

Université de Montréal

Analyse d'un locus pour trait quantitatif pour
l'hypertension sur le chromosome 10 du rat Dahl

par
Zsuzsa Sivo

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

décembre 2002

© Zsuzsa Sivo, 2002



QH
506
U54
2003
v.016

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

Ce mémoire intitulé :
Analyse d'un locus pour trait quantitatif pour
l'hypertension sur le chromosome 10 du rat Dahl

Présenté par :
Zsuzsa Sivo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Christian Deschepper
Président-rapporteur

Dr. Alan Y. Deng
Directeur de recherches

Dr. Edward Bradley
Membre du jury

RÉSUMÉ FRANÇAIS

L'hypertension artérielle est un désordre physiologique fréquent dans les pays industrialisés, et à incidence croissante dans les pays en voie de développement. L'hypertension peut être causée par des facteurs environnementaux, mais elle est souvent de source génétique.

Nous utilisons un modèle animal, le rat, pour trouver les causes génétiques de l'hypertension. Cette étude tente de localiser et d'identifier des loci pour trait quantitatif (QTL) pour l'hypertension sur le chromosome 10 chez des lignées de rats congéniques entre le rat hypertendu Dahl salt-sensitive (S) et le rat normotendu Lewis (LEW). Cette étude révélera potentiellement des facteurs impliqués dans l'hypertension essentielle humaine.

Par l'analyse de la pression artérielle (PA) et d'autres paramètres physiologiques des lignées congéniques nommées S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4, deux QTL individuels pour la pression artérielle ont été localisés sur le chromosome 10 du rat. Le QTL 1 était de 4,2 cM et le QTL2 était de moins de 12,1 cM. Afin de raffiner la région des QTL, quatre autres lignées congéniques ont été construites, nommées S.L6, S.L8, S.L9 et S.L10. Ces lignées ont permis de réduire la longueur du QTL 1 à 1,4 cM et celle du QTL 2 à moins de 8,5 cM. La région du QTL 1 était assez restreinte pour entamer son analyse moléculaire. Celle-ci consiste en la construction d'une carte physique et de transcription de la région, afin d'y localiser des gènes candidats.

Une étude d'expression génique a débuté, mais il faudra une analyse moléculaire plus poussée des résultats afin d'en tirer des conclusions.

MOTS CLÉS :

Hypertension essentielle; rat Dahl salt-sensitive; locus pour trait quantitatif; modèle animal; rat congénique; facteur génétique; chromosome 10

RÉSUMÉ ANGLAIS

ABSTRACT

Hypertension is a common physiological disorder in industrialized countries, and its incidence is growing in developing countries. High blood pressure can be caused by various environmental factors, yet it often has a genetic etiology.

We use the rat animal model to find the genetic causes of hypertension. In this study, we localize and work toward the identification of quantitative trait loci (QTL) for hypertension on chromosome (chr.) 10 of congenic rats between the hypertensive Dahl salt-sensitive strain (S) and the Lewis normotensive strain (LEW). This study is potentially relevant to human essential hypertension.

Two individual QTL on chr.10 were localized by the congenic strains S.L1, S.L2, S.L3 and S.L4, through the analysis of their blood pressure (BP) and other physiological parameters related to hypertension. QTL 1 spanned an area of 4,2 cM while QTL 2 covered less than 12,2 cM. In order to further refine the regions covered by these QTL, four (4) more congenic strains were constructed, named S.L6, S.L8, S.L9 and S.L10. With the BP data collected from these strains, the QTL 1 region was reduced to less than 1,4 cM, and the QTL 2 region to less than 8,5 cM. The QTL 1 region was narrow enough to initiate molecular analysis. This consisted of the elaboration of a physical and a transcription map, in order to localize candidate genes in the region.

An expression profiling study began, but further molecular analysis will be necessary in order to conclude on the results.

KEY WORDS:

Essential hypertension; Dahl salt-sensitive rat; quantitative trait locus; animal model; congenic rat; genetic factors; chromosome 10

REMERCIEMENTS ET DÉDICACE

Il y a plusieurs personnes que j'aimerais remercier, mais je vais tâcher de ne pas devenir comme une gagnante à la soirée des Oscars... Ainsi, je remercie les gens qui ont eu un impact particulier dans cet aspect de ma vie : mes parents, qui m'ont toujours appuyé à travers mes études, dans tous les sens du mot appui.

