SF9 d'insectes (D. Solier, J. C. Bonnafous et J. Marie résultats non publiés) et *Escherichia coli* (B. Bertin, J. Marie et D. Strosberg communication personnelle). C'est que le système cellulaire d'*E. coli* n'a aucun processus de glycosylation, alors que celui des cellules SF9 diffère grandement de celui de cellules de mammifères ⁽²⁴⁸⁾.

En conclusion, notre étude démontre que : le récepteur de rat AT_{1a} est glycosylé à ces trois sites potentiels lorsqu'il est exprimé dans les cellules COS-7 et que les sites de glycosylation ne jouent pas un rôle de grande importance dans la reconnaissance du ligand ainsi que dans les propriétés fonctionnelles du récepteur AT_1 . Cependant, les sites de glycosylation jouent un rôle protecteur contre la dégradation et semblent être impliqués dans le transport du récepteur du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique comme le démontrent les taux d'expression extrêmement bas du récepteur complètement déglycosylé.

Le développement de systèmes de surexpression et de purification demeure un défi de taille pour la plupart des laboratoires qui travaillent sur les relations structure-fonction des GPCR. Dans cette optique, ce travail constitue un préalable pour des études futures de structure puisqu'il a permis d'obtenir différentes constructions de récepteurs qui préservent leurs propriétés de liaison et d'expression tout en offrant un processus de purification par l'utilisation des anticorps anti c-Myc.

Étude génétique du récepteur AT₁.

Les études de liaison standard par paires de germains à paramètre quantitatif, démontrent des liaisons significatives entre des polymorphismes du récepteur AT₁, des paramètres d'échocardiographies ainsi que des pressions artérielles ambulatoires. Pour les phénotypes d'échocardiographie, on remarque que les liaisons significatives sont obtenues seulement avec le polymorphisme de type SNP A1166C (tableau 6). Effectivement, le marqueur A1166C, qui est situé dans la partie 3' non codante du gène, est lié de façon significative avec les phénotypes LVMI et IVST qui ont une valeur p de 0,03 et 0,006 respectivement. Aucune liaison significative n'est obtenue pour le VNTR, le T573C et les différents phénotypes d'échocardiographie. Il est maintenant bien reconnu que le SRA peut induire une hypertrophie cardiaque. Les études de liaisons génétiques confirment cette implication du système autant chez le rat que chez l'humain ^(249,250,30,251,143). Alors, les résultats obtenus lors de notre étude confirment la liaison du récepteur AT₁ avec l'hypertrophie cardiaque dans une population d'origine canadienne-française.

En ce qui concerne les études de liaisons génétiques de la pression artérielle ambulatoire, les deux marqueurs biallélique (A1166C et T573C) sont liés avec certains phénotypes de pression artérielle (tableau 7). De façon plus détaillée, le marqueur A1166C est celui qui obtient les liaisons génétiques les plus significatives pour ces phénotypes. Le polymorphisme A1166C est plus fortement lié aux phénotypes de pression ambulatoire de nuit telle que la pression systolique de nuit ($p = 0,007$) ainsi que la pression moyenne de nuit ($p = 0,005$). Ces observations laissent croire que, dans notre population, la pression artérielle semble être sous contrôle du SRA pendant la nuit lorsque le patient est au repos.

Il est important de préciser qu'aucune liaison significative n'est détectée à l'aide du marqueur A1166C à l'égard des phénotypes de pression ambulatoire de jour. Ces résultats prennent toute leur importance lorsqu'ils sont comparés aux analyses de liaison dynamique.

Le principe de liaison dynamique est une étude de liaison en fonction du temps qui implique des stimuli extérieurs comme un test de posture et un stress mental. Lorsqu'on observe les résultats obtenus par l'analyse de liaison dynamique du marqueur A1166C et du phénotype de la contractilité cardiaque (MI) (figure 7), on remarque immédiatement le regroupement de liaisons significatives ($p=0,0001-0,04$) dans la première portion du graphique qui correspond au test de posture en position couchée. Cette séquence de liaisons significatives disparaît dès que le sujet change de posture vers la position debout. Cette disparition rapide laisse présager qu'un autre système de régulation pourrait entrer en jeu à ce même moment, pour contrer la différence de contractilité cardiaque apportée par le changement de posture (figure 8 B). Les résultats d'analyses génétiques dynamiques soutiennent ceux obtenus au tableau 7 par liaison conventionnelle sur les pressions ambulatrices de nuit qui entérinent l'implication du SRA lorsque le patient est au repos. Pour ce qui est des résultats obtenus pendant le stress mental, issu du test de mathématique, il est difficile de tirer des conclusions sur ce groupe de liaison. Lorsqu'on analyse les points de liaison comme un regroupement, la moyenne de ceux-ci en fait un résultat de liaison non significatif. En décortiquant le test de mathématique, les deux points de liaison qui suivent l'explication du test proprement dit, marquent le début du stress que procure cet exercice mental au patient. Le principe avancé ci-dessus, explique pourquoi aucun des deux points ne procure des résultats de liaison significative, puisque le SRA est impliqué seulement lorsque le patient est dans un état de repos. Par contre à la fin du test, on note l'apparition d'une liaison significative qui pourrait être expliquée par une relaxation subite créée par la complétion du test. Cependant, cette explication n'est qu'une hypothèse. En effet, les points de liaison dynamique qui suivent le test de mathématique démontrent une

oscillation semblable à celle que l'on retrouve pendant le test. On s'attendrait à retrouver un regroupement de points dont la moyenne laisserait présager des liaisons significatives. Par conséquent, il nous est impossible d'apporter une explication logique à cette oscillation qui suit le test de mathématique.

Le deuxième phénotype étudié à l'aide de la technique de liaison dynamique est le rythme cardiaque. La figure 9 représente l'étude de liaison dynamique du récepteur AT_1 pour le polymorphisme A1166C. Les résultats obtenus lors de cette analyse sont pratiquement à l'inverse de ceux observés pour l'index de Milwaukee; c'est-à-dire qu'aucune liaison significative n'est observée lorsque les sujets sont au repos (test de posture couchée). Par contre, lorsque le patient passe en position debout, il y a apparition immédiate d'un regroupement de liaisons significatives envers le phénotype du rythme cardiaque. Cette disparition immédiate est beaucoup trop rapide pour être attribuée seulement au SRA. Grâce à la dynamique de liaison, il nous est donc possible de poser comme hypothèse qu'un système en aval du SRA, par exemple le système adrénérgique, pourrait être responsable des effets observés.

Il est reconnu que le SRA n'est pas le système de contrôle de pression artérielle de première ligne pour les modifications rapides de pression via une vasoconstriction. Normalement, le SRA (par vasoconstriction) prend approximativement 10-15 minutes pour avoir un effet significatif sur la variation de la pression (figure 3) ⁽³⁹⁾. Cependant, le système nerveux central offre un temps de réponse beaucoup plus court avec une intensité beaucoup plus grande (figure 3) ⁽³⁹⁾. La vasoconstriction effectuée par l'activation du SRA est plutôt reconnue comme étant un système de contrôle à vitesse modérée. D'autre part, la

libération par les surrénales des hormones épinéphrine et norépinéphrine par la voie du SNC et périphérique est reconnue comme étant un système puissant et très rapide. Ces deux hormones circulent et causent essentiellement le même effet en contrôlant la pression artérielle par une stimulation sympathique directe. Ces hormones ont un effet inotrope et chronotrope et produisent également une vasoconstriction des vaisseaux sanguins ⁽³⁹⁾.

Pour tenter de vérifier l'hypothèse que le système adrénergique pourrait être en partie responsable de certains effets observés sur les résultats de liaison dynamique, nous avons eu recours à des marqueurs déjà génotypés dans le cadre d'un scan total du génome effectué sur notre population ⁽²⁵²⁾. Nous les avons analysés à l'aide des outils de liaison dynamique. Les résultats préliminaires obtenus de cette expérience sont représentés à la figure 11. Le marqueur utilisé est le c10s1230 localisé sur le chromosome 10 humain. Ce marqueur a la particularité d'être situé à seulement 8 cM du gène des récepteurs adrénergiques β -1 (ADRB1) et α -2 (ADRA2). Le ADRA2 est reconnu de façon globale pour exercer les effets hypertenseurs du SNC soit par son activation ou par son inhibition ^(253,254). De par ses effets, le ADRA2 est donc un excellent gène candidat.

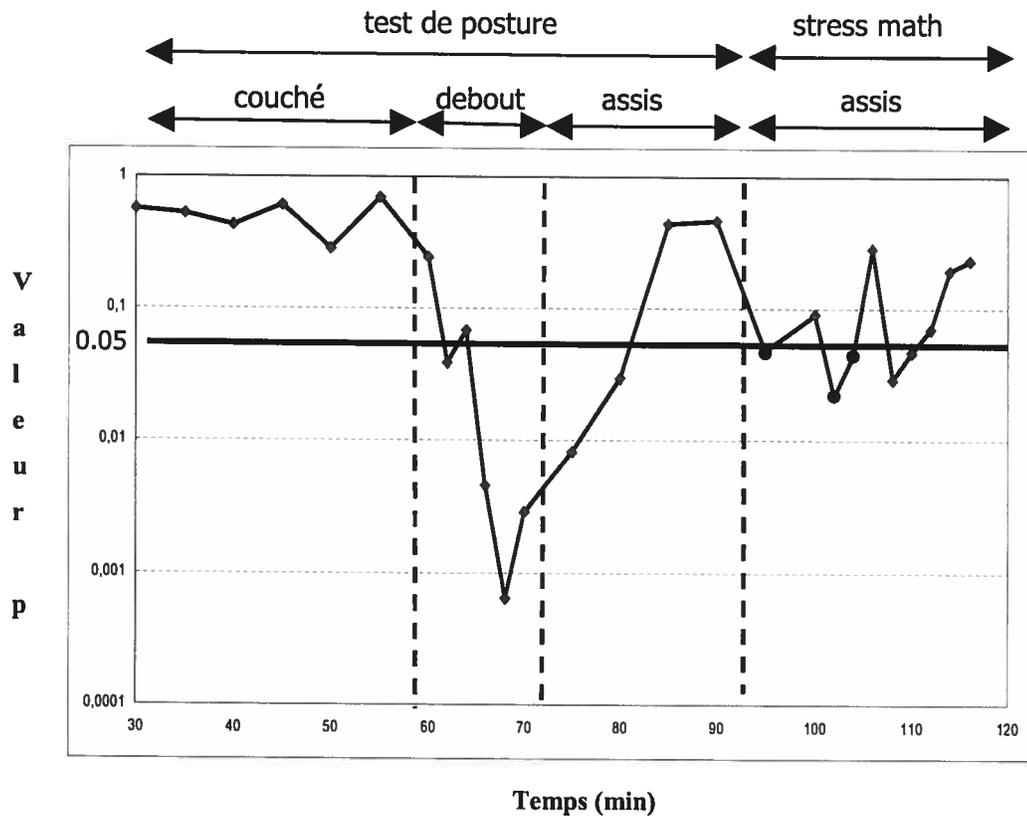


Figure 11 : Analyse dynamique du marqueur c10s1230 sur le chromosome 10 situé à 8 cM du récepteur adrénergique β -1 et α -2 pour le phénotype de la pression diastolique

Les résultats de cette expérience préliminaire démontrent l'implication du locus dans le contrôle de la pression diastolique pendant le test de posture lorsque les patients passent en position debout. Il est important de prendre note qu'aucune liaison significative n'est observée lorsque les sujets sont en position couchée (au repos pour une période de 60 minutes). Il est aussi essentiel de noter que l'apparition de liaison occasionnée par le

changement de posture est immédiate. De ce fait, ceci confirme l'implication probable des gènes candidats dans le contrôle de la pression artérielle observée sur le graphique de dynamique (figure 11). Par contre, les résultats de liaison dynamique obtenus avec le SRA et les récepteurs bêta et alpha adrénergiques ne sont pas sans relation. Il existe une relation directe entre ces deux systèmes. Une des conséquences directes de l'activation du ADRB1 est l'augmentation de la sécrétion de rénine par le rein, qui à son tour, augmente la production de l'AII circulante ⁽²⁵⁵⁾. De plus, l'AII circulante facilite le largage de la norépinéphrine présynaptique ⁽³³⁾. Donc, l'AII contribue au contrôle de la pression artérielle via le SNC par l'interaction des deux systèmes.

En ce qui a trait aux études dynamiques du test de mathématique, les résultats de la figure 9 et 11 semblent être plus concluants. Premièrement, il est possible de constater l'impact du stress mental à la figure 10 (panneau B) sur le rythme cardiaque. Celui-ci augmente de façon significative dès le début du test de mathématique. Pour ce qui est des résultats de liaisons dynamiques, le stress mental causé par le test de mathématique semble être lié autant au SRA qu'au marqueur c10s1230 (candidat des récepteurs du système adrénergique). Il est également possible de noter que la liaison apparaît de façon un peu plus tardive pour le SRA, alors que pour le système adrénergique, la liaison est immédiate tout au long du test. Cependant, nous maintenons qu'il est difficile de tirer des conclusions définitives dans ces régions du graphique de liaison dynamique, du fait de la présence d'oscillations fréquentes des points.

Cette approche peut expliquer, du moins en partie, certains résultats discordants obtenus dans les différentes études génétiques effectuées sur le récepteur AT₁ (tableau 4). Il est évident qu'il existe plusieurs facteurs qui peuvent contribuer à générer ces résultats contradictoires tels le choix de la population, le type d'analyse génétique (liaison en structure familiale vs association cas/témoin), l'historique familial des sujets recrutés etc.

Cependant, les nouvelles observations apportées par l'étude de liaison dynamique ne sont pas à négliger. Les résultats démontrent très clairement qu'un facteur aussi simple que la posture du sujet au moment du phénotypage peut faire la différence entre un résultat de liaison positif ou négatif (voir figures 7, 9 et 11). La question n'est plus de savoir si le gène du récepteur de l'AII est lié à des phénotypes intermédiaires de l'hypertension essentielle, mais plutôt de savoir à quel moment et sous quelles conditions il est lié. Il est possible d'imaginer deux équipes de recherche qui effectuent une analyse génétique du récepteur AT₁, où l'une prend les mesures phénotypiques au repos, alors que l'autre les prend en position debout ou assise. En faisant référence aux résultats de liaison dynamique, les deux groupes n'arriveront pas à la même conclusion. Une équipe détectera une liaison significative et la deuxième trouvera probablement l'inverse puisque nous savons maintenant que l'implication du SRA s'observe dans certains cas au repos alors que dans d'autres, après un changement de posture.

Nous croyons qu'il est maintenant essentiel de positionner le principe de liaison génétique dans un contexte de stimulation plus physiologique et temporel pour tenter de mieux comprendre l'implication des différents gènes impliqués dans l'expression d'un phénomène. À notre connaissance, il s'agit de la première démonstration de liaison génétique dynamique. L'approche de liaison dynamique est une nouvelle méthode qui peut être utile dans la recherche ultime d'une meilleure compréhension des différents mécanismes impliqués dans des pathologies complexes comme l'hypertension essentielle.

L'obésité est un problème majeur dans les sociétés industrialisées. L'utilisation de la génétique moléculaire a grandement contribué à la compréhension de la pathogenèse de maladies complexes telles l'obésité et l'hypertension. Depuis quelques années, plusieurs gènes ont été identifiés et impliqués dans la régulation de la prise alimentaire ainsi que dans le contrôle de la dépense énergétique. Étonnamment, certains de ces gènes sont impliqués autant dans la régulation de la balance énergétique que dans le contrôle de la pression artérielle. Il est évident que l'étude de ces gènes est prioritaire à la poursuite d'une meilleure compréhension de l'hypertension artérielle.

Implication du locus du gène de TNF- α dans l'obésité et l'obésité associée à l'hypertension

Les résultats de l'étude de liaison et d'association du locus du gène de TNF- α suggèrent que le locus du gène soit impliqué dans la pathogenèse de l'obésité et de l'obésité associée à l'hypertension dans les familles hypertendues canadiennes-françaises. Les résultats obtenus ne prouvent pas catégoriquement l'implication du gène de TNF- α , puisqu'aucune expérience n'a été faite dans le but de démontrer qu'une mutation serait directement responsable des effets observés dans notre population. Cependant, en considérant les actions connues de ce gène, celui-ci représente le meilleur candidat dans cette région chromosomique.

L'implication du locus du gène de TNF- α dans le développement de l'obésité a déjà été soulignée précédemment dans la littérature. Une relation significative entre le locus du gène et différentes mesures globales d'adiposité a été rapportée dans différentes populations telles que les Indiens Pimas ainsi que chez des européens de race blanche ⁽²⁵⁶⁾ ^(257,258,259). Les études précédentes ont été effectuées sur des familles ou des groupes d'individus non reliés qui souffraient soit d'obésité ou de diabète non insulino-dépendant. Peu d'études ont été menées sur des patients hypertendus. Cependant, l'implication du gène de TNF- α dans les lignées de rats hypertendus a été étudiée par notre groupe ainsi que par nos collaborateurs ^(216,119,215). Par contre, les résultats de notre étude génétique portant sur le gène de TNF- α et l'obésité complètent bien les observations rapportées dans la littérature.

Auparavant, aucune étude n'avait démontré une implication quelconque du locus du gène de TNF- α avec l'obésité associée à l'hypertension chez l'humain. Cependant, une corrélation positive avait été observée dans une population canadienne isolée entre la concentration de TNF- α dans le sérum, la pression systolique et l'obésité associée à la résistance à l'insuline ⁽²⁶⁰⁾. Il a été également démontré que TNF- α était impliqué dans le développement de dysfonction endothéliale. Kahaleh *et coll.* ont rapporté que le gène de TNF- α stimule la production de l'endothéline-1, un puissant vasoconstricteur, dans les cellules de muscle lisse vasculaire ⁽²¹⁸⁾. Plus tard, l'interaction du TNF- α avec l'endothéline-1 est confirmée par Winkler *et coll.* ⁽²¹⁷⁾ qui démontrent une relation positive significative entre les niveaux de TNF- α sériques et les taux d'endothéline-1 chez des patients souffrant d'obésité androïde. D'ailleurs, plusieurs études ont rapporté que la synthèse et la sécrétion de TNF- α en réponse à la stimulation de liposaccharide sont augmentées chez les rats SHR comparativement aux rats témoins normotendus ⁽²⁶¹⁾. Cet effet était plus prononcé dans les cellules adipeuses et était également associé à une augmentation de l'expression du gène de l'angiotensinogène ⁽²²⁰⁾. Ces observations

confèrent un impact indirect au gène de TNF- α dans le maintien de la pression artérielle. Cependant, le locus du gène de TNF- α a été proposé dans certaines études ^(262,263), mais non dans d'autres ^(264,265), comme un élément qui participe au développement de la pathogenèse de l'hypertension artérielle chez les SHR et les rats génétiquement hypertendus de Nouvelle-Zélande.

Dans l'étude présentée dans cette thèse, l'effet du locus du gène de TNF- α sur l'obésité et l'obésité associée à l'hypertension est plus significatif chez les individus obèses ayant un BMI plus petit que 35 kg/m². De ce fait, l'obésité morbide serait causée ou sous contrôle de facteurs géniques autres que le gène de TNF- α . Cette dernière affirmation est totalement en accord avec le rôle proposé du gène de TNF- α dans l'obésité. L'augmentation de l'expression et de l'activité du gène de TNF- α causée par l'accroissement de la masse adipeuse a pour effet, dans un sens, de contribuer au développement de l'hypertension et dans l'autre, de limiter le développement de l'obésité ⁽¹⁹⁷⁾. Étant donné que le TNF- α stimule la lipolyse et diminue l'activité de la LPL, la progression de la masse adipeuse en est grandement restreinte.

Il est bien connu que la distribution de la masse adipeuse diffère entre les hommes et les femmes. Les hommes accumulent le gras dans la cavité abdominale alors que les femmes sont prédisposées à accumuler le gras au niveau des régions fémorales et fessières. La différence de la distribution de la masse adipeuse entre les deux sexes est observée autant chez les non obèses que chez les obèses plus sévères. Il est non moins reconnu que l'accumulation de masse adipeuse intra-abdominale, retrouvée généralement chez les hommes, est associée aux complications métaboliques et cardiovasculaires liées à l'obésité. Cette association est observée également dans les formes modérées d'obésité de type androïde ^(266,267,268). Par contre, la distribution de masse adipeuse de type gynoïde,

observée chez les femmes, est moins associée aux complications reliées à l'obésité^(266,267,268). L'obésité gynoïde devient dangereuse seulement dans les cas d'obésité très sévère. Les mécanismes responsables de cette différence dans la distribution de masse adipeuse entre l'homme et la femme ne sont que très partiellement élucidés.

Les études de liaison génétique effectuées seulement sur les hommes et les femmes, de façon séparés, indiquent clairement que le locus du gène de TNF- α influence la distribution de la masse adipeuse. En effet, la liaison génétique du locus du gène de TNF- α est plus significative chez les hommes au niveau de la région abdominale alors que chez la femme, c'est plutôt la région fémorale qui est significative. Cette spécificité du gène de TNF- α relié au sexe peut être le résultat d'une expression différentielle de celui-ci entre les deux sexes, ou d'un ou plusieurs autres éléments impliqués dans la cascade d'événements. Plus de 95 % du volume de la cellule adipeuse est constitué de triacylglycérols. La LPL est une actrice de premier plan dans l'augmentation du volume des adipocytes puisqu'elle est impliquée dans la formation des triacylglycérols. De plus, la LPL est présentement le seul élément de la cascade de TNF- α qui est connue pour avoir un effet régional spécifique en fonction du sexe⁽²⁶⁹⁾. Arner *et coll.*⁽²⁶⁹⁾ ont démontré que les taux d'ARNm ainsi que l'activité même de la LPL étaient plus élevés dans la région abdominale que dans la région fémorale chez l'homme et vice versa chez la femme. Cette différence d'expression et d'activité pour la LPL entre l'homme et la femme permet de faire un lien évident avec les résultats obtenus dans notre étude. Effectivement, nos résultats suggèrent que la LPL est impliquée dans l'effet régional des liaisons génétiques du gène de TNF- α , puisqu'il est connu qu'une proportion significative de l'effet anti-adipogénique de TNF- α est catalysée par l'inhibition de la LPL⁽²⁷⁰⁾. L'hypothèse proposée est que la défaillance de l'effet anti-adipogénique de TNF- α qui est retrouvé chez les obèses pourrait avoir un impact direct sur la levée de l'inhibition de la LPL. Ces événements auraient comme conséquence de produire un accroissement de la masse adipeuse dans les régions où la LPL est

surexprimée, se traduisant par une augmentation de la masse adipeuse au niveau abdominal chez l'homme et au niveau fémoral chez la femme.

En conclusion, les résultats des études de liaison et d'association suggèrent que le locus du gène de TNF- α contribue au développement de la pathogenèse de l'obésité et de l'obésité associée à l'hypertension chez des familles hypertendues d'origine canadienne-française. De plus, les résultats indiquent également que le locus influence grandement la distribution de masse adipeuse de façon distincte entre les hommes et les femmes.

Implication du locus du gène de la leptine dans le développement de l'obésité et de l'hypertension

Les résultats de liaison et d'association obtenus dans cette étude suggèrent que le locus du gène de la leptine est impliqué dans la pathogenèse de l'obésité et de l'hypertension. Cependant, ces résultats ne fournissent pas d'évidence directe sur l'implication du gène de la leptine puisqu'aucune étude d'évaluation des niveaux d'expression de l'ARNm ou de séquençage du gène de la leptine n'a été effectuée par notre groupe pour tenter d'incriminer directement le gène de la leptine. Par contre, ce gène représente le meilleur candidat possible dans cette région chromosomique.

L'impact du locus du gène de la leptine sur l'obésité humaine a déjà été discuté dans plusieurs études. Dans certaines études, le gène de la leptine a été lié à une obésité sévère. Cependant, seulement deux études rapportent des mutations dans le gène de la leptine qui inactivent ce dernier et provoquent une augmentation de la prise alimentaire ainsi qu'une hyperphagie. Une injection chronique de leptine pour ces patients diminue la prise alimentaire et engendre une perte de poids significative⁽²⁷¹⁾. Néanmoins, il est clair que ces cas de déficience en leptine causés par une mutation inactivant le gène, sont extrêmement rares chez l'humain. Dans la majorité des études génétiques sur l'obésité humaine, aucune mutation dans la région codante du gène de la leptine n'est identifiée^(272,273).

Les résultats de notre étude démontrent que le locus du gène de la leptine a un impact significatif sur le degré d'adiposité ainsi que sur la distribution de celui-ci. Ces faits sont appuyés par les liaisons significatives obtenues sur les mesures globales de l'obésité ainsi que par des liaisons significatives des circonférences de la taille et des hanches. Les fondements moléculaires de cette liaison ne sont pas connus, mais il est possible que cela soit relié à certaines différences au niveau de l'expression de l'ARNm du gène de la leptine. Notre étude démontre également une association significative entre le locus du gène de la leptine et la circonférence de la taille ($\chi^2=10.9$, 2df, $p=0.004$) qui suggère que ce dernier soit associé à l'accumulation de masse adipeuse au niveau de la région de l'abdomen.

La mesure de la circonférence de la taille est reconnue comme étant une façon convenable de mesurer le gras abdominal et plus particulièrement le gras intra-abdominal^(274,275). Le gras intra-abdominal, beaucoup plus actif du point de vue métabolique, est associé au développement d'une dyslipidémie et d'une hyperinsulinémie : voilà pourquoi il est reconnu comme étant un facteur de risque important des MCV. De plus, les tissus adipeux viscéraux sont reconnus comme étant plus volumineux et insulino-résistants, alors

que les tissus adipeux sous-cutanés sont de plus petite taille et sensibles à l'insuline. Lorsque l'on compare les taux d'ARNm de la leptine entre les adipocytes sous-cutanés et intra-abdominaux, ceux-ci sont deux fois plus élevés dans les adipocytes sous-cutanés ⁽²⁷⁶⁾. Cette différence d'expression se retrouve autant chez les individus minces que chez les obèses ⁽¹¹⁷⁾. L'expression de la leptine est régulée en partie par l'insuline, ce qui permet d'expliquer la différence des taux d'expression d'ARNm entre les adipocytes intra-abdominaux et sous-cutanés. Cette relation entre l'insuline et les taux d'expression de la leptine peut être une explication aux liaisons significatives que l'on observe sur les circonférences de la taille et des hanches. Comme la leptine est moins exprimée au niveau abdominal, compte tenu de l'effet de la résistance à l'insuline sur ces adipocytes, la leptine ne peut limiter la progression de l'accumulation de masse adipeuse au niveau viscéral.

L'obésité est maintenant considérée comme un facteur de risque important de morbidité et de mortalité cardiovasculaire surtout lorsque celle-ci est de type viscéral ⁽²⁷⁷⁾. Une accumulation excessive de tissu adipeux, dans cette région, est associée à une altération profonde du système cardiovasculaire comme l'augmentation du volume sanguin, du rythme cardiaque, du CO, de la masse cardiaque ainsi que de la pression sanguine systémique ^(278,279). Bien que la pathophysiologie de l'obésité associée à l'hypertension soit le sujet de nombreuses études depuis plus de deux décennies, les fondements moléculaires de cette relation entre l'augmentation de la masse adipeuse et l'augmentation de la pression artérielle demeurent peu connus.

Maintenant, non seulement le degré mais la distribution de cette accumulation de masse adipeuse sont reconnus comme étant des facteurs de risque importants dans le développement de l'hypertension artérielle ⁽²⁸⁰⁾. Il est connu depuis longtemps que la

prévalence de l'hypertension artérielle est plus élevée chez les individus qui souffrent d'obésité viscérale^(281,282,283).

Plusieurs études ont été menées dans le but de révéler l'implication de la leptine dans le contrôle de la pression artérielle chez les rongeurs. La comparaison de la pression artérielle entre les souris obèses (ob/ob) déficientes en leptine et les souris sauvages a été évaluée⁽²⁸⁴⁾. Malgré le fait que le poids corporel des souris ob/ob soit deux fois plus élevé que celui des souris témoins (de type sauvage), les souris ob/ob ont une pression artérielle moins élevée⁽²⁸⁴⁾. Il a été rapporté par le groupe de Aizawa-Abe *et coll.* que l'administration de leptine aux souris ob/ob augmentait la pression systolique de 25 mmHg en dépit de la diminution de la prise alimentaire et de la réduction du poids corporel de celles-ci⁽²⁸⁵⁾. Ces études confirment que la leptine contribue physiologiquement à la régulation de la pression artérielle chez les rongeurs.

Dans notre étude génétique concernant le gène de la leptine, nous avons démontré que le locus du gène était lié au degré d'adiposité ainsi qu'à l'accumulation de masse adipeuse au niveau du haut du corps dans une population hypertendue d'origine canadienne-française. Il est donc suggéré que la leptine pourrait être impliquée dans le développement de la pathophysiologie de l'obésité associée à l'hypertension. De plus, notre étude confirme que le locus du gène de la leptine est impliqué dans le développement de l'obésité et de l'hypertension, puisqu'une liaison significative entre le locus de la leptine et la pression diastolique ($p=0,005$ $T=-2,7177$) et systolique ($p=0,02$, $T=-2,1230$) est observée dans notre population. D'ailleurs, suite à plusieurs évidences, notre groupe a démontré que le développement de l'obésité et de l'hypertension pouvait être génétiquement lié⁽²⁸³⁾. Il est probable que le gène de la leptine soit en partie responsable

du développement de l'hypertension ainsi que de l'obésité dans notre population du SLSJ, puisque la leptine a un effet physiologique connu sur le contrôle de la pression artérielle.

Notre équipe a également démontré, dans cette population que les germains hypertendus étaient plus obèses que les germains normotendus pour une même famille, et que la masse adipeuse des germains hypertendus était majoritairement de type viscéral ⁽²⁸³⁾.

Le concept de résistance sélective à la leptine

Il a été décrit que la concentration de la leptine plasmatique corrélait avec le degré d'adiposité des individus et était significativement plus élevée chez les sujets obèses ^(177,117). Ces affirmations suggèrent que l'obésité humaine est généralement associée à une insensibilité à la leptine.

Ces observations proposent que l'augmentation de la pression artérielle observée chez les sujets obèses soit associée en partie à l'activité sympathique causée par une hyperleptinémie. Cependant, ces spéculations soulèvent un paradoxe. Comment peut-on supposer que l'augmentation de la pression artérielle chez les patients obèses soit causée par une hyperleptinémie alors qu'ils sont résistants à l'effet de cette dernière? Pour tenter d'expliquer ce phénomène, il faut se tourner vers les nombreuses études effectuées sur les souris de type agouti. Les souris obèses agoutis possèdent une mutation dans le gène agouti qui provoque l'expression ubiquitaire de la protéine du même nom. La protéine

agouti bloque le récepteur de la mélanocortine au niveau de l'hypothalamus pour promouvoir le développement de l'obésité ⁽¹⁵⁹⁾. Les souris agoutis sont résistantes au phénomène de satiété et à l'action antiadipogénique provoqués par la leptine ⁽²⁸⁶⁾, alors qu'elles n'ont aucune mutation dans le gène de la leptine. De plus, elles ont une pression artérielle plus élevée que les souris de type sauvage ⁽²⁸⁴⁾. Ces souris ont une hyperleptinémie compensatoire ^(285,286), et une étude récente a démontré que l'hyperleptinémie contribue à l'élévation de la pression artérielle ⁽²⁸⁵⁾. Dans le but d'expliquer ces affirmations, le concept de résistance sélective à la leptine a été imaginé. Ce concept a pour hypothèse que, chez les souris agoutis, l'action sympathique de la leptine est préservée en dépit du phénomène de satiété et de son action antiadipogénique. Dans l'objectif de vérifier cette hypothèse, Correia *et coll.* ⁽²⁸⁷⁾ ont comparé chez les souris agoutis obèses versus les témoins de type sauvage, l'effet de la leptine sur la prise alimentaire, le poids corporel ainsi que sur l'activité sympathique. Les résultats de cette étude démontrent que, la diminution de la prise alimentaire ainsi que la diminution du poids corporel induites par l'administration de leptine, étaient beaucoup plus faibles chez les souris agoutis que chez les souris sauvages. Cependant, l'augmentation de l'activité sympathique provoquée par l'administration de la leptine ne diffère pas de façon significative entre les souris agoutis obèses et les souris de type sauvage. Cette observation suggère que chez les souris agoutis obèses, le phénomène de résistance sélective à la leptine reflète une altération du « pathway » neuronal central, vraisemblablement en aval du récepteur hypothalamique de la leptine, puisque celui-ci n'est pas muté chez les souris agoutis. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de cette résistance sélective à la leptine demeurent inconnus.

Il y a de cela plusieurs années, quelques équipes de recherche dont celle de Reaven ⁽²⁸⁸⁾ et Landsberg ⁽²⁸⁹⁾ ont proposé le concept de résistance sélective à l'insuline, communément appelé syndrome X. Ce concept a été imaginé dans le but d'expliquer

l'association de la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, la dyslipidémie et l'hypertension. Les patients, qui souffrent du syndrome X, ont une résistance sélective à l'effet métabolique de l'insuline sur la réabsorption du glucose, alors que l'action d'excitation sympathique causée par l'insuline est préservée. Il est spéculé que le concept de résistance sélective à la leptine puisse avoir une implication similaire dans la compréhension de la pathophysiologie de l'hypertension chez des sujets obèses, et peut représenter une autre composante du syndrome métabolique. L'obésité est souvent associée à l'hypertension ⁽²⁹⁰⁾ de même qu'à une augmentation de l'activité sympathique ^(291,292,293). Si la résistance à la leptine est sélective autant chez l'humain obèse que chez les souris agoutis, alors la leptine pourrait contribuer à l'augmentation de l'activité sympathique ainsi qu'à l'augmentation de la pression artérielle. Le tout en dépit de la résistance partielle observée sur son action antiadipogénique ainsi que sur le mécanisme de contrôle de la satiété. Cependant, cette possibilité est purement spéculative et elle nécessite de nombreuses études comparatives (obèses vs minces) sur l'action sympathique et métabolique de la leptine.

En résumé, les résultats de la présente étude démontrent que le locus du gène de la leptine a un impact significatif sur le degré et sur la distribution de la masse adipeuse. De plus, ils suggèrent que le locus est impliqué dans la pathogenèse de l'obésité abdominale qui est un facteur de risque important dans le développement des maladies cardiovasculaires. En conclusion, les résultats des études de liaison et d'association effectuées sur des familles hypertendues d'origine canadienne-française démontrent que le locus du gène de la leptine contribue au développement de l'obésité et de l'hypertension artérielle.

Les avantages évolutifs responsables des maladies modernes

L'importance de l'environnement dans le développement de l'hypertension essentielle est largement reconnue. Mais pourquoi en est-il ainsi? La réponse à cette question réside dans l'évolution de la société moderne. Il a été prouvé que le génome humain a subi d'infimes modifications depuis l'apparition de l'*Homo sapiens*, il y a de cela plus de 35 000 ans⁽²⁹⁴⁾. Par contre, la civilisation s'est transformée de façon radicale entre l'époque préagriculture où il fallait chasser pour se nourrir jusqu'à notre société moderne. Le mode de vie de l'homme à l'époque préagriculture était basé presque exclusivement sur la recherche de nourriture pour survivre. Ce mode de vie active nécessitait une diète qui était très riche en protéines et en potassium, et plutôt faible en gras et en sel. La disponibilité irrégulière de la nourriture faisait en sorte qu'il fallait souvent résister plusieurs jours sans manger. Les mécanismes métaboliques dictés par le génome humain ont évolué dans le but d'accommoder ce type de besoins. Or, aujourd'hui, le mode de vie de l'homme moderne est très différent que celui d'il y a 10 000 ans. Ce mode de vie implique une baisse de l'activité physique et une augmentation de la consommation de nourriture (plus grasse et plus salée). Il est probable que les mécanismes qui étaient souvent nécessaires à la survie de l'espèce il y a plusieurs milliers d'années, soient aujourd'hui responsables de plusieurs maladies chroniques modernes telles que l'hypertension artérielle et l'obésité.

Perspective sur la pharmacogénétique et la bioinformatique

Les études génétiques sont nécessaires à l'avancement du traitement de l'hypertension artérielle. Tel que mentionné dans l'introduction de cette thèse, un faible pourcentage des gens hypertendus est contrôlé de façon efficace (16%). Certainement un des plus grands bénéfices découlant d'études génétiques sur l'hypertension sera l'avènement de la pharmacogénétique, soit l'identification des gènes qui prédisent la réponse d'un individu à une médication antihypertensive donnée. De nombreux espoirs sont fondés sur l'application de la pharmacogénétique pour obtenir un meilleur contrôle et un meilleur traitement de l'hypertension artérielle. Présentement, la conception de la plupart des agents antihypertenseurs est basée sur le ciblage d'une composante physiologique spécifique impliquée dans la régulation de la pression artérielle. Cependant, ces médicaments ont rencontré un succès mitigé lorsqu'ils sont administrés chez les patients hypertendus. La plage d'efficacité des agents antihypertenseurs semble être influencée par les différences génétiques que l'on retrouve dans les populations ainsi qu'au niveau de l'individu même ⁽²⁹⁵⁾. Par exemple, les sujets hypertendus de race blanche démontrent une meilleure réponse que les sujets de race noire aux inhibiteurs d'ACE et aux bêta bloqueurs, suggérant que le « background » génétique racial soit important dans l'efficacité de ces médicaments ^(295,296). Les études de pharmacogénétique sont une perspective d'avenir intéressante. Les résultats découlant de ce type d'étude qui participent à la mise en place d'un traitement plus personnalisé, contribueraient de cette façon à augmenter grandement le pourcentage de patients hypertendus contrôlés. Les études génétiques de population auront une place de choix dans la mise au point de même que dans la mise en marché des nouveaux agents pharmacologiques. Il est présentement possible de réaliser des études génétiques pour cibler les effets secondaires de nouveaux agents pharmacologiques ainsi que de cibler leur efficacité sur des populations.

La bioinformatique est une nouvelle science qui associe l'informatique à la recherche biomédicale. La bioinformatique est devenue un élément critique dans la recherche en science de la vie. Elle impose le recours à l'ordinateur pour récupérer, traiter et analyser des données biologiques principalement d'ordre génétique. Elle a pour mission l'utilisation de la technologie de l'information dans le but d'augmenter la productivité de la recherche biomédicale. Avec la venue des techniques de génomique à haut débit de production, nous observons une accélération fulgurante de la production de données de toutes sortes. Il est présentement estimé que le volume des bases de données génétiques double tous les six à huit mois. Seulement au niveau de la gestion de données, la bioinformatique est utilisée dans la découverte d'agents pharmacologiques, les diagnostics cliniques, la pharmacogénomique ainsi que pour d'autres applications. Il existe trois grandes catégories d'application bioinformatique qui participent à la progression fulgurante des sciences de la vie : 1) le développement des outils informatiques qui supportent les expérimentations en laboratoire; 2) l'intégration, le « design » et l'implantation de bases de données à caractère génétique et biologique; 3) le développement de différents outils analytiques qui permettent des analyses diverses telles que des structures 3D de différentes protéines, des analyses de fonctions de protéines, la détection de similarité entre gènes, la localisation chromosomique et bien d'autres. Ces analyses permettent une accélération significative dans l'identification des cibles thérapeutiques, dans la validation et l'optimisation des molécules thérapeutiques ainsi que dans les études de pharmacogénomique.

L'application des études de pharmacogénomique ouvrira la porte à la médecine moléculaire qui offrira un traitement individualisé et une prévention sur mesure des complications cardiovasculaires. La médecine du 21^{ème} siècle sera une médecine

moléculaire personnalisée guidée par la génétique, la pharmacogénomique, la biologie moléculaire et propulsée par la fulgurante ascension de la bioinformatique.

Conclusion

En conclusion, nous avons démontré dans cette thèse que : (1) les sites de glycosylation du récepteur AT_1 ne sont pas tous équivalents, et qu'ils sont en partie nécessaires à l'expression du récepteur; (2) le locus du gène du récepteur AT_1 joue un rôle important au sein de la population du SLSJ, dans le contrôle de la pression artérielle, l'hypertrophie cardiaque ainsi que dans la contractilité myocardique; (3) les locus du gène de la leptine et de $TNF-\alpha$ contribuent au développement de l'obésité et de l'hypertension chez des familles hypertendues d'origine canadienne-française.

Maintenant avec la venue des nouvelles techniques génétiques de haut débit et de la bioinformatique, la communauté scientifique a espoir dans les années à venir de pouvoir résoudre et élucider la plupart des problèmes reliés aux composantes génétiques de l'hypertension. Cependant, les facteurs environnementaux sont importants non seulement pour leur influence sociale et épidémiologique, mais également comme contributeur majeur à la modification de l'influence génétique. Il est important de garder en tête que l'hypertension résulte de plusieurs interactions entre les facteurs génétiques et environnementaux qui doivent être étudiés simultanément. La tâche des méthodes génétiques modernes est de rapporter les locus génétiques avec précision et de bien en définir les propriétés physiologiques. Donc, les connaissances physiologiques et pathophysiologiques ainsi que les applications qui s'y greffent, sont d'une importance particulière pour pouvoir comprendre et disséquer les maladies génétiques complexes telles que l'hypertension artérielle.

Bibliographie

1. Wielgosz, A., Arango, M., Johansen, H, Mao, Y., Nair, C., Paradis, G., Phillips, S., Trevisanato, S., Tu, J., Turner, L., Wilson, E., Bonita, R., McManus, B., Mendis, S., Mensah, G., Reddy, S., Svenson, L., Yusuf, S., Le fardeau croissant des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada, 2003. 2003;1-79.
2. Potvin, L., Richard, L., Edwards, A. C., Knowledge of cardiovascular disease risk factors among the Canadian population: relationships with indicators of socioeconomic status. *CMAJ*. 2000;162(9 Suppl):S5-11.
3. Joffres, M. R., Ghadirian, P., Fodor, J. G., Petrasovits, A., Chockalingam, A., Hamet, P., Awareness, treatment, and control of hypertension in Canada. *Am.J.Hypertens*. 1997;10(10 Pt 1):1097-1102.
4. Varon, J. Marik, P. E., Clinical review: the management of hypertensive crises. *Crit Care* 2003;7(5):374-384.
5. MacMahon, S., Peto, R., Cutler, J., Collins, R., Sorlie, P., Neaton, J., Abbott, R., Godwin, J., Dyer, A., Stamler, J., Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990;335(8692):765-774.
6. Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Hebert, P., Fiebach, N. H., Eberlein, K. A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J. O., Hennekens, C. H., Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990;335(8693):827-838.