J'aimerais remercier mon directeur de recherches, Dr Alan Deng, pour m'avoir accepté au sein de sa jeune équipe, et qui a su me montrer plusieurs aspects de la recherche fondamentale de façon réaliste, bien au-delà de la science. Merci de me supporter dans la participation à plusieurs congrès qui m'ont beaucoup éduqués. J'aimerais aussi souligner sa curiosité, sa générosité, son ouverture d'esprit quant aux nouvelles expériences de vie, sa sensibilité artistique et sa joie de vivre.

Merci aux filles de mon labo, Ana, Annie, Brigitte, Myriam, Julie et Julie, qui m'ont côtoyé tous les jours, beau temps mauvais temps, bonne humeur mauvaise humeur. Un merci particulier à Julie Dutil sans qui mes expériences auraient pris beaucoup plus de temps...

Merci à Ian qui m'a grandement motivé, supporté et conseillé à travers cette aventure. Merci à tous mes ami(e)s pour leur support et leur habileté à me changer les idées. Merci à Dakota, qui m'accompagne à travers tout, avec une bonne humeur constante!

J'AIMERAIS DÉDIER CE MÉMOIRE À KUTYUSKA

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Résumé français et mots clés	i
Résumé anglais et mots clés	ii
Remerciements et dédicace	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des sigles et abréviations	x
PARTIE I	1
Objectifs	2
Chapitre 1 : Recension de littérature	4
1.1 Hypertension	5
1.2 Contrôle normal de la pression artérielle	7
1.3 Modèles animaux pour l'étude de l'hypertension	10
1.4 Contrôle de la pression artérielle chez le rat Dahl salt- sensitive (S).....	12
1.5 Clonage positionnel	16
1.6 Localisation de gènes par liaison	19
1.7 Marqueurs génétiques et leurs usages	20
1.8 Localisation de gènes par lignées congéniques	23
1.9 Cartographie physique	27
1.10 Le chromosome 10 et ses QTL	29
1.11 Homologie	36

Chapitre 2 : Méthodologie	39
2.1 Rats	40
2.2 Schème d'élevage des lignées congéniques	40
2.3 Mesures de pression artérielle	44
2.4 Extraction des tissus	46
2.5 Analyse statistique	46
2.6 Extraction de l'ADN et établissement des génotypes	47
2.7 Cartographie par hybrides de radiation	47
 Chapitre 3 : Résultats	 48
3.1 Construction des lignées	49
3.2 Étude de pression artérielle	49
3.3 Cartographie de deux QTL pour la pression artérielle ...	49
3.4 Évaluation de l'hypertrophie cardiaque, aortique et rénale	50
 Chapitre 4 : Discussion	 58
4.1 Localisation des QTL	59
4.2 Le chromosome 10	59
4.3 Création des rats congéniques	60
4.4 Étude d'hypertrophie	60
 PARTIE II	 63
 Chapitre 5 : Raffinement des QTL	 64
5.1 Réduction de la région couverte par le QTL 1	65
5.2 Réduction de la région couverte par le QTL 2	69
5.3 Cartographie physique de la région du QTL 1	72
5.4 Étude d'homologie	73
5.5 Raffinement de la région d'intérêt du QTL 1	74

Chapitre 6 : Analyse Moléculaire	79
6.1 Étude de profilage d'expression génique	80
6.2 Clonage de <i>Vezf1</i>	86
Chapitre 7 : Critiques et discussion	88
7.1 Description des QTL	89
7.2 Cartographie physique	92
7.3 Homologies humaines	94
7.4 Sources d'erreurs	95
7.5 Profilage d'expression génique	98
Conclusions et recommandations.....	99
Références	103