7. Sytkowski, P. A., D'Agostino, R. B., Belanger, A. J., Kannel, W. B., Secular trends in long-term sustained hypertension, long-term treatment, and cardiovascular mortality. The Framingham Heart Study 1950 to 1990. *Circulation* 1996;93(4):697-703.
8. Joffres, M. R., Hamet, P., MacLean, D. R., L'italien, G. J., Fodor, G., Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am.J.Hypertens.* 2001;14(11 Pt 1):1099-1105.
9. Kirkland, S. A., MacLean, D. R., Langille, D. B., Joffres, M. R., MacPherson, K. M., Andreou, P., Knowledge and awareness of risk factors for cardiovascular disease among Canadians 55 to 74 years of age: results from the Canadian Heart Health Surveys, 1986-1992. *CMAJ.* 1999;161(8 Suppl):S10-S16.
10. Kannel, W. B., Prevalence and implications of uncontrolled systolic hypertension. *Drugs Aging* 2003;20(4):277-286.
11. Flack, J. M., Casciano, R., Casciano, J., Doyle, J., Arikian, S., Tang, S., Arocho, R., Cardiovascular disease costs associated with uncontrolled hypertension. *Manag.Care Interface* 2002;15(11):28-36.
12. Hamet, P., A la recherche des genes de l'hypertension arterielle. *communication-ACFAS* 1995;(septembre 1995):37-47.
13. Staessen, J. A., Wang, J., Bianchi, G., Birkenhager, W. H., Essential hypertension. *Lancet* 2003;361(9369):1629-1641.
14. Lifton, R. P., Gharavi, A. G., Geller, D. S., Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001;104(4):545-556.

15. Basso, N. Terragno, N. A., History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2001;38(6):1246-1249.
16. Phillips, M. I. Schmidt-Ott, K. M., The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci.* 1999;14:271-274.
17. SKEGGS, L. T., Jr., KAHN, J. R., SHUMWAY, N. P., The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J.Exp.Med.* 1956;103(3):295-299.
18. Genest, J., Progress in hypertension research: 1900-2000. *Hypertension* 2001;38(4):E13-E18.
19. SIMPSON, S. A., TAIT, J. F., WETTSTEIN, A., NEHER, R., VON EUW, J., SCHINDLER, O., REICHSTEIN, T., [Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid.]. *Experientia* 1954;10(3):132-133.
20. Genest, J., Mechanisms regulating the secretion and metabolism of aldosterone in experimental secondary hyperaldosteronism. *Recent.Prog.Horm.Res.* 1961;17:293-293.
21. Genest, J., Koïw, E., Kuchel, O., hypertension: physiopathology and treatment. 1977;1st:260-265.
22. Dostal, D. E. Baker, K. M., The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ.Res.* 1999;85(7):643-650.
23. Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O., Coffman, T. M., Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92(8):3521-3525.

24. Krege, J. H., John, S. W., Langenbach, L. L., Hodgin, J. B., Hagan, J. R., Bachman, E. S., Jennette, J. C., O'Brien, D. A., Smithies, O., Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995;375(6527):146-148.
25. Zaman, M. A., Oparil, S., Calhoun, D. A., Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2002;1(8):621-636.
26. Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., Taugner, R., Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990;70(4):1067-1116.
27. Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y., Ishida, J., Takimoto, E., Yagami, K., Fukamizu, A., Murakami, K., Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J.Biol.Chem.* 1994;269(50):31334-31337.
28. Sealey, J. E. Laragh J. H., The renin angiotensin aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis in hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 1990;1287-1317.
29. Phillips, R. A. Diamond, J. A., left ventricular hypertrophy, congestive heart failure, and coronary flow reserve abnormalities in hypertension. 1996;(27):244-277.
30. Black, M. J., Kanellakis, P., Bobik, A., Role of angiotensin II in early cardiovascular growth and vascular amplifier development in spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* 1997;15(9):945-954.
31. Bernstein, K. E. Berk, B. C., The biology of angiotensin II receptors. *Am.J.Kidney Dis.* 1993;22(5):745-754.

32. Turner, A. J., Hooper, N. M., The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.* 2002;23(4):177-183.
33. DiBona, G. F., Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000;36(6):1083-1088.
34. Saavedra, J. M., Brain and pituitary angiotensin. *Endocr.Rev.* 1992;13(2):329-380.
35. Krakoff, L. R., Elijovich, F., Barry, C., The role of vasopressin in experimental and clinical hypertension. *Am J.Kidney Dis.* 1985;5(4):A40-A47.
36. Chiu, A. T., Herblin, W. F., McCall, D. E., Ardecky, R. J., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wong, P. C., Wexler, R. R., Johnson, A. L., ., Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1989;165(1):196-203.
37. Zemel, S., Millan, M. A., Feuillan, P., Aguilera, G., Characterization and distribution of angiotensin-II receptors in the primate fetus. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1990;71(4):1003-1007.
38. Hamet, P., deBlois, D., Endothelial and myocyte apoptosis--role of angiotensin II. *Can.J.Cardiol.* 2001;17 Suppl A:26A-28A.
39. Guyton, A. C., Arterial pressure regulation: 1. rapid pressure control. 1986;septième édition(21):244-256.
40. Brenner, B. M., Ballermann, B. J., Gunning, M. E., Zeidel, M. L., Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev.* 1990;70(3):665-699.

41. Cargill, R. I., Coutie, W. J., Lipworth, B. J., The effects of angiotensin II on circulating levels of natriuretic peptides. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1994;38(2):139-142.
42. Tremblay, J., Desjardins, R., Hum, D., Gutkowska, J., Hamet, P., Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol.Cell Biochem.* 2002;230(1-2):31-47.
43. Regitz-Zagrosek, V., Neuss, M., Holzmeister, J., Warnecke, C., Fleck, E., Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J.Mol.Med.* 1996;74(5):233-251.
44. Focaccio, A., Volpe, M., Ambrosio, G., Lembo, G., Pannain, S., Rubattu, S., Enea, I., Pignalosa, S., Chiariello, M., Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts. *Circulation* 1993;87(1):192-198.
45. Cusson, J. R., Tremblay, J., Larochelle, P., Schiffrin, E. L., Gutkowska, J., Hamet, P., Clinical relationships of cyclic GMP. *Adv.Pharmacol.* 1994;26:305-319.
46. Fujio, N., Gossard, F., Bayard, F., Tremblay, J., Regulation of natriuretic peptide receptor A and B expression by transforming growth factor-beta 1 in cultured aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 1994;23(6 Pt 2):908-913.
47. Tremblay, J., Huot, C., Willenbrock, R. C., Bayard, F., Gossard, F., Fujio, N., Koch, C., Kuchel, O., Debinski, W., Hamet, P., Increased cyclic guanosine monophosphate production and overexpression of atrial natriuretic peptide A-receptor mRNA in spontaneously hypertensive rats. *J.Clin.Invest* 1993;92(5):2499-2508.

48. Tremblay, J., Hum, D. H., Sanchez, R., Dumas, P., Pravenec, M., Krenova, D., Kren, V., Kunes, J., Pausova, Z., Gossard, F., Hamet, P., TA repeat variation, Npr1 expression, and blood pressure: impact of the Ace locus. *Hypertension* 2003;41(1):16-24.
49. Wei, C. C., Tian, B., Perry, G., Meng, Q. C., Chen, Y. F., Oparil, S., Dell'Italia, L. J., Differential ANG II generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of the ACE gene. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002;282(6):H2254-H2258.
50. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., Acton, S., A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ.Res.* 2000;87(5):E1-E9.
51. Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A. J., A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.* 2000;275(43):33238-33243.
52. Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., Tummino, P., Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.* 2002;277(17):14838-14843.
53. Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S. E., Oliveira-dos-Santos, A. J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y., Penninger, J. M.,

- Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417(6891):822-828.
54. Brosnihan, K. B., Li, P., Tallant, E. A., Ferrario, C. M., Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biol.Res.* 1998;31(3):227-234.
 55. Jackman, H. L., Massad, M. G., Sekosan, M., Tan, F., Brovkovich, V., Marcic, B. M., Erdos, E. G., Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. *Hypertension* 2002;39(5):976-981.
 56. Ren, Y., Garvin, J. L., Carretero, O. A., Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* 2002;39(3):799-802.
 57. Schunkert, H., Ingelfinger, J. R., Hirsch, A. T., Pinto, Y., Remme, W. J., Jacob, H., Dzau, V. J., Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II. *Circ.Res.* 1993;72(2):312-318.
 58. Sugaya, T., Nishimatsu, S., Tanimoto, K., Takimoto, E., Yamagishi, T., Imamura, K., Goto, S., Imaizumi, K., Hisada, Y., Otsuka, A., ., Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J.Biol.Chem.* 1995;270(32):18719-18722.
 59. Uwabo, J., Labuda, M., Sun, Y., Pausova, Z., Gaudet, D., Gossard, F., Tremblay, J., Kotchen, T., Hamet, P., The ACE2-gene locus is associated with the late-onset hypertension. *J.Hypertens.Suppl.* 2003;21(suppl.4):s218-s218.
 60. Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E., Dzau, V. J., Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J.Biol.Chem.* 1993;268(33):24539-24542.

61. Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., Inagami, T., Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J.Biol.Chem.* 1993;268(33):24543-24546.
62. Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S., Bernstein, K. E., Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991;351(6323):233-236.
63. Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y., Inagami, T., Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991;351(6323):230-233.
64. Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y., Inagami, T., Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991;351(6323):230-233.
65. Marie, J., Maigret, B., Joseph, M. P., Larguier, R., Nouet, S., Lombard, C., Bonnafous, J. C., Tyr292 in the seventh transmembrane domain of the AT1A angiotensin II receptor is essential for its coupling to phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269(33):20815-20818.
66. Joseph, M. P., Maigret, B., Bonnafous, J. C., Marie, J., Scheraga, H. A., A computer modeling postulated mechanism for angiotensin II receptor activation. *Journal of Protein Chemistry* 1995;14(5):381-398.

67. Hunyady, L., Balla, T., Catt, K. J., The ligand binding site of the angiotensin AT1 receptor. *Trends Pharmacol.Sci.* 1996;17(4):135-140.
68. Noda, K., Feng, Y. H., Liu, X. P., Saad, Y., Husain, A., Karnik, S. S., The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry* 1996;35(51):16435-16442.
69. Groblewski, T., Maigret, B., Larguier, R., Lombard, C., Bonnafous, J. C., Marie, J., Mutation of Asn111 in the third transmembrane domain of the AT1A angiotensin II receptor induces its constitutive activation. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272(3):1822-1826.
70. Inoue, Y., Nakamura, N., Inagami, T., A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of the agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism. *J.Hypertens.* 1997;15(7):703-714.
71. Sandberg, K., Structural analysis and regulation of angiotensin II receptors. Elsevier Science TEM 1994;5(1):28-35.
72. Desarnaud, F., Marie, J., Lombard, C., Larguier, R., Seyer, R., Lorca, T., Jard, S., Bonnafous, J. C., Deglycosylation and fragmentation of purified rat liver angiotensin II receptor: application to the mapping of hormone- binding domains. *Biochemical Journal* 1993;289(Pt 1):289-297.
73. Marie, J., Koch, C., Pruneau, D., Paquet, J. L., Groblewski, T., Larguier, R., Lombard, C., Deslauriers, B., Maigret, B., Bonnafous, J. C., Constitutive activation of the human bradykinin B2 receptor induced by mutations in transmembrane helices III and VI. *Mol.Pharmacol.* 1999;55(1):92-101.

74. Hess, J. F., Borkowski, J. A., Young, G. S., Strader, C. D., Ransom, R. W., Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1992;184(1):260-268.
75. Yamano, Y., Ohyama, K., Chaki, S., Guo, D. F., Inagami, T., Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1992;187(3):1426-1431.
76. Deslauriers, B., Ponce, C., Lombard, C., Larguier, R., Bonnafous, J. C., Marie, J., N-glycosylation requirements for the AT1a angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane. *Biochem.J.* 1999;339 (Pt 2):397-405.
77. Morgagni, J. B., De sedibus et causus morboeum per anatomen indegatis. 1761;(1)
78. Williams, R. R., Hunt, S. C., Hasstedt, S. J., Hopkins, P. N., Wu, L. L., Berry, T. D., Stults, B. M., Barlow, G. K., Schumacher, M. C., Lifton, R. P., ., Are there interactions and relations between genetic and environmental factors predisposing to high blood pressure? *Hypertension* 1991;18(3 Suppl):I29-I37.
79. Hunt, S. C., Williams, R. R., Barlow, G. K., A comparison of positive family history definitions for defining risk of future disease. *J.Chronic.Dis.* 1986;39(10):809-821.
80. Ward, R., Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. 1995;2:67-88.
81. Feinleib, M., Garrison, R. J., Fabsitz, R., Christian, J. C., Hrubec, Z., Borhani, N. O., Kannel, W. B., Rosenman, R., Schwartz, J. T., Wagner, J. O., The NHLBI twin

- study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. *Am.J.Epidemiol.* 1977;106(4):284-285.
82. Biron, P., Mongeau, J. G., Familial aggregation of blood pressure and its components. *Pediatr.Clin.North Am.* 1978;25(1):29-33.
 83. Biron, P., Mongeau, J. G., Bertrand, D., Familial aggregation of blood pressure in 558 adopted children. *Can.Med.Assoc.J.* 1976;115(8):773-774.
 84. Lifton, R. P., Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996;272(5262):676-680.
 85. Hamet, P., Pausova, Z., Adarichev, V., Adaricheva, K., Tremblay, J., Hypertension: genes and environment. *J.Hypertens.* 1998;16(4):397-418.
 86. Sutherland, D. J., Ruse, J. L., Laidlaw, J. C., Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can.Med.Assoc.J.* 1966;95(22):1109-1119.
 87. Salti, I. S., Stiefel, M., Ruse, J. L., Laidlaw, J. C., Non-tumorous "primary" aldosteronism. I. Type relieved by glucocorticoid (glucocorticoid-remediable aldosteronism). *Can.Med.Assoc.J.* 1969;101(1):1-10.
 88. Lifton, R. P., Dluhy, R. G., Powers, M., Rich, G. M., Gutkin, M., Fallo, F., Gill, J. R., Jr., Feld, L., Ganguly, A., Laidlaw, J. C., ., Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat.Genet.* 1992;2(1):66-74.

89. Pascoe, L., Curnow, K. M., Slutsker, L., Connell, J. M., Speiser, P. W., New, M. I., White, P. C., Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89(17):8327-8331.
90. Mune, T., Rogerson, F. M., Nikkila, H., Agarwal, A. K., White, P. C., Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat.Genet.* 1995;10(4):394-399.
91. Shimkets, R. A., Warnock, D. G., Bositis, C. M., Nelson-Williams, C., Hansson, J. H., Schambelan, M., Gill, J. R., Jr., Ulick, S., Milora, R. V., Findling, J. W., .. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994;79(3):407-414.
92. Hansson, J. H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B., Lifton, R. P., Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat.Genet.* 1995;11(1):76-82.
93. Lander, E., Kruglyak, L., Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat.Genet.* 1995;11(3):241-247.
94. Mansfield, T. A., Simon, D. B., Farfel, Z., Bia, M., Tucci, J. R., Lebel, M., Gutkin, M., Vialettes, B., Christofilis, M. A., Kauppinen-Makelin, R., Mayan, H., Risch, N., Lifton, R. P., Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat.Genet.* 1997;16(2):202-205.

95. Wilson, R. C., Krozowski, Z. S., Li, K., Obeyesekere, V. R., Razzaghy-Azar, M., Harbison, M. D., Wei, J. Q., Shackleton, C. H., Funder, J. W., New, M. I., A mutation in the HSD11B2 gene in a family with apparent mineralocorticoid excess. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1995;80(7):2263-2266.
96. Chang, S. S., Grunder, S., Hanukoglu, A., Rosler, A., Mathew, P. M., Hanukoglu, I., Schild, L., Lu, Y., Shimkets, R. A., Nelson-Williams, C., Rossier, B. C., Lifton, R. P., Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat.Genet.* 1996;12(3):248-253.
97. Hamet, P., Environmental stress and genes of hypertension. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 1995;22(12):S394-S398.
98. Hamet, P., Environmentally-regulated genes of hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.* 1996;18(3-4):267-278.
99. Widgren, B. R., Wikstrand, J., Berglund, G., Andersson, O. K., Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. *Hypertension* 1992;20(5):606-611.
100. Dumas, P., Sun, Y., Corbeil, G., Tremblay, S., Pausova, Z., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Hamet, P., Tremblay, J., Mapping of quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J.Hypertens.* 2000;18(5):545-551.
101. Dumas, P., Pausova, Z., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Dumont, M., Ely, D., Turner, M., Sun, Y., Tremblay, J., Hamet, P., Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 2000;35(2):568-573.

102. Hamet, P., Tremblay, J., Genetic determinants of the stress response in cardiovascular disease. *Metabolism* 2002;51(6 Suppl 1):15-24.
103. Pausova, Z., Tremblay, J., Hamet, P., Gene-environment interactions in hypertension. *Current Hypertension reports* 1999;1:42-50.
104. Malo, D., Pang, S. C., Schlager, G., Tremblay, J., Hamet, P., Decrease of blood pressure in spontaneously hypertensive mice by heat treatment. *Am.J.Hypertens.* 1990;3(5 Pt 1):400-404.
105. Hamet, P., Malo, D., Tremblay, J., Increased transcription of a major stress gene in spontaneously hypertensive mice. *Hypertension* 1990;15(6 Pt 2):904-908.
106. Page, L. B., Damon, A., Moellering, R. C., Jr., Antecedents of cardiovascular disease in six Solomon Islands societies. *Circulation* 1974;49(6):1132-1146.
107. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ* 1988;297(6644):319-328.
108. Weinberger, M. H., Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 1996;5(3):205-208.
109. Hamet, P., Mongeau, E., Lambert, J., Bellavance, F., Daignault-Gelinas, M., Ledoux, M., Whissell-Cambiotti, L., Interactions among calcium, sodium, and alcohol intake as determinants of blood pressure. *Hypertension* 1991;17(1 Suppl):I150-I154.

110. Joffres, M. R., Hamet, P., Rabkin, S. W., Gelskey, D., Hogan, K., Fodor, G., Prevalence, control and awareness of high blood pressure among Canadian adults. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *CMAJ*. 1992;146(11):1997-2005.
111. Kannel, W. B., Brand, N., Skinner, J. J., Jr., Dawber, T. R., McNamara, P. M., The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. *Ann.Intern.Med.* 1967;67(1):48-59.
112. Spiegelman, D., Israel, R. G., Bouchard, C., Willett, W. C., Absolute fat mass, percent body fat, and body-fat distribution: which is the real determinant of blood pressure and serum glucose? *Am.J.Clin.Nutr.* 1992;55(6):1033-1044.
113. Correia, M. L., Morgan, D. A., Sivitz, W. I., Mark, A. L., Haynes, W. G., Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension* 2001;37(3):936-942.
114. Ogawa, Y., Masuzaki, H., Aizawa, M, Yura, S, Satoh, N, Iwai, H, Hosada, K, Nakao, K, Blood pressure elevation in transgenic mice over-expressing leptin, the obese gene product. *J.Hypertens.* 1998;16(s7)
115. Shek, E. W., Brands, M. W., Hall, J. E., Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* 1998;31(1 Pt 2):409-414.
116. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372(6505):425-432.
117. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., , Leptin levels in human and rodent:

- measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat.Med.* 1995;1(11):1155-1161.
118. Pausova, Z., Deslauriers, B., Gaudet, D., Tremblay, J., Kotchen, T. A., Larochelle, P., Cowley, A. W., Hamet, P., Role of tumor necrosis factor-alpha gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 2000;36(1):14-19.
 119. Pausova, Z., Sedova, L., Berube, J., Hamet, P., Tremblay, J., Dumont, M., Gaudet, D., Pravenec, M., Kren, V., Kunes, J., Segment of rat chromosome 20 regulates diet-induced augmentations in adiposity, glucose intolerance, and blood pressure. *Hypertension* 2003;41(5):1047-1055.
 120. Ghosh, S., Collins, F. S., The geneticist's approach to complex disease. *Annu.Rev.Med.* 1996;47:333-353.
 121. Lander, E. S., Schork, N. J., Genetic dissection of complex traits [published erratum appears in *Science* 1994 Oct 21;266(5184):353]. [Review] [149 refs]. *Science* 1994;265(5181):2037-2048.
 122. Marnellos, G., High-throughput SNP analysis for genetic association studies. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* 2003;6(3):317-321.
 123. MacGregor, J. T., SNPs and chips: genomic data in safety evaluation and risk assessment. *Toxicol.Sci.* 2003;73(2):207-208.
 124. Mooser, V., Waterworth, D. M., Isenhour, T., Middleton, L., Cardiovascular pharmacogenetics in the SNP era. *J.Thromb.Haemost.* 2003;1(7):1398-1402.

125. Kunz, R., Kreutz, R., Beige, J., Distler, A., Sharma, A. M., Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997;30(6):1331-1337.
126. Rapp, J. P., Wang, S. M., Dene, H., Effect of genetic background on cosegregation of renin alleles and blood pressure in Dahl rats. *Am.J.Hypertens.* 1990;3(5 Pt 1):391-396.
127. Rapp, J. P., Wang, S. M., Dene, H., A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregates with blood pressure. *Science* 1989;243(4890):542-544.
128. Bianchi, G., Tripodi, G., Casari, G., Salardi, S., Barber, B. R., Garcia, R., Leoni, P., Torielli, L., Cusi, D., Ferrandi, M., ., Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91(9):3999-4003.
129. Bouchard, G., Nouvelles perspectives pour les recherches génétiques, le fichier-réseau de la population du Saguenay. *Annales de démographie historique* 1984;81-87.
130. Pouyez, C, Lavoie, Y, Bouchard, G., Roy, R, Les Saguenayens. Introduction à l'histoire des populations du Saguenay, XVI-XX siècle. 1983;
131. Bouchard, G., Laberge, C, Scriver, C, Reproduction démographique et transmission génétique dans le nord-est de la province du Québec (18ième-20ième siècle). *European Journal of Population* 1988;4:39-67.
132. Bouchard, G.De Braekeleer, M., Histoire d'un génome. 1991;Presses de l'Université du Québec

133. Mayr, E, Populations,espèces et évolution (traduit de l'anglais). 1974;Hermann:1-496.
134. Gauvreau, DBourque, M, Mouvements migratoires et familles:le peuplement du Saguenay avant 1911. Revue d'histoire de l'Amérique française 1988;42(2):167-192.
135. Dracopoli, N. C., Haines, L. H., Korf, B. R., Moir, D. T., Morton, C. C., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Smith, D. R., Overview of linkage analysis in complex traits. 1996;(1):1.9.1-1.9.19.
136. Bonnardeaux, A., Davies, E., Jeunemaitre, X., Fery, I., Charru, A., Clauser, E., Tiret, L., Cambien, F., Corvol, P., Soubrier, F., Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. Hypertension 1994;24(1):63-69.
137. Wang, W. Y., Zee, R. Y., Morris, B. J., Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. Clin.Genet. 1997;51(1):31-34.
138. Szombathy, T., Szalai, C., Katalin, B., Palicz, T., Romics, L., Cszasz, A., Association of angiotensin II type 1 receptor polymorphism with resistant essential hypertension. Clin.Chim.Acta 1998;269(1):91-100.
139. Kainulainen, K., Perola, M., Terwilliger, J., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Syvanen, A. C., Vartiainen, E., Peltonen, L., Kontula, K., Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. Hypertension 1999;33(3):844-849.

140. Fan, H., Li, S., Gu, W., Li, Y., Ma, H., Luo, J., Wang, W., Lu, X., [Association between angiotensin II type I receptor gene and human essential hypertension]. *Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi*. 1998;15(2):101-103.
141. Tiret, L., Blanc, H., Ruidavets, J. B., Arveiler, D., Luc, G., Jeunemaitre, X., Tichet, J., Mallet, C., Poirier, O., Plouin, P. F., Cambien, F., Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle*. *J.Hypertens*. 1998;16(1):37-44.
142. Castellano, M., Muiesan, M. L., Beschi, M., Rizzoni, D., Cinelli, A., Salvetti, M., Pasini, G., Porteri, E., Bettoni, G., Zulli, R., Agabiti-Rosei, E., Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 1996;28(6):1076-1080.
143. Takami, S., Katsuya, T., Rakugi, H., Sato, N., Nakata, Y., Kamitani, A., Miki, T., Higaki, J., Ogihara, T., Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am.J.Hypertens*. 1998;11(3 Pt 1):316-321.
144. Schmidt, S., Beige, J., Walla-Friedel, M., Michel, M. C., Sharma, A. M., Ritz, E., A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J.Hypertens*. 1997;15(12 Pt 1):1385-1388.
145. Lesage, S., Velho, G., Vionnet, N., Chatelain, N., Demenais, F., Passa, P., Soubrier, F., Froguel, P., Genetic studies of the renin-angiotensin system in arterial hypertension associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Hypertens*. 1997;15(6):601-606.

146. Benetos, A., Topouchian, J., Ricard, S., Gautier, S., Bonnardeaux, A., Asmar, R., Poirier, O., Soubrier, F., Safar, M., Cambien, F., Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 1995;26(1):44-47.
147. Liyou, N., Davis, D., James, K., Simons, L., Friedlander, Y., Simons, J., McCallum, J., Johnson, A., The A1166C mutation in the angiotensin II type I receptor and hypertension in the elderly. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 1999;26(7):525-526.
148. Perusse, L., Chagnon, Y., Rice, T., Rao, D. C., Bouchard, C., L'épidémiologie génétique et la génétique moléculaire de l'obésité: les enseignements de l'étude des familles du Québec. *médecine/science* 1998;(8-9):914-924.
149. Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Moulin, A., Berlan, M., Bouloumie, A., Lafontan, M., Galitzky, J., Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2002;283(1):R257-R265.
150. Sengenès, C., Berlan, M., De, Glisezinski, I, Lafontan, M., Galitzky, J., Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 2000;14(10):1345-1351.
151. Ailhaud, G, L'adipocyte, cellule sécrétrice et endocrine. *médecine/science* 1998;8(9):858-864.
152. Valet, P., Pages, C., Jeanneton, O., Daviaud, D., Barbe, P., Record, M., Saulnier-Blache, J. S., Lafontan, M., Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J.Clin.Invest* 1998;101(7):1431-1438.

153. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D., Warden, C. H., Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat.Genet.* 1997;15(3):269-272.
154. Boss, O., Muzzin, P., Giacobino, J. P., The uncoupling proteins, a review. *Eur.J.Endocrinol.* 1998;139(1):1-9.
155. Levine, J. A., Eberhardt, N. L., Jensen, M. D., Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans. *Science* 1999;283(5399):212-214.
156. Herzog, H., Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models. *Eur.J.Pharmacol.* 2003;480(1-3):21-29.
157. Kanatani, A., Mashiko, S., Murai, N., Sugimoto, N., Ito, J., Fukuroda, T., Fukami, T., Morin, N., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H., Saga, Y., Nishimura, S., Ihara, M., Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology* 2000;141(3):1011-1016.
158. Weide, K., Christ, N., Moar, K. M., Arens, J., Hinney, A., Mercer, J. G., Eiden, S., Schmidt, I., Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Physiol Genomics* 2003;13(1):47-56.
159. Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J., Cone, R. D., Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;385(6612):165-168.

160. Dyer, A. R., Elliott, P., Shipley, M., Stamler, R., Stamler, J., Body mass index and associations of sodium and potassium with blood pressure in INTERSALT. *Hypertension* 1994;23(6 Pt 1):729-736.
161. Stamler, R., Stamler, J., Riedlinger, W. F., Algera, G., Roberts, R. H., Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans. *JAMA* 1978;240(15):1607-1610.
162. Ernst, N. D., Obarzanek, E., Clark, M. B., Briefel, R. R., Brown, C. D., Donato, K., Cardiovascular health risks related to overweight. *J.Am.Diet.Assoc.* 1997;97(7 Suppl):S47-S51.
163. Tuck, M. L., Sowers, J., Dornfeld, L., Kledzik, G., Maxwell, M., The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients. *N.Engl.J.Med.* 1981;304(16):930-933.
164. Burke, G. L., Savage, P. J., Sprafka, J. M., Selby, J. V., Jacobs, D. R., Jr., Perkins, L. L., Roseman, J. M., Hughes, G. H., Fabsitz, R. R., Relation of risk factor levels in young adulthood to parental history of disease. The CARDIA study. *Circulation* 1991;84(3):1176-1187.
165. Mark, A. L., Rahmouni, K., Correia, M., Haynes, W. G., A leptin-sympathetic-leptin feedback loop: potential implications for regulation of arterial pressure and body fat. *Acta Physiol Scand.* 2003;177(3):345-349.
166. Froguel, P., Guy-Grand, B., Clement, K., Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome] *Genetique de l'obesite: vers la comprehension d'un syndrome complexe.* *Presse Med.* 2000;29(10):564-571.

167. Trayhurn, P., The development of obesity in animals: the role of genetic susceptibility. *Clin.Endocrinol.Metab* 1984;13(3):451-474.
168. Johnson, P. R., Greenwood, M. R., Horwitz, B. A., Stern, J. S., Animal models of obesity: genetic aspects. *Annu.Rev.Nutr.* 1991;11:325-353.
169. Coleman, D. L., Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978;14(3):141-148.
170. Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., ., Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83(7):1263-1271.
171. Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., Friedman, J. M., Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996;379(6566):632-635.
172. Chua, S. C., Jr., Chung, W. K., Wu-Peng, X. S., Zhang, Y., Liu, S. M., Tartaglia, L., Leibel, R. L., Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996;271(5251):994-996.
173. Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. J., Hess, J. F., Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat.Genet.* 1996;13(1):18-19.
174. Hamann, A., Matthaei, S., Regulation of energy balance by leptin. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 1996;104(4):293-300.

175. Naggert, J. K., Fricker, L. D., Varlamov, O., Nishina, P. M., Rouille, Y., Steiner, D. F., Carroll, R. J., Paigen, B. J., Leiter, E. H., Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat.Genet.* 1995;10(2):135-142.
176. Noben-Trauth, K., Naggert, J. K., North, M. A., Nishina, P. M., A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature* 1996;380(6574):534-538.
177. Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., ., Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N.Engl.J.Med.* 1996;334(5):292-295.
178. Golden, P. L., Maccagnan, T. J., Pardridge, W. M., Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J.Clin.Invest* 1997;99(1):14-18.
179. Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F., Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995;269(5223):540-543.
180. Collins, S., Kuhn, C. M., Petro, A. E., Swick, A. G., Chrnyk, B. A., Surwit, R. S., Role of leptin in fat regulation. *Nature* 1996;380(6576):677-
181. Haynes, W. G., Morgan, D. A., Walsh, S. A., Mark, A. L., Sivitz, W. I., Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J.Clin.Invest* 1997;100(2):270-278.

182. Lembo, G., Vecchione, C., Fratta, L., Marino, G., Trimarco, V., d'Amati, G., Trimarco, B., Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes* 2000;49(2):293-297.
183. Emilsson, V., Liu, Y. L., Cawthorne, M. A., Morton, N. M., Davenport, M., Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 1997;46(2):313-316.
184. Jackson, E. K., Herzer, W. A., A comparison of the natriuretic/diuretic effects of rat vs. human leptin in the rat. *Am.J.Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F761-F765.
185. Serradeil-Le Gal, C., Raufaste, D., Brossard, G., Pouzet, B., Marty, E., Maffrand, J. P., Le Fur, G., Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. *FEBS Lett.* 1997;404(2-3):185-191.
186. Villarreal, D., Reams, G., Freeman, R. H., Taraben, A., Renal effects of leptin in normotensive, hypertensive, and obese rats. *Am.J.Physiol* 1998;275(6 Pt 2):R2056-R2060.
187. Haynes, W. G., Morgan, D. A., Walsh, S. A., Sivitz, W. I., Mark, A. L., Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 1998;25(1):65-69.
188. Flier, J. S., Lowell, B. B., Obesity research springs a proton leak [news; comment]. *Nat.Genet.* 1997;15(3):223-224.
189. Moreau, E., Philippe, J., Couvent, S., Leroux-Roels, G., Interference of soluble TNF-alpha receptors in immunological detection of tumor necrosis factor-alpha. *Clin.Chem.* 1996;42(9):1450-1453.

190. Fernandez-Real, J. M., Broch, M., Ricart, W., Casamitjana, R., Gutierrez, C., Vendrell, J., Richart, C., Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998;47(11):1757-1762.
191. Aderka, D., Engelmann, H., Maor, Y., Brakebusch, C., Wallach, D., Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J.Exp.Med.* 1992;175(2):323-329.
192. Godfried, M. H., Romijn, J. A., van der, Poll T., Weverling, G. J., Corssmit, E. P., Endert, E., Eeftinck Schattenkerk, J. K., Sauerwein, H. P., Soluble receptors for tumor necrosis factor are markers for clinical course but not for major metabolic changes in human immunodeficiency virus infection. *Metabolism* 1995;44(12):1564-1569.
193. Spinass, G. A., Keller, U., Brockhaus, M., Release of soluble receptors for tumor necrosis factor (TNF) in relation to circulating TNF during experimental endotoxemia. *J.Clin.Invest* 1992;90(2):533-536.
194. Elsasser-Beile, U., Gallati, H., Weber, W., Wild, E. D., Schulte, Monting J., von Kleist, S., Increased plasma concentrations for type I and II tumor necrosis factor receptors and IL-2 receptors in cancer patients. *Tumour.Biol.* 1994;15(1):17-24.
195. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Atkinson, R. L., Spiegelman, B. M., Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 1997;46(3):451-455.
196. Bullo-Bonet, M., Garcia-Lorda, P., Lopez-Soriano, F. J., Argiles, J. M., Salas-Salvado, J., Tumour necrosis factor, a key role in obesity? *FEBS Lett.* 1999;451(3):215-219.

197. Spiegelman, B. M., Hotamisligil, G. S., Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. *Cell* 1993;73(4):625-627.
198. Spiegelman, B. M., Choy, L., Hotamisligil, G. S., Graves, R. A., Tontonoz, P., Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J.Biol.Chem.* 1993;268(10):6823-6826.
199. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., Spiegelman, B. M., Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259(5091):87-91.
200. Saghizadeh, M., Ong, J. M., Garvey, W. T., Henry, R. R., Kern, P. A., The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 1996;97(4):1111-1116.
201. Plata-Salaman, C. R., Oomura, Y., Kai, Y., Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res.* 1988;448(1):106-114.
202. Coombes, R. C., Rothwell, N. J., Shah, P., Stock, M. J., Changes in thermogenesis and brown fat activity in response to tumour necrosis factor in the rat. *Biosci.Rep.* 1987;7(10):791-799.
203. Rothwell, N. J., Central effects of TNF alpha on thermogenesis and fever in the rat. *Biosci.Rep.* 1988;8(4):345-352.
204. Grunfeld, C., Gulli, R., Moser, A. H., Gavin, L. A., Feingold, K. R., Effect of tumor necrosis factor administration in vivo on lipoprotein lipase activity in various tissues of the rat. *J.Lipid Res.* 1989;30(4):579-585.

205. Fried, S. K., Zechner, R., Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J.Lipid Res.* 1989;30(12):1917-1923.
206. Semb, H., Peterson, J., Tavernier, J., Olivecrona, T., Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo. *J.Biol.Chem.* 1987;262(17):8390-8394.
207. Stephens, J. M., Pekala, P. H., Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *J.Biol.Chem.* 1992;267(19):13580-13584.
208. Liu, L. S., Spelleken, M., Rohrig, K., Hauner, H., Eckel, J., Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 1998;47(4):515-522.
209. Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., Spiegelman, B. M., IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271(5249):665-668.
210. Zumbach, M. S., Boehme, M. W., Wahl, P., Stremmel, W., Ziegler, R., Nawroth, P. P., Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1997;82(12):4080-4082.
211. Torti, F. M., Dieckmann, B., Beutler, B., Cerami, A., Ringold, G. M., A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. *Science* 1985;229(4716):867-869.

212. Prins, J. B., Niesler, C. U., Winterford, C. M., Bright, N. A., Siddle, K., O'Rahilly, S., Walker, N. I., Cameron, D. P., Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 1997;46(12):1939-1944.
213. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., Hotamisligil, G. S., Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- alpha function. *Nature* 1997;389(6651):610-614.
214. Ventre, J., Doebber, T., Wu, M., MacNaul, K., Stevens, K., Pasparakis, M., Kollias, G., Moller, D. E., Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 1997;46(9):1526-1531.
215. Pravenec, M., Klir, P., Kren, V., Zicha, J., Kunes, J., An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J.Hypertens.* 1989;7(3):217-221.
216. Pausova, Z., Kunes, J., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Tremblay, J., Hamet, P., Contribution of the TNF alpha gene region of rat chromosome 20 to the body temperature response to endotoxin. *Transplant.Proc.* 1999;31(3):1622-1623.
217. Winkler, G., Lakatos, P., Salamon, F., Nagy, Z., Speer, G., Kovacs, M., Harnos, G., Dworak, O., Cseh, K., Elevated serum TNF-alpha level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. *Diabet.Med.* 1999;16(3):207-211.
218. Kahaleh, M. B., Fan, P. S., Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1997;15(2):163-167.

219. Brasier, A. R., Li, J., Wimbish, K. A., Tumor necrosis factor activates angiotensinogen gene expression by the Rel A transactivator. *Hypertension* 1996;27(4):1009-1017.
220. Nyui, N., Tamura, K., Yamaguchi, S., Nakamaru, M., Ishigami, T., Yabana, M., Kihara, M., Ochiai, H., Miyazaki, N., Umemura, S., Ishii, M., Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30(4):859-867.
221. Mark, A. L., Correia, M., Morgan, D. A., Shaffer, R. A., Haynes, W. G., State-of-the-art-lecture: Obesity-induced hypertension: new concepts from the emerging biology of obesity. *Hypertension* 1999;33(1 Pt 2):537-541.
222. Risch, N., Zhang, H., Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* 1995;268(5217):1584-1589.
223. George, S. T., Ruoho, A. E., Malbon, C. C., N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors. *J.Biol.Chem.* 1986;261(35):16559-16564.
224. Boege, F., Ward, M., Jurss, R., Hekman, M., Helmreich, E. J., Role of glycosylation for beta 2-adrenoceptor function in A431 cells. *J.Biol.Chem.* 1988;263(18):9040-9049.
225. Rands, E., Candelore, M. R., Cheung, A. H., Hill, W. S., Strader, C. D., Dixon, R. A., Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J.Biol.Chem.* 1990;265(18):10759-10764.

226. Couvineau, A., Fabre, C., Gaudin, P., Maoret, J. J., Laburthe, M., Mutagenesis of N-glycosylation sites in the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor. Evidence that asparagine 58 or 69 is crucial for correct delivery of the receptor to plasma membrane. *Biochemistry* 1996;35(6):1745-1752.
227. Kaushal, S., Ridge, K. D., Khorana, H. G., Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91(9):4024-4028.
228. Davidson, J. S., Flanagan, C. A., Zhou, W., Becker, I. I., Elario, R., Emeran, W., Sealton, S. C., Millar, R. P., Identification of N-glycosylation sites in the gonadotropin-releasing hormone receptor: role in receptor expression but not ligand binding. *Mol.Cell Endocrinol.* 1995;107(2):241-245.
229. van Koppen, C. J., Nathanson, N. M., Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J.Biol.Chem.* 1990;265(34):20887-20892.
230. Bisello, A., Greenberg, Z., Behar, V., Rosenblatt, M., Suva, L. J., Chorev, M., Role of glycosylation in expression and function of the human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor. *Biochemistry* 1996;35(49):15890-15895.
231. Servant, G., Dudley, D. T., Escher, E., Guillemette, G., Analysis of the role of N-glycosylation in cell-surface expression and binding properties of angiotensin II type-2 receptor of rat pheochromocytoma cells. *Biochem.J.* 1996;313 (Pt 1):297-304.

232. el Battari, A., Forget, P., Fouchier, F., Pic, P., Effect of inhibiting N-glycosylation or oligosaccharide processing on vasoactive intestinal peptide receptor binding activity and structure. *Biochem.J.* 1991;278 (Pt 2):527-533.
233. Liu, X., Davis, D., Segaloff, D. L., Disruption of potential sites for N-linked glycosylation does not impair hormone binding to the lutropin/choriogonadotropin receptor if Asn-173 is left intact. *J.Biol.Chem.* 1993;268(3):1513-1516.
234. Zhang, R., Cai, H., Fatima, N., Buczko, E., Dufau, M. L., Functional glycosylation sites of the rat luteinizing hormone receptor required for ligand binding. *J.Biol.Chem.* 1995;270(37):21722-21728.
235. Fan, G., Goldsmith, P. K., Collins, R., Dunn, C. K., Krapcho, K. J., Rogers, K. V., Spiegel, A. M., N-linked glycosylation of the human Ca²⁺ receptor is essential for its expression at the cell surface. *Endocrinology* 1997;138(5):1916-1922.
236. Innamorati, G., Sadeghi, H., Birnbaumer, M., A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor. *Mol.Pharmacol.* 1996;50(3):467-473.
237. Russo, D., Chazenbalk, G. D., Nagayama, Y., Wadsworth, H. L., Rapoport, B., Site-directed mutagenesis of the human thyrotropin receptor: role of asparagine-linked oligosaccharides in the expression of a functional receptor. *Mol.Endocrinol.* 1991;5(1):29-33.
238. Garcia, Rodriguez C., Cundell, D. R., Tuomanen, E. I., Kolakowski, L. F., Jr., Gerard, C., Gerard, N. P., The role of N-glycosylation for functional expression of the human platelet-activating factor receptor. Glycosylation is required for efficient membrane trafficking. *J.Biol.Chem.* 1995;270(42):25178-25184.

239. Goke, R., Just, R., Lankat-Buttgereit, B., Goke, B., Glycosylation of the GLP-1 receptor is a prerequisite for regular receptor function. *Peptides* 1994;15(4):675-681.
240. Lanctot, P. M., Leclerc, P. C., Escher, E., Leduc, R., Guillemette, G., Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry* 1999;38(27):8621-8627.
241. Jayadev, S., Smith, R. D., Jagadeesh, G., Baukal, A. J., Hunyady, L., Catt, K. J., N-linked glycosylation is required for optimal AT1a angiotensin receptor expression in COS-7 cells. *Endocrinology* 1999;140(5):2010-2017.
242. Buteau, H., Pezet, A., Ferrag, F., Perrot-Applanat, M., Kelly, P. A., Edery, M., N-glycosylation of the prolactin receptor is not required for activation of gene transcription but is crucial for its cell surface targeting. *Mol.Endocrinol.* 1998;12(4):544-555.
243. Kornfeld, R.Kornfeld, S., Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu.Rev.Biochem.* 1985;54:631-664.
244. Holst, B., Bruun, A. W., Kielland-Brandt, M. C., Winther, J. R., Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1996;15(14):3538-3546.
245. Hebert, D. N., Zhang, J. X., Helenius, A., Protein folding and maturation in a cell-free system. *Biochem.Cell Biol.* 1998;76(5):867-873.
246. Molinari, M.Helenius, A., Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* 2000;288(5464):331-333.

247. Fukushima, Y., Oka, Y., Saitoh, T., Katagiri, H., Asano, T., Matsubishi, N., Takata, K., van Breda, E., Yazaki, Y., Sugano, K., Structural and functional analysis of the canine histamine H2 receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action. *Biochem.J.* 1995;310 (Pt 2):553-558.
248. Grishhammer, R. Tate, C. G., Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q.Rev.Biophys.* 1995;28(3):315-422.
249. Osterop, A. P., Kofflard, M. J., Sandkuijl, L. A., ten Cate, F. J., Krams, R., Schalekamp, M. A., Danser, A. H., AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998;32(5):825-830.
250. Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F. W., Thibault, G., Nemer, M., Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 2000;97(2):931-936.
251. Arata, Y., Geshi, E., Nomizo, A., Aoki, S., Katagiri, T., Alterations in sarcoplasmic reticulum and angiotensin II receptor type 1 gene expression in spontaneously hypertensive rat hearts. *Jpn.Circ.J.* 1999;63(5):367-372.
252. Hamet, P., Gaudet, D., Pausova, Z., Gossard, F., Tremblay, J., Larochelle, P., Bernard, M., Tonellato, P, Wang, Z., Kirova, R, Cheng, Q, Hudson, T., Lander, E., Schork, N. J., Kotchen, T. A., Jacob, H. J., Kaldunski, M. L., Cowley, A. W., Identification of numerous clustering QTLs through total genome scan and fine phenotyping of hypertension-related traits in French-Canadian families. *J.Hypertens.* 2002;20:s258-s258.

253. Gavras, I.Gavras, H., Role of alpha2-adrenergic receptors in hypertension. *Am J.Hypertens.* 2001;14(6 Pt 2):171S-177S.
254. Dao, T. T., Kailasam, M. T., Parmer, R. J., Le, H. V., Le Verge, R., Kennedy, B. P., Ziegler, G., Insel, P. A., Wright, F. A., O'Connor, D. T., Expression of altered alpha2-adrenergic phenotypic traits in normotensive humans at genetic risk of hereditary (essential) hypertension. *J.Hypertens.* 1998;16(6):779-792.
255. de Gasparo, M.Bullock, G., The AT1 and AT2 angiotensin receptors. 1996;(10):100-124.
256. Fernandez-Real, J. M., Gutierrez, C., Ricart, W., Casamitjana, R., Fernandez-Castaner, M., Vendrell, J., Richart, C., Soler, J., The tnf alpha gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 1997;46(September):1468-1472.
257. Herrmann, S. M., Ricard, S., Nicaud, V., Mallet, C., Arveiler, D., Evans, A., Ruidavets, J. B., Luc, G., Bara, L., Parra, H. J., Poirier, O., Cambien, F., Polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha gene, coronary heart disease and obesity. *European journal of clinical investigation* 1998;(28):59-66.
258. Norman, R. A., Bogardus, C., Ravussin, E., Linkage between obesity and a marker near the tumor necrosis factor-alpha locus in Pima Indians. *J.Clin.Invest.* 1995;96(1):158-162.
259. Brand, E., Schorr, U., Kunz, I., Kertmen, E., Ringel, J., Distler, A., Sharma, A. M., Tumor necrosis factor-alpha--308 G/A polymorphism in obese Caucasians. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 2001;25(4):581-585.

260. Zinman, B., Hanley, A. J., Harris, S. B., Kwan, J., Fantus, I. G., Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1999;84(1):272-278.
261. Hallenbeck, J. M., Dutka, A. J., Vogel, S. N., Heldman, E., Doron, D. A., Feuerstein, G., Lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor activity in rats with and without risk factors for stroke. *Brain Res.* 1991;541(1):115-120.
262. Hamet, P., Kong, D., Pravenec, M., Kunes, J., Kren, V., Klir, P., Sun, Y. L., Tremblay, J., Restriction fragment length polymorphism of hsp70 gene, localized in the RT1 complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19(6 Pt 2):611-614.
263. Harris, E. L., Grigor, M. R., Thompson, C. M., Cosegregation of the Tnfalpha locus with cardiovascular phenotypes in the F2 generation of a New Zealand genetically hypertensive and Brown Norway cross. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 1998;25(3-4):204-207.
264. Lodwick, D., Kaiser, M. A., Harris, J., Privat, P., Vincent, M., Sassard, J., Samani, N. J., Failure of the heat-shock protein 70 locus to cosegregate with blood pressure in spontaneously hypertensive rat x Wistar-Kyoto rat cross. *J.Hypertens.* 1993;11(10):1047-1051.
265. Kren, V., Pravenec, M., Lu, S., Krenova, D., Wang, J. M., Wang, N., Merriouns, T., Wong, A., St Lezin, E., Lau, D., Szpirer, C., Szpirer, J., Kurtz, T. W., Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J.Clin.Invest* 1997;99(4):577-581.

266. Kissebah, A. H., Vydelingum, N., Murray, R., Evans, D. J., Hartz, A. J., Kalkhoff, R. K., Adams, P. W., Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1982;54(2):254-260.
267. Bjorntorp, P., Obesity and risk of cardiovascular disease. *Acta Med.Scand.* 1985;218(2):145-147.
268. Bjorntorp, P., Abdominal obesity and the development of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1988;4(6):615-622.
269. Arner, P., Lithell, H., Wahrenberg, H., Bronnegard, M., Expression of lipoprotein lipase in different human subcutaneous adipose tissue regions. *J.Lipid Res.* 1991;32(3):423-429.
270. Price, S. R., Mizel, S. B., Pekala, P. H., Regulation of lipoprotein lipase synthesis and 3T3-L1 adipocyte metabolism by recombinant interleukin 1. *Biochim.Biophys.Acta* 1986;889(3):374-381.
271. Farooqi, I. S., Jebb, S. A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C. H., Prentice, A. M., Hughes, I. A., McCamish, M. A., O'Rahilly, S., Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N.Engl.J.Med.* 1999;341(12):879-884.
272. Clement, K., Garner, C., Hager, J., Philippi, A., LeDuc, C., Carey, A., Harris, T. J., Jury, C., Cardon, L. R., Basdevant, A., Demenais, F., Guy-Grand, B., North, M., Froguel, P., Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes* 1996;45(5):687-690.

273. Reed, D. R., Ding, Y., Xu, W., Cather, C., Green, E. D., Price, R. A., Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene. *Diabetes* 1996;45(5):691-694.
274. Ross, R., Shaw, K. D., Martel, Y., de Guise, J., Avruch, L., Adipose tissue distribution measured by magnetic resonance imaging in obese women. *Am.J.Clin.Nutr.* 1993;57(4):470-475.
275. Pouliot, M. C., Despres, J. P., Lemieux, S., Moorjani, S., Bouchard, C., Tremblay, A., Nadeau, A., Lupien, P. J., Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am.J.Cardiol.* 1994;73(7):460-468.
276. Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., ., Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995;44(7):855-858.
277. Kissebah, A. H., Krakower, G. R., Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev.* 1994;74(4):761-811.
278. Rocchini, A. P., Cardiovascular regulation in obesity-induced hypertension. *Hypertension* 1992;19(1 Suppl):I56-I60.
279. Ferrannini, E., The haemodynamics of obesity: a theoretical analysis. *J.Hypertens.* 1992;10(11):1417-1423.

280. Selby, J. V., Friedman, G. D., Quesenberry, C. P., Jr., Precursors of essential hypertension. The role of body fat distribution pattern. *Am.J.Epidemiol.* 1989;129(1):43-53.
281. Blair, D., Habicht, J. P., Sims, E. A., Sylwester, D., Abraham, S., Evidence for an increased risk for hypertension with centrally located body fat and the effect of race and sex on this risk. *Am.J.Epidemiol.* 1984;119(4):526-540.
282. Kaplan, N. M., The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch.Intern.Med.* 1989;149(7):1514-1520.
283. Pausova, Z., Gossard, F., Gaudet, D., Tremblay, J., Kotchen, T. A., Cowley, A. W., Hamet, P., Heritability estimates of obesity measures in siblings with and without hypertension. *Hypertension* 2001;38(1):41-47.
284. Mark, A. L., Shaffer, R. A., Correia, M. L., Morgan, D. A., Sigmund, C. D., Haynes, W. G., Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *J.Hypertens.* 1999;17(12 Pt 2):1949-1953.
285. Aizawa-Abe, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Ebihara, K., Satoh, N., Iwai, H., Matsuoka, N., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y., Nakao, K., Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J.Clin.Invest* 2000;105(9):1243-1252.
286. Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., Friedman, J. M., Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269(5223):543-546.

287. Correia, M. L., Haynes, W. G., Rahmouni, K., Morgan, D. A., Sivitz, W. I., Mark, A. L., The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes* 2002;51(2):439-442.
288. Reaven, G. M., Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu.Rev.Med.* 1993;44:121-131.
289. Landsberg, L., Diet, obesity and hypertension: an hypothesis involving insulin, the sympathetic nervous system, and adaptive thermogenesis. *Q.J.Med.* 1986;61(236):1081-1090.
290. Kannel, W. B., Brand, N., Skinner, J. J., Jr., Dawber, T. R., McNamara, P. M., The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. *Ann.Intern.Med.* 1967;67(1):48-59.
291. Scherrer, U., Randin, D., Tappy, L., Vollenweider, P., Jequier, E., Nicod, P., Body fat and sympathetic nerve activity in healthy subjects. *Circulation* 1994;89(6):2634-2640.
292. Grassi, G., Seravalle, G., Cattaneo, B. M., Bolla, G. B., Lanfranchi, A., Colombo, M., Giannattasio, C., Brunani, A., Cavagnini, F., Mancia, G., Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 1995;25(4 Pt 1):560-563.
293. Rumantir, M. S., Vaz, M., Jennings, G. L., Collier, G., Kaye, D. M., Seals, D. R., Wiesner, G. H., Brunner-La Rocca, H. P., Esler, M. D., Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. *J.Hypertens.* 1999;17(8):1125-1133.
294. Eaton, S. B., Konner, M., Shostak, M., Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *Am.J.Med.* 1988;84(4):739-749.

295. Hamet, P., Genes and hypertension: where we are and where we should go. *Clin.Exp.Hypertens.* 1999;21(5-6):947-960.
296. Sofowora, G. G., Dishy, V., Muszkat, M., Xie, H. G., Kim, R. B., Harris, P. A., Prasad, H. C., Byrne, D. W., Nair, U. B., Wood, A. J., Stein, C. M., A common beta1-adrenergic receptor polymorphism (Arg389Gly) affects blood pressure response to beta-blockade. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2003;73(4):366-371.



Annexes



Constitutive activation of the human bradykinin B₂ receptor induced by mutations in transmembrane helices III and VI.

Jacky Marie, Caroline Koch, Didier Pruneau, Jean-Luc Paquet, Thierry Groblewski, Renée Larguier, Colette Lombard, Benoit Deslauriers, Bernard Maignet, Jean-Claude Bonnafous.

Publish in *Molecular Pharmacology* 1 :92-101 (1999)

Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

This paper is available online at : <http://www.molpharm.org>

Institut national de la santé et de la recherche médicale U439, 34090 Montpellier, France (J.M., C.K., T.G., R.L., B.D., C.L., J.-C.B.)

Laboratoires Fournier, 21121 Daix, France (D.P., J.-L.P.)

Laboratoire de Chimie Théorique, Université de Nancy I, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cédex, France (B.M.)

Abstract

We report that mutation of specific residues in the human B₂ bradykinin (BK) receptor induces its marked constitutive activation, evaluated through inositol phosphate production in COS-7 cells expressing the wild-type or mutant receptors. We provide evidence for a strikingly high constitutive activation of the B₂ receptor induced by alanine substitution of the Asn¹¹³ residue, located in the third transmembrane domain. These results are reminiscent of our previous finding that mutation of the homologous Asn¹¹¹ residue induces constitutive activation of the AT₁, angiotensin II receptor. BK overstimulation of the constitutively activated mutant N113A receptor was also observed. Phe replacement of the Trp²⁵⁶ residue, fairly conserved in transmembrane domain VI of G protein-coupled receptors, also induced a less prominent but significant constitutive activation. Interestingly, the peptidic HOE 140 compound and an original nonpeptidic compound LF 16 0335, which both behaved as inverse agonists of the wild-type receptor expressed in COS-7 cells, became potent and efficient agonists of the two constitutively activated mutant N113A and W256F receptors. These parallel changes observed for two chemically unrelated series can serve as a basis for future studies of structure-function relationships and modeling of activation processes, based on a detailed analysis of the network of helix-helix inter-actions, which stabilize the inactive receptor conformation and undergo rearrangements on transition to activated states.

Introduction

Kinins are biologically active peptides derived from large precursors (kininogens) through the action of serine proteases named kallikreins (Regoli and Barabe, 1980). They produce a number of biological effects, including activation of sensory pain fibers, smooth muscle contraction, endothelium-dependent vasodilatation, and plasma extravasation (Regoli and Barabe, 1980; Proud and Kaplan, 1988; Dray and Perkins, 1993). Kinin-induced responses are mediated by the activation of B₁ or B₂ receptors, which belong to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs). Most of the physiological effects appear to be mediated by the activation of B₂ receptors that bind bradykinin (BK) and kallidin (Lys-bradykinin) with high affinities, with the corresponding carboxyl-terminal des-Arg metabolites being agonists of the B₁ receptor.

A number of mutagenesis or biochemical studies on the BK B₂ receptor (Kyle et al., 1994; Nardone and Hogan, 1994; AbdAlla et al., 1996; Jarnagin et al., 1996; Leeb et al., 1997; Fathy et al., 1998, and herein cited references) have been paralleled by sustained efforts to provide molecular models of BK-receptor interactions (Kyle et al., 1994; Jarnagin et al., 1996; Leeb et al., 1997; Fathy et al., 1998). The purpose of the present work was to complete these studies with mechanistic considerations about the receptor conformational changes that underlie the transitions from inactive to active receptor conformations. In this respect, the widely documented phenomena of constitutive activation of GPCR induced by appropriate point mutations (Cohen et al., 1992; Lefkowitz et al., 1993; Noda et al., 1996; Scheer et al., 1996; Groblewski et al., 1997) are useful to predict elements of the network of intramolecular interactions that stabilize the inactive receptor conformation and undergo rearrangements on activation. The finding of B₂ receptor-activating mutations reported in

the present work took benefit of previous data from our laboratory relative to the process of activation of the type 1 angiotensin II (AT₁) receptor and the identity in amino acid sequences of the two receptors (about 30, a high value in the subfamily of peptide hormone GPCR).

A preliminary modeling study of the AT₁ receptor pointed out a spatial proximity among the three residues Asp⁷⁴ [transmembrane (TM) II], Asn¹¹¹ (TM III), and Tyr²⁹² (TM VII) (Joseph et al., 1995). According to this model, the inactive receptor conformation would involve interaction between Asn¹¹¹ and Tyr²⁹², that is, hormone stimulation would facilitate the disruption of this interaction and allow Tyr²⁹² to interact with the conserved Asp⁷⁴, which was previously shown to be essential for receptor coupling to phospholipase C (Bihoreau et al., 1993). Experimental support to this hypothesis was the finding that Tyr²⁹² → Phe mutation severely impaired inositol phosphate production induced by angiotensin II (Mane et al., 1994) and that Asn¹¹¹ → Ala mutation led to constitutive activation of the receptor (Groblewski et al., 1997). More recently, we refined this model of activation and proposed the involvement of an additional interaction of Asn¹³¹ with Trp²⁵³, located in TM VI (T. Groblewski, J. Marie, and J. C. Bonnafous, unpublished results).

Interestingly, these residues involved in the AT₁ receptor activation are conserved in the B₂ receptor (i.e., Asp⁷⁶, Asn¹¹³, Tyr²⁹⁵, and Trp²⁵⁶ for the human receptor; Hess et al., 1992). Our goal was to check whether these residues might play a role in the B₂ receptor activation, as previously found by other authors for the conserved Asp residue in the rat receptor (Quitterer et al., 1996). This comparative study provides a good opportunity to tackle the problem of conservation of molecular events underlying the activation process. The main finding of the present study was the striking constitutive activation of the B₂ receptor induced by mutation of Asn¹¹³ in TM III. We also found constitutive activation of

the B₂ receptor mutated at its Trp²⁵⁶ residue in TM VI. Moreover, the constitutively activated mutant (CAM) receptors displayed striking changes in their pharmacological properties: they were overstimulated by peptidic and a nonpeptidic compounds that behaved as inverse agonists of the wild-type (WT) receptor.

Materials and Methods

Reagents and Ligands

BK was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). myo-[2- ³H]inositol and [³H]BK (specific radioactivity ranging around 100 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). HOE 140 was kindly supplied by Professor J. Martinez (Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France). The nonpeptide derivative LF 16 0335 (1-[[3-[(2,4-dimethylquinolin-8-yl) oxymethyl]2,4-dichlorophenyl]sulfonyl]2(S)-[[4-[4-(aminoiminomethyl)-phenylcarbonyl]]piperazin-1-yl]carbonyl]pyrrolidine) was designed by Fournier Research Laboratories (Daix, France) (Pruneau et al., 1998). COS-7 cells were from the European Cell Type Collection (Salisbury UK).

Site-Directed Mutagenesis and Receptor Expression

The WT receptor and all mutated receptors were tagged through the addition of a 10-amino-acid epitope from the c-myc oncogene at the N termini of receptors truncated at the Asn³ residue. The cDNA constructs included a Kozak sequence. The various mutations were carried out as described previously (Marie et al., 1994; Groblewski et al., 1997). The WT or mutant receptors were subcloned in the *EcoRI* and *XbaI* sites of the eukaryotic expression vector pCMV polylinker. Receptors were transiently expressed in COS-7 cells by using the electroporation transfection method: 10⁷ cells were resuspended in 300 μ l of electroporation buffer (50 mM K₂HPO₄, 20 mM KOH, 20mM CH₃COOK, and 27 mM MgSO₄, pH 7.40) and incubated for 10 min at room temperature in an electroporation cuvette (0.4-cm electrode gap; BioRad, Hercules, CA) with 20 μ g of pCMV carrier and different amounts of pCMV containing cDNA receptor sequences (2.5-100 ng range). They were submitted to an electric discharge (950 μ F, 280 V, 50 ms) and then cultured for 2 days at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium, 4.5 g/liter glucose, 10 fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin before binding or inositol phosphate (IP) accumulation experiments.

Several amounts of pCMV-containing cDNA receptor sequences were systematically used for transfection to compare the properties of receptors expressed at similar levels in the same experiment, a condition required to accurately evaluate constitutive activation phenomena.

Routine evaluation of binding site numbers was carried out using 5 nM [³H]BK in the presence or absence of an excess of unlabeled BK (1 μ M).

Binding Assays

Plasma Membrane. Crude membranes from COS-7 cells transiently expressing the WT or mutant B₂ receptors were prepared as described previously (Marie et al., 1994). [³H]BK-binding assays were performed as follows: the membranes were washed twice with binding buffer [25 mM N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid, 140 μg/ml bacitracin, 1 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM o-phenanthroline, pH set to 6.8 with ammonia] and incubated for 10 min at 30°C in the presence or absence of 100 mM NaCl with or without 100 μM guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate (GTPγS) before binding experiments carried out in the same medium. The membranes (15-20 μg/assay) were incubated for 1.5 h at 25°C in binding buffer in the presence of [³H]BK using a 0.05- to 30-nM range. Nonspecific binding was evaluated in the presence of 10⁻⁵ M unlabeled BK. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration through GF/C filters presoaked in 0.1% polyethyleneimine.

Intact Cells. [³H]BK binding to transfected COS-7 cells grown in 12-well tissue culture clusters (about 2 X 10⁵ cells/well) was carried out at 4°C in Dulbecco's phosphate-buffered saline supplemented with 140 μg/ml bacitracin, 1 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM O-phenanthroline, and 10⁻⁵ M captopril, pH 7.0, using a 3-h incubation time, under gentle agitation. Bound radioactivity was evaluated after washing the cells twice with cold binding medium and collecting them in 500 μl of 0.1 N NaOH.

IP Assays

COS-7 cells expressing the WT or mutant receptors were grown in 6-well tissue culture clusters and labeled for 24 h with myo-[2-³H]inositol (1.5 ml/well, 1 μ Ci/ml) in medium 199 deprived of serum. Before stimulation, cells were incubated at 37°C for 1 h in IP buffer [consisting of 116 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 11 mM glucose, 140 μ g/ml bacitracin, and 10⁻⁵ M captopril, pH 7.4]. After a 15-min preincubation in medium containing 10 mM LiCl, cells were incubated in the presence or absence of ligands for 15 min at 37°C in medium containing 10 mM LiCl. Pooled IPs were extracted and measured as described previously (Paquet et al., 1990). The preincubation step was omitted in the experiments designed to evaluate the properties of HOE 140 and LF 16 0335.

Results and Discussion

To assess the expression of the WT or mutated B₂ receptors and to facilitate their purification, a c-myc epitope (10 amino acids) was fused with receptors truncated at the Asn³ glycosylation site. This modification had no significant influence on the pharmacological properties of the receptors, as assessed by unchanged K_d values relative to [³H]BK binding in comparative studies carried out on intact COS cells (0.82 \pm 0.35 nM and 0.64 \pm 0.28 nM for the WT and tagged receptors, respectively; mean of three experiments) and unchanged EC₅₀ values for BK-induced IP production (0.48 \pm 0.25 nM and 0.51 \pm 0.27 nM for WT and tagged receptors, respectively). The suppression of the potential

glycosylation site located near the N terminus, already applied to the AT₁ (J. Marie, unpublished results), might favor tag recognition by a specific antibody. In all described experimental data, "WT receptor" refers to the tagged receptor.

Role of Asn⁷⁶ and Tyr²⁹⁵ in B₂ Receptor Activation

Properties of the D76N Mutant B₂ Receptor. The conserved Asp⁷⁶ residue of the human B₂ receptor, which is located in TM II and essential for signal transduction in many GPCR, including the AT₁ receptor (Bihoreau et al., 1993), was mutated into Asn, as in a previous study of the rat B₂ receptor (Quitterer et al., 1996). The binding affinity of [³H]BK to intact transfected COS-7 cells (Table 1) was un-changed in the mutated receptor ($K_d = 0.83 \pm 0.30$ nM) compared with the WT receptor ($K_d = 0.54 \pm 0.17$ nM). The ability of BK to stimulate IP production in cells expressing the mutated D76N receptor was significantly reduced (Figs. 1 and 2). Nevertheless, the residual PLC coupling activity (55%) was surprisingly high if one considers the role generally found for the charged Asp residue. In particular, when carried out in the AT₁ receptor, the Asp → Asn mutation led to either complete (Bihoreau et al., 1993) or almost complete (unpublished results of our laboratory) suppression of phospholipase C (PLC) coupling activity. The dose-response curves relative to BK stimulation (Fig. 2) revealed that Asp → Asn replacement does not modify the EC₅₀ value. This partial reduction in PLC coupling is in agreement with recent results relative to the D78N rat B₂ receptor (Quitterer et al., 1996). However, at variance with this latter work, we could not find any significant constitutive activation of the D76N mutant human receptor (Fig. 2). It cannot be excluded that species differences in receptor sequences are responsible for these discrepancies. Mutation of Asp⁷⁶ to Ala further decreased the maximal BK stimulation of IP production (residual activity, 31%) and slightly increased the EC₅₀

value (Fig. 2). Nevertheless, the D76A mutant receptor was not constitutively activated, thus confirming that hydrogen bonding involving a residue at position 76 probably is not essential for the stabilization of the inactive receptor conformation.

Role of Na⁺ Ions. The following considerations led us to perform a preliminary analysis of the role of Na⁺ ions on BK recognition by the WT or mutated human B₂ receptors and receptor coupling to PLC: 1) the well documented ability of these ions to modulate the GTP effect on receptor-G protein interactions, which usually requires the negative charge of the conserved aspartate in TM II (Kong et al., 1993; Ceresa and Limbird, 1994); 2) the recent work (Quitterer et al., 1996) reporting constitutive activation of the rat B₂ receptor when Na⁺ concentration was decreased and proposing that the sodium salt of Asp⁷⁸ corresponds to a very low affinity state for BK, whereas the high-affinity state corresponds to the free aspartate; and 3) our previous finding that the affinity of angiotensin II for the CAM N111A AT₁ receptor was insensitive to Na⁺ ion-plus-GTPγS treatment (Groblewski et al., 1997), as a result of profoundly modified coupling properties.

Membranes from COS-7 cells expressing the WT receptor displayed high-affinity binding sites ($K_d = 0.47$ nM, $B_{max} = 0.49$ pmol/mg; Table 1) and much lower affinity binding sites (k_d value in the range of 15-20 nM, estimated through decomposition of curvilinear Scatchard plots). Their treatment with 100 mM NaCl lowered the affinity of these high affinity sites by about one order of magnitude ($k_d = 2.2$ nM, $B_{max} = 0.39$ pmol/mg). Interestingly, membranes from cells expressing the N113A receptor possessed only high-affinity sites for BK, which were not affected by Na⁺ ions ($k_d = 0.21$ nM, $B_{max} = 1.1$ pmol/mg in the absence of Na⁺; $K_d = 0.28$ nM, $B_{max} = 1.0$ pmol/mg in the presence of Na⁺) (Table 1). The presence of GTPγS during NaCl treatment did not cause significant additional perturbation of BK recognition by both WT and N113A receptors. The analysis of the D76N mutant receptor (Table 1) revealed that [³H]BK binding to membranes from COS-7 cells expressing the D76N receptor displayed a single class of binding sites in the

absence of Na^+ ions ($K_d = 0.51 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 1.0 \text{ pmol/mg}$). Na^+ ion treatment significantly decreased the affinity of these sites ($K_d = 2.5 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 0.81 \text{ pmol/mg}$) as observed for the WT receptor.

Taken together, these results indicate that Na^+ ions are somehow involved in receptor coupling, but their effects are complex and do not strictly depend on the integrity of Asp⁷⁶. Thus our findings on the human receptor are not in agreement with previous results showing that Na^+ ions exert drastic effects on the rat WT receptor by modulating the proportions of high and very low affinity BK binding sites through Asp⁷⁸ sodium salt formation (Quitterer et al., 1996).

Properties of the Y295F Mutant B₂ Receptor. Because the mutation of Tyr²⁹² in the AT₁ receptor drastically reduced receptor coupling to PLC (Marie et al., 1994), we checked whether the homologous Tyr²⁹⁵, located in TM VII of the human B₂ receptor, could be involved in its activation process. The Tyr → Phe mutation had no incidence on the receptor affinity for BK (Table 1). Moreover, the receptor coupling to PLC was not significantly affected, as assessed by the unchanged ability of BK to stimulate IP production in COS-7 cells (Fig. 1). This finding constitutes a striking difference between the B₂ and AT₁ receptors (Grolewski et al., unpublished results), indicating that some events associated to their activation processes are not conserved.

Constitutive Activation of the B₂ Receptor Induced by Asn¹¹³ and Trp²⁵⁶ Mutation

Constitutive Activation of the N113A B₂ Receptor.

The Asn¹¹³ residue of the human B₂ receptor, located in its third TM, was replaced by alanine. The WT and N113A mutant receptors were expressed at various levels in COS-7 cells and their coupling to PLC, measured as IP accumulation. The N113A receptor displayed an exceptionally high constitutive activation (up to 40-fold increase in basal activity compared with the WT receptor). Figure 3 shows the basal and BK-stimulated responses of the WT and mutant receptors as a function of their expression levels. The basal activity of the N113A receptor was higher than the maximal BK-stimulated activity of the WT receptor. The mutant receptor could be further activated by ~1.5-fold by saturating doses of BK (Figs. 3 and 4), with a slight increase in the EC₅₀ value relative to BK stimulation (0.86 nM versus 0.19 nM for WT, in the typical experiment reported in Fig. 4). The affinities of WT and N113A mutant receptors for [³H]BK, as evaluated in intact cells, were quite similar ($K_d = 0.54 \pm 0.17$ and 0.67 ± 0.22 nM, respectively; Table 1). Strong constitutive activation of the N113A receptor transiently expressed in human embryonic kidney 293 cells was also found (data not shown).

Constitutive Activation of the W256F and W256Q B₂ Receptors.

Trp²⁵⁶ (TM VI) is conserved in many GPCR, including the AT₁ receptor. Thus Trp²⁵⁶ was mutated to phenylalanine or glutamine to preserve the aromatic character of tryptophane or its ability to participate in hydrogen bonding. These mutations did not affect

the binding of BK (Table 1). A 3- to 4-fold (up to 10-fold in some experiments) enhancement of basal IP production was reproducibly found for the W256F and W256Q mutants compared with the WT receptor expressed at similar expression levels in COS-7 cells, within the same experiment (Fig. 1). The IP response to BK was also increased for the mutated receptors (Fig. 1) without significant changes in the EC_{50} values (0.52 ± 0.18 and 0.41 ± 0.15 nM for the W256F and W256Q receptors, respectively, compared with 0.54 ± 0.17 nM for the WT receptor)

The similar properties of the W256F and W256Q mutant B_2 receptors deserve a comment: the inability of the Trp \rightarrow Gln mutation to restore a WT constrained conformation could be explained by a spatial localization inadequate for its participation in hydrogen bonding. Refined receptor models, associated to a more systematic mutagenesis scanning at positions 113 and 256, would be required for the interpretation of subtle differences between amino acid side chain orientations in the WT and mutated receptors.

Pharmacological Properties of HOE 140 and the Nonpeptide LF 13 0335 for the WT and CAM Receptors.

HOE 140 was originally described as a B_2 -specific receptor antagonist (Wirth et al., 1991). Taking into account the inverse agonist properties of this compound for the native B_2 receptor from rat myometrium smooth muscle (Leeb-Lundberg et al., 1994) and its agonist properties on the recombinant rat B_2 receptor expressed in COS cells (Quitterer et al., 1996), we evaluated its ability to modulate IP production in cells transfected with the

human WT and the N113A or W256F mutant receptors. In some experiments, we found a basal activity of the WT receptor much higher than that of control untransfected cells. In such situations, we found a strong inverse agonism behavior of HOE 140 on the WT receptor, characterized by an almost complete inhibition of the basal activity, with an EC_{50} value of about 2 nM (Fig. 5). On the other hand, HOE 140 was a potent and efficient agonist of the N113A and W256F mutants; its intrinsic activity was 70 to 90% of that of BK, with EC_{50} so values in the range of 2 to 3 nM (Fig. 5).

Interestingly, quite similar properties were found for LF16 0335 (see chemical structure in Fig. 6A), a novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human B_2 receptor (Pruneau et al., 1998). LF 16 0335 acted as an inverse agonist of the WT receptor (Fig. 6B) and as an agonist of the N113A and W256F CAM receptors (Fig. 6, C and D).

The parallel pharmacological behavior of both CAM receptors provides evidence that their activated states share sufficient structural analogies to be both stabilized (or induced) through their interaction with HOE 140 and the nonpeptide derivative LF16 0335.

The properties of the N113A and W256F human B_2 receptors can be tentatively interpreted in the light of the allosteric ternary complex model proposed by Lefkowitz et al. (1993) and refined by Kenakin (1995). According to this model, the strong constitutive activity of the N113A receptor and, to a lesser extent, of the W256F mutant might indicate that the transition from R to R* was facilitated through the suppression of a structural constraint involving the interactions of Asn¹¹³ or Trp²⁵⁶ with other residues located on neighboring transmembrane helices or, as an interesting possibility, a direct interaction between them. As a consequence of this loss of intramolecular interaction, the energy difference between R* and R would be much lower for the CAM receptor than for the WT

receptor, so the ratio $[R^*_{CAM}]/[R_{CAM}]$ is likely to be much greater than $[R^*_{wt}]/[R_{wt}]$. Such an interpretation has been previously provided for a constitutively activated beta-2 adrenergic receptor through the construction of a simplified thermodynamic diagram (Gether et al., 1997a).

Besides modifications of the constant of isomerization between R and R* and the affinity of R* for the G protein, a point mutation can sometimes induce marked changes in the pharmacological properties of ligands (agonism, antagonism, inverse agonism) (Noda et al., 1996; Groblewski et al., 1997), so parameters accounting for the pattern of a given ligand (Lefkowitz et al., 1993; Kenakin, 1995) are obviously modified on mutation. This might explain the lack of important changes in EC_{50} values relative to BK-activated IP production and the affinities of [3 H]BK for the three mutants N113A, W256F, and W256Q compared with the WT receptor. In this respect, a possible loss of a direct interaction between a BK residue and Asn¹¹³ or Trp²⁵⁶ might compensate an affinity increase expected from constitutive activation (Lefkowitz et al., 1993). The construction of a reliable docking of BK into the receptor is required to answer this question.

The experimental data relative to the changes in pharmacological properties of the CAM receptors are consistent with the following assumptions: 1) the inverse agonism properties of HOE 140 and LF 16 0335 for the WT receptor indicate that these compounds preferentially stabilize (or induce) the inactive conformation R_{wt} , 2) it is difficult to accurately predict structural differences between the activated states R^*_{CAM} and R^*_{WT} and the induction processes involved in the stabilization of R*-ligand complexes. Because HOE 140 and LF 16 0335 are agonists of the CAM receptors, they are expected to preferentially stabilize R^*_{CAM} conformations versus R_{CAM} . These changes in pharmacological properties of WT and CAM receptors will be useful to explore structure-function relationships integrating the preferential recognition and/or induction of receptor conformations by the various ligands.

Conclusion

The present study reports mutations in the human bradykinin B₂ receptor that markedly increase its constitutive activity. It was initiated by previous works from our laboratory on the AT₁ receptor (Marie et al., 1994; Joseph et al., 1995; Groblewski et al., 1997; Groblewski et al., unpublished results) assuming that the extent of amino acid conservation between the two receptors offers the opportunity to study the problem of the conservation of molecular events associated to their activation processes. Interestingly, mutation of Asn¹¹¹ to Ala led to a strong constitutive activation of the AT₁ receptor and to striking changes in the pharmacological properties of some peptidic ligands (Groblewski et al., 1997). We investigated the possible role of its counterpart in the human B₂ receptor and found an exceptionally high constitutive activation on Asn¹¹³ → Ala mutation, characterized by up to 40-fold increases in hormone-independent receptor coupling to PLC and the ability of BK to overstimulate the mutated receptor. The K_d for [³H]BK binding to the N113A receptor was unchanged, which is in agreement with data obtained for the rat receptor (Jamagin et al., 1996), and the BK-induced overstimulation was characterized by a moderately increased EC₅₀ value. One must mention that these results do not preclude the possibility of a direct interaction of BK with Asn¹¹³. Indeed, compensating variations of the thermodynamic parameters describing the allosteric ternary complex model can theoretically account for these observations, as already postulated for the interaction of Asn¹¹¹ of the AT₁ receptor with the Tyr⁴ residue of the hormone (Joseph et al., 1995; Noda et al., 1996). Therefore, an essential conserved property between AT₁ and B₂ receptors is the pivotal role of the Asn residue of TM III. It is noticeable that mutation of the cysteine located at the homologous position in the alpha-1B adrenergic receptor also induces constitutive activation (Perez et al., 1996).

Because a recently refined model of the AT₁ receptor (Groblewski et al., unpublished results) suggested a possible interaction between Asn¹³¹ and Trp²⁵³, we also mutated the conserved tryptophane residue in the B₂ receptor. Mutation of Trp²⁵⁶ to

phenylalanine or glutamine induced 3- to 4-fold increases in basal IP production in transfected COS-7 cells and amplification of the response to BK without any significant perturbation of BK recognition, as previously found for the rat receptor (Jarnagin et al., 1996). It is noteworthy that this tryptophane residue is fairly conserved in the GPCR family and participates in the retinal binding pocket of rhodopsin (Nakayama and Khorana, 1990, Han et al., 1996). The present work constitutes the first report of constitutive activation induced by mutation of this residue.

It is well agreed that constitutive activation of GPCR results from an increase in receptor conformational flexibility caused by the loss of intramolecular bonds (Cohen et al., 1992; Noda et al., 1996; Scheer et al., 1996; Groblewski et al., 1997; and herein cited references). The decreased stability of constitutively activated adrenergic receptors is consistent with this interpretation (Gether et al., 1997; Samama et al., 1997). The analysis of CAM receptor properties is useful to predict some elements of the network of intramolecular interactions that stabilize the inactive receptor conformation and undergo rearrangements on activation. The striking constitutive activation of B₂ receptors mutated at the Asn¹¹³ or Trp²⁵⁶ residues allows formulation of the hypothesis that these residues directly interact in the inactive receptor conformation. Based on similar considerations, a Glu¹¹³ (TM III)-Lys²⁹⁶ (TM VII) interaction (Cohen et al., 1992) was taken into account for the building of rhodopsin models. An interaction between the B₂ receptor helices III and VI through an hydrogen bond between Asn¹¹³ and Trp²⁵⁶ would be consistent with the proximity of these helices in rhodopsin (Han et al., 1996). The assumption that this interaction might stabilize an inactive conformation is consistent with recent data indicating that movement of these helices are required for rhodopsin activation (Farrens et al., 1996; Sheikh et al., 1996) as well as data that suggested rotation of helix III (Gether et al., 1997b) and/or helix VI (Gether et al., 1997b; Javitch et al., 1997) participates in beta-2 adrenergic receptor activation. Obviously, further investigation, including application of biochemical strategies (i.e., cysteine engineering and locking of privileged conformations through

disulfide bonds), is required to unambiguously establish the relative positions of helices III and VI in a B₂ receptor model. It is noteworthy that the transmembrane helices III and VI have been demonstrated to bear residues involved in ligand recognition: role of Phe²⁵⁹ and Thr²⁶³ (TM VI) in BK binding (Nardone and Hogan, 1994; Leeb et al., 1997) and incidence of modifications in helix III on the recognition of B₂-specific ligands (agonist, BK; antagonist, NPC 17731, structurally related to HOE 140) (Fathy et al., 1998). This convergence between experiments dealing with activation and recognition processes obviously requires further refinements to improve the modeling of transmembrane helix bundle movements associated to the transition from inactive (stabilized by antagonists or inverse agonists) to active (stabilized by agonists) B₂ receptor conformations.

The dissection of the molecular events associated with mutation-induced constitutive activation (Cohen et al., 1992; Noda et al., 1996; Scheer et al., 1996; Groblewski et al., 1997) raises the issue of the structural analogy between the activated states for the WT and CAM receptors. It is assumed that agonist activation results from its better recognition of active conformation R* than inactive conformation R. As mentioned by Gether et al. (1997a) for the beta-2 adrenergic receptor, the preferential stabilization or induction by BK of the R*_{CAM} conformation versus R_{CAM} can explain its ability to overstimulate the CAM B₂ receptors, which are characterized by the release of constraints on TM III and TM VI. This process might involve the interaction of BK with helix VI (Leeb et al., 1997), resulting in appropriate positioning for improved coupling. Because modifications in TM III were shown to affect the recognition of B₂-specific ligands (Fathy et al., 1998), the question of direct interaction of BK (or other ligands) with residues in this helix is raised; as mentioned, the involvement of Asn¹¹³ cannot be ruled out. Similar considerations were taken into account in the quite recent analysis of the activation process of the m₅ muscarinic receptor (Spalding et al., 1998). The comparison of the properties of WT and CAM receptors allows progression toward the understanding of the selection and/or induction processes (Kenakin, 1996) of the various receptor conformations by

different ligands. An interesting starting point for these investigations should be provided by the striking differences in the pharmacological properties of the receptors constitutively activated on mutation of Asn¹¹³ or Trp²⁵⁶. Although the HOE 140 peptidic compound behaves as an inverse agonist of the WT receptor, it becomes a potent and efficient agonist of the N113A and W256F CAM receptors. Similar properties were found for an original nonpeptidic compound, LF 16 0335. Very few examples of mutation-induced changes in GPCR pharmacological properties have been previously reported; they refer to adrenergic (Strader et al., 1989), opioid (Claude et al., 1996), or dopaminergic (Cho et al., 1996) receptors, and it is noteworthy that the pharmacological changes observed in the latter example are obtained through a constitutive activating mutation of a leucine residue neighboring the conserved tryptophane in TM VI. To our knowledge, the present work represents the first example of parallel changes shared by peptidic and nonpeptidic derivatives; moreover, these changes are observed for two receptors mutated at key residues. Future modeling studies will aim at reaching an understanding of the structural basis for the preferential recognition and/or induction by these compounds of the R_{wt} conformation versus R^*_{wt} whereas they better stabilize or induce R^*_{CAM} than R_{CAM} . The related questions involve the extent of structural analogy between R^*_{wt} and R^*_{CAM} and the precise nature of the molecular events that are shared by the mutation-induced constitutive activations and agonist stimulation of the WT receptor. An essential issue is the precise positioning of transmembrane helices, especially helices III and VI, in these various conformations in the presence or absence of ligands. These structure-function relationship studies will benefit from the availability of many molecules structurally related to the HOE 140 and LF 16 0335 lead compounds.

Finally, the B₂ receptor, which displays an extreme conformational flexibility on mutation of its Asn¹¹³ residue and spectacular changes in pharmacological properties on mutation of Asn¹¹³ and Trp²⁵⁶, constitutes an example of choice for the future study of the dynamic aspect of interconversion between active and inactive conformations. The concomitant analysis of the B₂ and AT₁ receptors offers the opportunity to compare the

activation processes of a subclass of peptide hormone receptors with those of rhodopsin or adrenergic receptors.

References

AbdAlla S, Jarnagin K, Muller-Esteri W and Quitterer U (1996) The N-terminal amino group of Tyr⁸-bradykinin is bound adjacent to analogous amino acids of the human and rat B₂ receptor. *J Biol Chem* 271:27382-27387.

Bihoreau C, Monnot C, Davies E, Teusch B, Bernstein KE, Corvol P and Clauser E (1993) Mutation of Asp74 of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist binding affinities and abolishes G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5133-5137.

Ceresa BP and Limbird LE (1994) Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein coupled receptors results in nonreciprocal disruption of ay adrenergic receptor-G-protein interaction. *J Biol Chem* 269:29557-29564

Claude PA, Wotta DR, Zhang XH, Prather PL, McGinn TM, Erickson U, Loh HH and Law PY (1996) Mutation of a conserved serine in TM4 of opioid receptors confers full agonistic properties to classical antagonists. *Proc Nati Acad Sci USA* 93:5715-5719.

Cho W, Taylor LP and Akil H (1996) Mutagenesis of residues adjacent to transmembrane prolines alters Di dopamine receptor binding and signal transduction *MolPharmacol* 50:1338-1345.

Cohen GB, Oprian DD and .Robinson PR (1992) Mechanism of activation and inactivation of opsin: Role of Glu¹¹³ and Lys²⁹⁶. *Biochemistry* 31:12592-12601.

Dray A and Perkins M (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 16:99-104

Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL and Khorana HG (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274:768-770.

Pathy DB, Mathis SA, Leeb T and Leeb-Lundberg LMF (1998) A single position in the third transmembrane domains of the B₁, and B₂ bradykinin receptors is adjacent to and discriminates between the C-terminal residues of subtype selective ligands. *J Biol Chem* 273:12210-12218.

Gether U, Ballesteros J. A, Seifert R, Sanders-Bush E, Weinstein H and Kobilka BK (1997a) Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor *J Biol Chem* 272:2587-2590.

Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H and Kobilka BK (1997b) Agonist induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the β_2 adrenoceptor. *EMBO J* 16:6737-6747.

Groblewski T, Maigret B, Larguier R, Lombard C, Bonnafous J-C and Marie J (1997) Mutation of Asn¹¹¹ in the third transmembrane domain of the AT₁ angiotensin II receptor induces its constitutive activation. *J Biol Chem* 272:1822-1826

Han M, Lin SW, Minkova M, Smith SO and Sakmar TP (1996) Functional interaction of transmembrane helices 3 and 6 in rhodopsin. *J Biol Chem* 271:32337-32342.

Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD and Ransom RW (1992) Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (bradykinin-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184:260-268.

- Jamagin K, Bhakta S, Zuppan P, Yee C, Ho T, Phan T, Tahilramani R, Pease JHB
Miller A and Freedman R (1996) Mutations in the B₂ bradykinin receptor reveal a different pattern of contacts for peptidic agonists and peptidic antagonists *J Biol Chem* 271:28277-28286.
- Javitch JA, Fu D, Liapakis G and Chen J (1997) Constitutive activation of the β_2 adrenergic receptor alters the orientation of its sixth membrane-spanning segment. *J Biol Chem* 272:18546-18549.
- Joseph MP, Maigret B, Bonnafous JC, Marie J and Scheraga HA (1995) A computer modeling postulated mechanism for angiotensin II receptor activation *J Prot Chem* 14:381-398.
- Kenakin T (1995) Pharmacological Proteus? *Trends Pharmacol Sci* 16:256-258.
- Kenakin T (1996) Receptor conformational induction versus selection: ³H part of the same energy landscape. *Trends Pharmacol Sci* 17:190-191.
- Kong H, Raynor K, Yasuda K, Bell GI and Reisine T (1993) Mutation of an aspartate at residue 89 in somatostatin receptor subtype 2 prevents Na⁺ regulation of agonist binding but does not alter receptor-G protein association. *Mol Pharmacol* 44:380-384.
- Kyle DJ, Chakravarty S, Sinsko JA and Stormann TM (1994) A proposed model of bradykinin bound to the rat B₂ receptor and its utility for drug design *J Med Chem* 37:1347-1354.
- Leeb T, Mathis SA and Leeb-Lundberg LMF (1997) The sixth transmembrane domain of the human B₁ and B₂ bradykinin receptors are structurally compatible and involved in discriminating between subtype-selective agonists. *J Biol Chem* 272:311-317.

Leeb-Lundberg LMF, Mathis SA and Herzig MCS (1994) Antagonists of bradykinin that stabilize a G-protein-uncoupled state of the B₂ receptor act as inverse agonists in rat myometrial cells. *J Biol Chem* 269:25970-25973.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P and Costa T (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14:303-307.

Marie J, Maigret B, Joseph M-P, Larguier R, Nouet S, Lombard C and Bonnafous J-C (1994) Tyr²⁹² in the seventh transmembrane domain of the AT₁ angiotensin II receptor is essential for its coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 269:20815-20818.

Nakayama TA and Khorana HG (1990) Orientation of retinal in bovine rhodopsin determined by cross-linking using a photoactivatable analog of 11-cis-retinal. *J Biol Chem* 265:15762-15769.

Nardone J and Hogan PJ (1994) Delineation of a region in the B₂ bradykinin receptor that is essential for high affinity agonist binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4417-4421.

Noda K, Feng Y-H, Liu XP, Saad Y, Husain A and Karnik SS (1996) The active state of the AT₁ angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry* 35:16435-16442.

Paquet JL, Baudouin-Legros M, Brunelle G and Meyer P (1990) Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 8:565-572.

Perez DM, Hwa J, Gaivin R, Mathur M, Brown F and Graham RM (1996) Constitutive activation of a single effector pathway: Evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol* 49:112-122.

Proud D and Kaplan AP (1988) Kinin formation: Mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol* 6:49-83.

Pruneau D, Luccarini J-M, Fouchet C, Defrene E, Franck R-M, Loilier B, Duclos H, Robert C, Cremers B, Belichard P and Paquet J-L (1998) LF 16 0335: A novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human bradykinin B₂ receptor *Br J Pharmacol* 125:365-372.

Quitterer U, AbdAlla S, Jamagin K and Muller-Esterl W (1996) Na⁺ ions binding to the bradykinin B₂ receptor suppress agonist-independent receptor activation *Biochemistry* 35:13368-13377.

Regoli D and Barabe J (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins *Pharmacol Rev* 32:1-46.

Samama P, Bond RA, Rockman HA, Milano CA and Lefkowitz RJ (1997) Ligand-induced overexpression of a constitutively active β_2 -adrenergic receptor: Pharmacological creation of a phenotype in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:137-141.

Scheer A, Fanelli F, Costa T, De Benedetti PG and Cotecchia S (1996) Constitutively active mutants of the α_{1b} -adrenergic receptor: Role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J* 15:3566-3578.

Sheikh S, Zvyaga T, Lichtarge O, Sakmar T and Bourne H (1996) Rhodopsin activation blocked by metal-ion binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* 383:347-350.

Spalding TA, Burstein ES, Henderson SC, Ducote KR and Brann MR (1998) Identification of a ligand-dependent switch within a muscarinic receptor. *J Biol Chem* 273:21563-21568.

Strader C, Candelore MR, Hill WS, Dixon RAF and Sigal IS (1989) A single amino-acid substitution in the β_2 -adrenergic receptor promotes partial agonist activity from antagonists. *J Biol Chem* 264:16470-16477.

Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W, Knolle J and Scholkens BA (1991) Hoe 140: A new potent and long acting bradykinin antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol* 102:774-777.

Tables and figures

B ₂ Receptor c-myc Tagged	K _d [³ H]BK			
	Intact Cells	Membrane		
		No Pretreatment	Na ⁺ Pretreatment	Na ⁺ + GTPγS Pretreatment
WT	0.54 ± 0.17	0.47 ± 0.17 B _{max} = 0.49 pmol/mg	2.2 ± 0.45 B _{max} = 0.39 pmol/mg	3.7 ± 0.7 B _{max} = 0.38 pmol/mg
N113A	0.67 ± 0.22	0.21 ± 0.11 B _{max} = 1.1 pmol/mg	0.28 ± 0.15 B _{max} = 1.0 pmol/mg	0.27 ± 0.07 B _{max} = 1.1 pmol/mg
D76N	0.83 ± 0.30	0.51 ± 0.15 B _{max} = 1.0 pmol/mg	2.5 ± 0.4 B _{max} = 0.81 pmol/mg	N.D. ^a
W256F	0.52 ± 0.18	N.D.	N.D.	N.D.
W256Q	0.41 ± 0.15	N.D.	N.D.	N.D.
Y295F	0.31 ± 0.13	N.D.	N.D.	N.D.

^a N.D., not determined.

Table1: Bk binding properties of the WT and mutant B₂ receptors The parameters of [³H]BK binding to intact COS-7 cells expressing comparable levels of the WT or mutant receptors, or to membrane preparations from these cells, were carried out as described in materials and methods. The reported k_d values are the mean ± S. D. of three independent experiments, carried out with triplicate assays. The B_{max} values are those of a typical experiment involving comparison of WT and the mutant receptors expressed at similar levels.

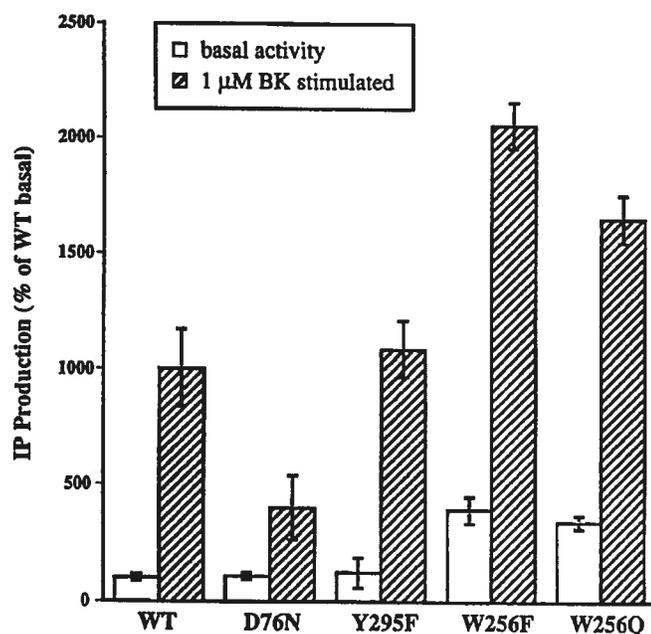


Fig. 1. Basal and BK-stimulated IP production activities of mutant B₂ receptors D76N, Y295F, W256F, and W256Q. Basal and 1 μM BK-stimulated IP production activities were measured, as described under Materials and Methods, in COS-7 cells expressing the WT and the various mutant B₂ receptors at comparable expression levels for the comparison, inside the same experiment, of the WT receptor and a given mutant. The WT, W256F, and W256Q receptors were analyzed in the same experiment. The figure represent typical experiments performed in triplicate that are representative of three or more independent experiments relative to each WT/mutant comparison. The expression levels, determined through [³H]BK binding, were all in the range of 1.7×10^5 to 2.3×10^5 sites/cell.

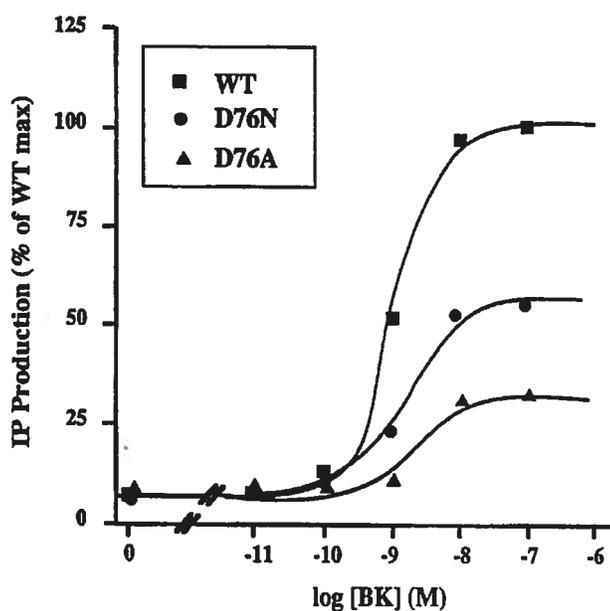


Fig. 2. Dose-dependent BK stimulation of the WT, D76N, and D76A mutant B₂ receptors. The WT and D76N receptors were transiently expressed at comparable levels (1.05×10^5 and 1.22×10^5 sites/cell, respectively) in COS-7 cells. The stimulation of IP production by varying doses of BK was evaluated as described in Materials and Methods. The EC₅₀ values were 1.5, 1.6, and 2.5 nM for the WT, D76N, and D76A receptors, respectively, and the maximal BK stimulations of the mutant receptors represented 53% and 25% of that WT receptor. The reported typical experiment is representative of three independent comparative experiments performed in triplicate (mean \pm S.D. EC₅₀ values = 1.2 ± 0.3 , 1.5 ± 0.6 , and 2.9 ± 0.9 nM for the WT, D76N, and D76A receptors, respectively; maximal BK stimulations of the asparagine and alanine mutant receptors represented $55 \pm 2\%$ and $31 \pm 6\%$ of that of the WT receptors)

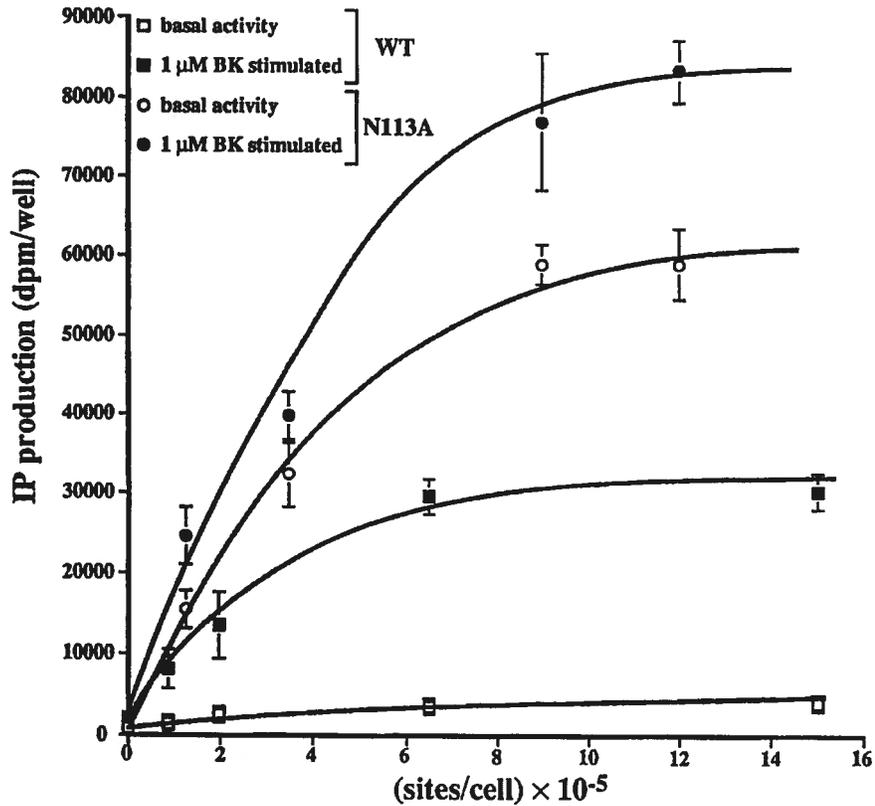


Fig. 3. Constitutive activation of the N113A mutant human B₂ receptor and amplification of its response to BK. Basal and 1 μM BK-stimulated inositol phosphate production were measured in triplicate in COS-7 cells expressing variable levels of WT and N113A mutant B₂ receptors as described in Materials and Methods. Mean expression levels in the range 10⁵ to 1.5 X 10⁶ sites/cell obtained for variable amounts of specific cDNAs/ 10⁷ electroporated cells were measured through the binding of [³H]BK. The typical experiment described in the figure is representative of 12 independent experiments.

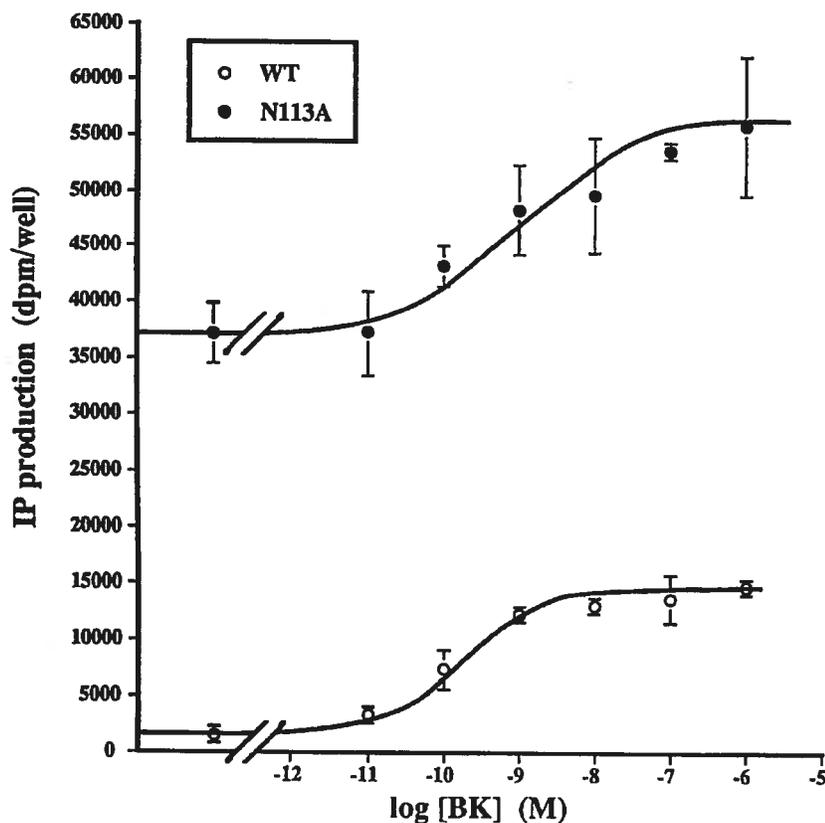


Fig. 4. Dose-dependent BK stimulation of IP production for the WT and N113A B_2 receptors. The stimulation of IP production by various concentrations of BK was analyzed in COS-7 cells expressing the WT or N113A mutant receptors (expression levels = 1.75×10^5 and 2.0×10^5 sites/cell, respectively) as described in Materials and Methods. The EC_{50} values in the described typical experiment were 0.19 and 0.86 nM for the WT and N113A receptors, respectively. The curves are representative of three independent experiments (mean EC_{50} values = 0.52 ± 0.35 and 1.2 ± 0.5 nM for the WT and mutant receptor, respectively).

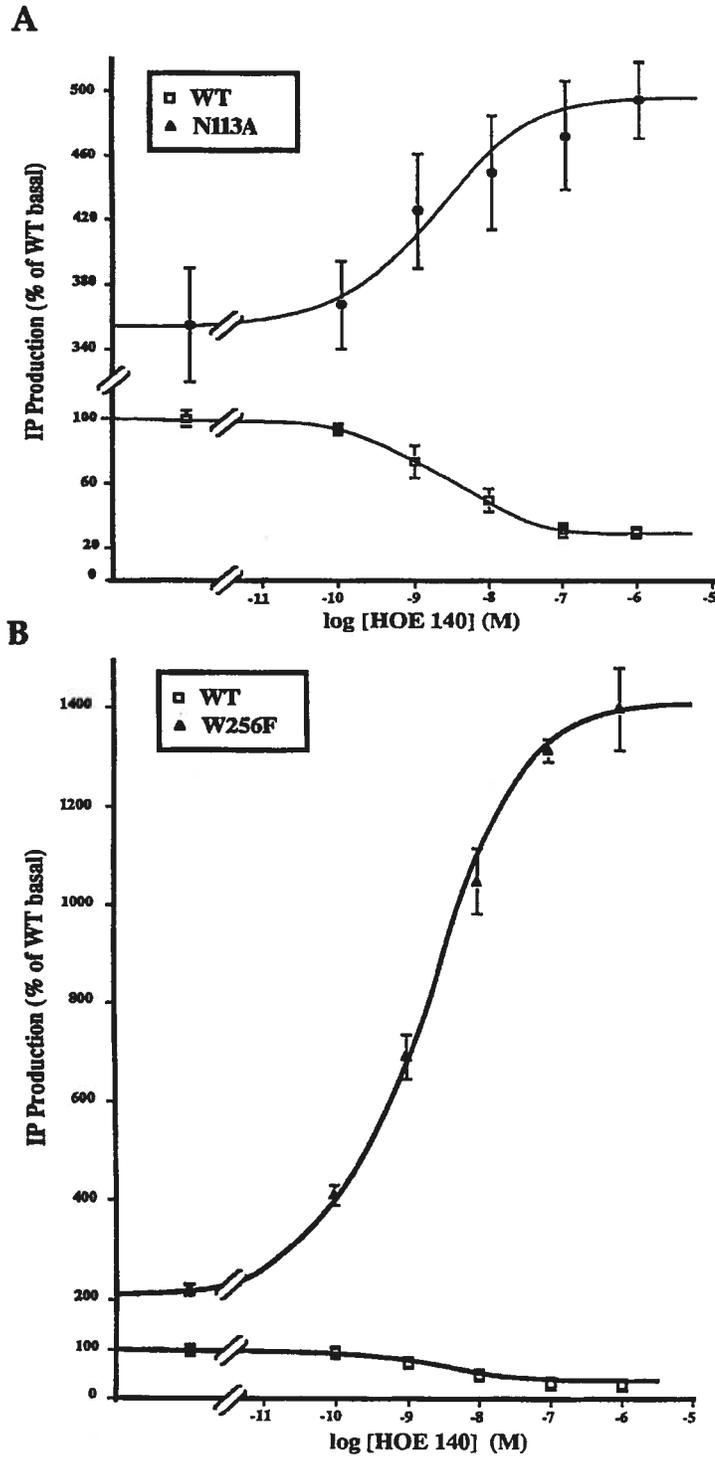


Fig.5.

Fig. 5. Modification of the pharmacological properties of HOE 140 on Asn¹¹³ and Trp²⁵⁶ mutation in the human B₂ receptor. The effect of varying doses of HOE 140 on IP production was evaluated on the WT, N113A, and W256F mutant B₂ receptors transiently expressed in COS-7 cells as described in Materials and Methods. The data represent a typical experiment with triplicate assays and characterized by high basal IP production for the WT receptor (see explanations in Results and Discussion). A, comparison of the WT and N113A receptor properties: the mean expression levels in the described typical experiment, measured through [³H]BK binding, were 1.2 X 10⁵ and 9.6 X 10⁴ sites/cell for the WT and the N113A mutant receptors, respectively. HOE 140 inverse agonism for the WT receptor and agonism for the N113A receptor were characterized by EC₅₀ values of 2.4 and 2.3 nM, respectively (mean ± S.D. value for three separate experiments = 2.3 ± 0.8 and 2.7 ± 0.5 nM for the WT and N113A receptors, respectively). The maximal overstimulation of the mutant receptor by HOE 140 was 88% of the effect of 1 μM BK measured in the same experiment (mean value, 85 ± 11%). The control IP production in nontransfected COS-7 cells represented 18% of the basal IP production by the WT receptor. B, comparison of the WT and W256F receptor properties: the mean expression levels in the described typical experiment measured through [³H]BK binding were 3.0 X 10⁵ and 3.2 X 10⁵ sites/cell for the WT and the W256F mutant receptors, respectively. HOE 140 agonism for the W256F receptor was characterized by an EC₅₀ value of 2.3 nM (mean ± S.D. value for three separate experiments = 2.8 ± 0.7 nM). The maximal overstimulation of the mutant receptor by HOE 140 was 75% of that induced by 1 μM BK measured in the same experiment (mean value, 72 ± 13%).

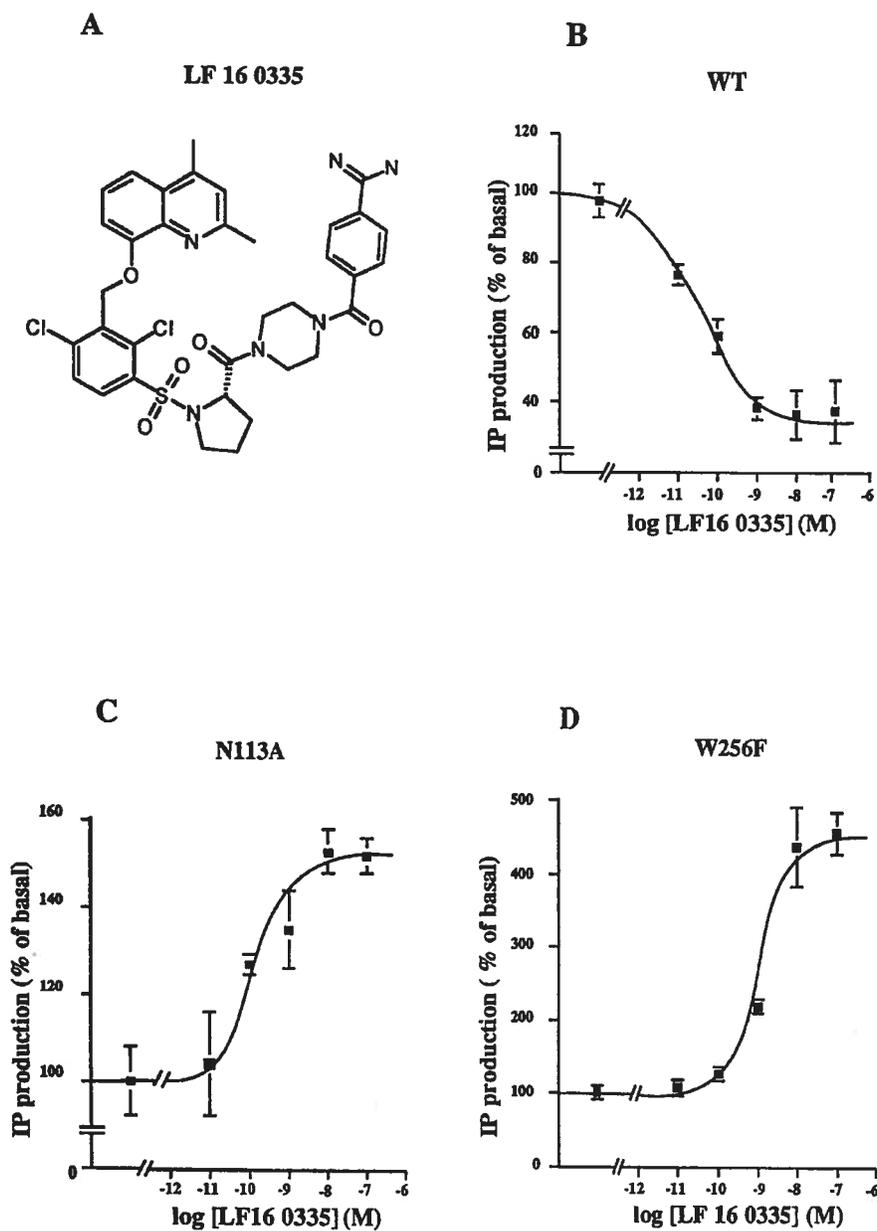
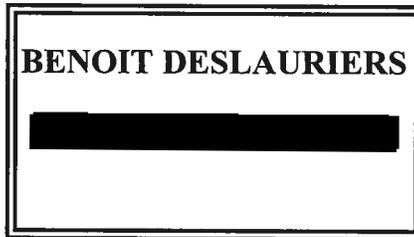


Fig. 6. Pharmacological properties of the nonpeptide LF 16 0335 toward the WT and CAM receptors. The effect of varying doses of LF 16 0335 on IP production was evaluated on the WT, N113A, and W256F mutant B_2 receptors transiently expressed in COS-7 cells as described in Materials and Methods. The IP production data correspond to a typical experiment and are representative of three separate experiments performed using triplicate

assays. A, chemical structure of the nonpeptidic compound LF 16 0335. B, inverse agonist property of LF 160335 for the WT receptor (4.0×10^5 sites/cell) evidenced in a typical experiment on transfected cells displaying high basal IP production. C and D, agonist properties of LF 160335 for the CAM receptors N113A (3.8×10^5 sites/cell) and W256F (6.2×10^5 sites/cell): the maximal non-peptide-induced stimulations in the reported typical experiment were 98% and 76% of the BK-induced maximal stimulation, and the EC_{50} values were about 0.1 and 1.8 nM, respectively. The mean \pm S.D. values for three separate experiments were $EC_{50} = 0.26 \pm 0.11$ nM and intrinsic activity = $95 \pm 6\%$ for the N113A mutant and $EC_{50} = 1.6 \pm 0.2$ nM and intrinsic activity = $74 \pm 12\%$ for the W256F mutant.



ÉTUDES UNIVERSITAIRES

Octobre 2002
à aujourd'hui

Président et cofondateur de la compagnie Biogenix inc.

Janvier 1997
à décembre 2003

Doctorat en sciences biomédicales

Faculté de médecine, Département de sciences biomédicales
Université de Montréal

Projet: Étude des gènes candidats reliés à l'hypertension artérielle et l'obésité dans une population hypertendue du Saguenay-Lac-St-Jean.

Directeur de recherche: Dr Pavel Hamet

Directeur de la recherche au CHUM, Directeur du laboratoire de médecine moléculaire, Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal, Pavillon Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2W 1T8
Tél :(514) 890-8044

Techniques: Extraction d'ADN, détection de polymorphismes, PCR (polymerase chaine reaction), séquençage, marquage radioactif d'oligonucléotides, analyse génétique à l'aide des logiciels: S.A.G.E., TRANSMIT, GENEHUNTER. Utilisation des bases de données génétiques sur l'internet tel que genbank, blast, NCBI.

Janvier 1997 **Passage direct au doctorat**
Faculté de médecine, département de sciences biomédicales
Université de Montréal

Juin 1995 **Maîtrise en science biomédicales**
à janvier 1997 Faculté de médecine, Département de sciences biomédicales
Université de Montréal

Projet: **Mise au point d'un protocole de purification et étude des sites de glycosylation du récepteur AT₁ de l'angiotensine II**

Directeur de recherche: **Dr Pavel Hamet**
Directeur de la recherche au CHUM, Directeur du laboratoire de médecine moléculaire, Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal, Pavillon Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2W 1T8
Tél : (514) 890-8044

Codirecteur: **Dr Jacky Marie**
INSERM Unité 439, 70 rue de Navacelles, 34090 Montpellier,
France Tél: 04-67-04-37-35

Tous les travaux de maîtrise ont été effectués dans les laboratoires du Dr Jacky Marie à Montpellier, France.

Techniques: Immunohistochimie, PCR, mutagenèse dirigée, sous-clônage, culture cellulaire, construction de récepteurs avec épitope, transfection par électroporation, liaison avec des agents pharmacologiques sur cellules entières, séquençage, immunobuvardage de type western, photomarquage, utilisation de modèles moléculaires du récepteur AT₁ de l'angiotensine II sur console silicone graphic.

Septembre 1991
à mai 1994

Baccalauréat en biochimie

Département de chimie et de biochimie,
Secteur des sciences,
Université du Québec à Montréal.

EXPÉRIENCE DE TRAVAIL_____

De mai 1994 à mai 1995 Poursuite du projet d'été: **Étude du mécanisme de régulation du récepteur A de l'ANP**

De mai 1993
à septembre 1993

Projet d'été: **Étude du mécanisme de régulation du récepteur A de l'ANP**

Directrice:

Dr Johanne Tremblay, Laboratoire de biologie cellulaire de l'hypertension au centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Montréal, 3850 rue St-Urbain, Pavillon Marie-de-la-Ferre, Montréal, Québec, Canada, H2W 1T8 Tél : (514) 843-2721.

**Techniques
biochimiques:**

Étude de liaison de la guanylate cyclase à l'aide d'ATP γ ³².

Utilisation d'un système d'expression de protéines chez E.coli.
Électrophorèse, immunobuvardage et dosage de protéines.

**Techniques de biologie
moléculaire:**

Extraction de l'ADN, gel d'agarose, digestion à l'aide des enzymes de restriction, ligation de plasmide, transformation.

PUBLICATIONS

Benoit Deslauriers, Cécilia Ponce, Colette Lombard, Renée Larguier, Jean-Claude Bonnafous, Jacky Marie. **N-glycosylation requirements for the AT_{1a} angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane.** Biochem. J., 339, 397-405, 1999.

Jacky Marie, Caroline Koch, Didier Pruneau, Jean-Luc Paquet, Thierry Groblewski, Renée Larguier, Colette Lombard, Benoit Deslauriers, Bernard Maigret, Jean-Claude Bonnafous.

Constitutive activation of the human bradykinin B₂ receptor induced by mutations in transmembrane helices III and VI. *Molecular pharmacology*, 1, 92-101, 1999.

Zdenka Pausova, Benoit Deslauriers, Daniel Gaudet, Johanne Tremblay, Theodore A. Kotchen, Pierre Larochelle, Allen W. Cowley, Pavel Hamet. **Role of tumor necrosis factor-alpha gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians.** *Hypertension*, 36, 14-19, 2000.

COMMUNICATIONS

Deslauriers B, Antoniol G, Merlo E, Gossard F, Pausova Z, Larochelle P, Gaudet D, Tremblay G, Tremblay J, Kotchen T, Cowley A, Hamet P. DYNAMIC LINKAGE OF THE ANGIOTENSIN II TYPE I RECEPTOR GENE LOCUS IN ESSENTIAL HYPERTENSION: A STUDY OF HYPERTENSIVE FAMILIES OF FRENCH CANADIAN ORIGIN. **American Society of Hypertension, New York, USA, mai 2003.**

Faldik K, Deslauriers B, Pausova Z, Gaudet D, Tremblay G, Kotchen T, Hamet P, Tremblay J. EFFET DU POLYMORPHISME I/D DU GÈNE ACE SUR LES TRAITS LIÉS À L'HYPERTENSION CHEZ LES FAMILLES CANADIENNES-FRANÇAISES. **Congrès des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de médecine, du CHUM et des centres hospitaliers et instituts, Montréal, Canada, janvier 2003.**

Deslauriers B, Antoniol G, Merlo E, Gossard F, Pausova Z, Larochelle P, Gaudet D, Tremblay G, Tremblay J, Kotchen T, Cowley A, Hamet P. LIAISON DYNAMIQUE DU GÈNE DU RÉCEPTEUR AT₁ DE L'ANGIOTENSINE II DANS DES FAMILLES HYPERTENDUES D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Congrès des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de médecine, du CHUM et des centres hospitaliers et instituts, Montréal, Canada, janvier 2003.**

Deslauriers B, Antoniol G, Merlo E, Gossard F, Pausova Z, Larochelle P, Gaudet D, Tremblay G, Tremblay J, Kotchen T, Cowley A, Hamet P. LIAISON DYNAMIQUE DU GÈNE DU RÉCEPTEUR AT₁ DE L'ANGIOTENSINE II DANS DES FAMILLES HYPERTENDUES D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Club de recherche clinique du Québec (CRCQ), St-Sauveur, Canada, septembre 2002.**

Faldik K, Deslauriers B, Pausova Z, Gaudet D, Tremblay G, Kotchen T, Hamet P, Tremblay J. EFFET DU POLYMORPHISME I/D DU GÈNE ACE SUR LES TRAITS LIÉS À L'HYPERTENSION CHEZ LES FAMILLES CANADIENNES-FRANÇAISES. **Club de recherche clinique du Québec (CRCQ), St-Sauveur, Canada, septembre 2002.**

Deslauriers B, Antoniol G, Merlo E, Gossard F, Pausova Z, Larochelle P, Gaudet D, Tremblay G, Tremblay J, Kotchen T, Cowley A, Hamet P. DYNAMIC LINKAGE OF THE ANGIOTENSIN II TYPE I RECEPTOR GENE LOCUS IN ESSENTIAL HYPERTENSION: A STUDY OF HYPERTENSIVE FAMILIES OF FRENCH CANADIAN ORIGIN. **Congrès conjoint de la société internationale d'hypertension artérielle et de la société européenne d'hypertension artérielle, Prague, République Tchèque, juin 2002.**

Merlo E., Deslauriers B., Antoniol G., Pausova Z., Jomphe M., Gossard F., Gaudet D., Tremblay J., Cowley A., Bouchard G., Hamet P. LAYERED FOUNDERS ANALYSIS TO INVESTIGATE ANCESTRAL GENETIC TRANSMISSION OF HYPERTENSION AND OBESITY IN SAGUENAY (QUEBEC) POPULATION. **Congrès satellite de la société internationale d'hypertension artérielle, Brno, République Tchèque, juin 2002**

Benoit Deslauriers, Giuliano Antoniol, Ettore Merlo, Francis Gossard, Zdenka Pausova, Pierre Larochelle, Daniel Gaudet, Gérald Tremblay, Johanne Tremblay, Theodore Kotchen, Allen Cowley, Pavel Hamet. LIAISON DYNAMIQUE DU GÈNE DU RÉCEPTEUR AT₁ DE L'ANGIOTENSINE II DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'HYPERTENSION ESSENTIELLE CHEZ DES FAMILLES HYPERTENDUES D'ORIGINE

CANADIENNE-FRANÇAISE. **Société québécoise d'hypertension artérielle, Montréal, Canada, janvier 2002.**

Benoit Deslauriers, Giuliano Antoniol, Ettore Merlo, Francis Gossard, Zdenka Pausova, Pierre Larochelle, Daniel Gaudet, Gérald Tremblay, Johanne Tremblay, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pavel Hamet. LIAISON DYNAMIQUE DU GÈNE DU RÉCEPTEUR AT₁ DE L'ANGIOTENSINE II DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'HYPERTENSION ESSENTIELLE CHEZ DES FAMILLES HYPERTENDUES D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Congrès annuel du CHUM, Montréal, Canada, décembre 2001.**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. CONTRIBUTION OF THE LEPTIN GENE IN THE DEVELOPMENT OF OBESITY IN HYPERTENSIVE FRENCH CANADIANS. **American Heart Association, Scientific Session 2001, Anaheim, USA, novembre 2001.**

Benoit Deslauriers, Giuliano Antoniol, Ettore Merlo, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. A ROLE OF THE ANGIOTENSIN II TYPE 1 RECEPTOR GENE LOCUS IN ESSENTIAL HYPERTENSION: A STUDY OF HYPERTENSIVE FAMILIES OF FRENCH CANADIAN ORIGIN. **Canadian Cardiovascular Congress 2001, Halifax, Canada, octobre 2001.**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. CONTRIBUTION DU GÈNE DE LA LEPTINE DANS LA DISTRIBUTION DE L'ADIPOSITÉ CHEZ DES HYPERTENDUS D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Club de recherche clinique du Québec, Québec, Canada, septembre 2001.**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. CONTRIBUTION OF THE LEPTIN GENE IN THE DEVELOPMENT OF OBESITY IN HYPERTENSIVE FRENCH CANADIAN. **XVII World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR), Winnipeg, Canada, juillet 2001.**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Francis Gossard, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. A ROLE OF THE ANGIOTENSIN II TYPE I RECEPTOR GENE LOCUS IN ESSENTIAL HYPERTENSION: A STUDY OF HYPERTENSIVE FAMILIES OF FRENCH CANADIAN ORIGIN. **European Society of Hypertension (ESH), Milan, Italie, juin 2001. Journal of Hypertension 19 (Suppl. 2), June 2001, page S84**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. CONTRIBUTION DU GÈNE DE LA LEPTINE DANS LA DISTRIBUTION DE L'ADIPOSITÉ CHEZ DES HYPERTENDUS D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Société québécoise d'hypertension artérielle, Québec, Canada, janvier 2001.**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. IMPLICATION DU GÈNE DU RÉCEPTEUR AT₁ DE L'ANGIOTENSINE II DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'HYPERTENSION ESSENTIELLE ET L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE CHEZ DES FAMILLES HYPERTENDUES D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Congrès annuel du centre de recherche du CHUM, Montréal, Canada, décembre 2000.**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. CONTRIBUTION DU GÈNE DE LA LEPTINE DANS LA DISTRIBUTION DE L'ADIPOSITÉ CHEZ DES HYPERTENDUS D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Congrès de l'Institut**

interuniversitaire de recherche sur les populations (IREP), Montréal, Canada, mai 2000.

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. CONTRIBUTION DU GÈNE DE TNF-ALPHA DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'OBÉSITÉ CHEZ LES HYPERTENDUS D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Congrès annuel du centre de recherche du CHUM, Montréal, Canada, décembre 1999.**

Benoit Deslauriers, Zdenka Pausova, Daniel Gaudet, Theodore A. Kotchen, Allen W. Cowley, Pierre Larochelle, Johanne Tremblay, Pavel Hamet. CONTRIBUTION DU GÈNE DE TNF-ALPHA DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'OBÉSITÉ CHEZ LES HYPERTENDUS D'ORIGINE CANADIENNE-FRANÇAISE. **Société québécoise d'hypertension artérielle, Québec, Canada, janvier 1999**

EXPÉRIENCES PERSONNELLES _____

Novembre 2002 : récipiendaire du deuxième prix du concours d'entrepreneurship « de l'idée au projet 2002 » du centre d'entrepreneurship des Hautes Études Commerciales, de l'École polytechnique de Montréal et de l'Université de Montréal.

Novembre 2001- juin 2002 : conférencier pour l'opération relève technoscience, qui consiste à faire une tournée de promotion sur la carrière de chercheur en sciences biomédicales, auprès des écoles secondaires et des CEGEPS.

Lors du XVII congrès mondial "International Society for Heart Research" qui avait lieu à Winnipeg du 6 au 11 juillet 2001. J'ai reçu une mention d'honneur pour la présentation de mes plus récents travaux ayant pour titre: **Contribution of the leptin gene in the development of obesity in hypertensive French Canadians.**

Lors du congrès « American Heart Association, Scientific Session 2001 », qui avait lieu à Anaheim, États-Unis, en novembre 2001, mes plus récents travaux, sur l'implication du gène de la leptine dans le développement de l'obésité chez une population hypertendue d'origine canadienne-française ont été retenus par le correspondant Lawrence M. Prescott et ont été publiés dans « The Chronicle of Cardiovascular & Internal Medicine », février 2002 p.6.