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1 : Courbe de la fonction rénale	8
Figure 1.2 : Le système rénine-angiotensine et l'homéostasie du sodium ..	9
Figure 1.3 : Contrôle de la pression artérielle par le système rénine- angiotensine	14
Figure 1.4 : Construction d'une lignée congénique	24
Figure 1.5 : Carte génétique du chromosome 10 pour trois différents croisements de rat	32
Figure 1.6 : Carte intégrée du chromosome 10	33
Figure 1.7 : Carte indiquant les QTL initiaux. Adapté de Garrett et al., 2001 et de Deng et al., 2001.....	35
Figure 1.8 : Carte d'homologie entre le chromosome 10 du rat, le chromosome 11 de la souris et le chromosome 17 humain	38
Figure 2.1 : Carte génétique du chromosome 10 basé sur une population F2 (S X LEW)	42
Figure 2.2 : Implant télémétrique de Data Sciences Inc. et son cathéter	45
Figure 2.3 : Mesure de la longueur de l'aorte à la règle graduée	46
Figure 3.1 : Comparaison de la MAP, SAP et DAP entre les souches parentales S et LEW	51
Figure 3.2 : Comparaison des éléments de la pression artérielle (PA) entre la souche S et les lignées congéniques S.L1 et S.L3	52

Figure 3.3 : Comparaison des éléments de la pression artérielle (PA) entre la souche S et les lignées congéniques S.L2 et S.L4	53
Figure 3.4 : Comparaison des fréquences cardiaques entre les lignées S.L2 et S.L4 et la souche S	54
Figure 3.5 : Comparaison des paramètres d'hypertrophie cardiaque, rénale et aortique entre les lignées S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4 et la souche S	55
Figure 3.6 : Cartographie des QTL	56
Figure 5.1 : Lignées congéniques développés dans la région du QTL 1	66
Figure 5.2 : Comparaison des MAP entre les souches parentales S et LEW, et entre les lignées congéniques S.L9, S.L10, S.L13 et la souche S	67
Figure 5.3 : Comparaison des paramètres d'hypertrophie cardiaque, rénale et aortique entre les lignées S.L9, S.L10, S.L13 et les souches parentales S et LEW	68
Figure 5.4 : Comparaison des MAP entre les souches parentales S et LEW, et entre les lignées congéniques S.L6, S.L8 et la souche S	69
Figure 5.5 : Comparaison des paramètres d'hypertrophie cardiaque, rénale et aortique entre les lignées S.L6 et S.L8 et les souches parentales S et LEW	70
Figure 5.6 : Nouvelles lignées congéniques pour mieux définir le QTL 2	71
Figure 5.7 : Carte physique de la région du QTL 1	75
Figure 5.8 : Carte de transcription de la région du QTL 1	76
Figure 5.9 : Localisation des QTL et cartographie comparative avec le chromosome 17 humain	77
Figure 6.1 : Localisation des séquences différemment exprimées sur le chromosome 10	83

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I.I : Classification de l'hypertension artérielle selon l'Organisation Mondiale de la Santé (1999)	5
Tableau I.II : Souches de rats utilisés pour les études sur l'hypertension artérielle	11
Tableau I.III : Stratégie de production de lignées congéniques	26
Tableau II.I : Marqueurs microsatellites utilisés pour vérifier les souches et pour construire les lignées congéniques	41
Tableau II.II : Pourcentage d'hétérozygotie à chaque génération de croisement retour (BC)	43
Tableau V.I : Marqueurs microsatellites développés à partir des séquences de BAC	78
Tableau VI.I : Comparaison de l'expression génique entre la souche S.L.C10-16 et la souche parentale S	81
Tableau VI.II : Marqueurs microsatellites développés pour localiser les résultats de profil d'expression	84
Tableau VI.III : Localisation des étiquettes de séquences exprimés (EST) ...	85

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ACP	Amplification en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction, PCR)
ACP-TR	Amplification en chaîne par polymérase en temps réel (real time polymerase chain reaction, RT-PCR)
ADH	Hormone anti-diurétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AL	Longueur aortique (aortic length)
ALDOC	Aldolase c
AW	Poids aortique (aortic weight)
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bp	Paires de bases (base pairs)
BRCA1	Gène de prédisposition au cancer du sein 1
BW	Poids du corps (body weight)
cDNA	ADN complémentaire
CHR	Chromosome
cM	Centimorgans
cR	Centirads
DAP	Pression artérielle diastolique (diastolic arterial pressure)
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EST	Étiquette de séquence exprimée (Expressed Sequence Tag)
GH	Hormone de croissance (growth hormone)
HW	Poids du cœur (heart weight)
IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4
KW	Poids du rein (kidney weight)
LEW	Rat Lewis
LKW	Poids du rein gauche (left kidney weight)
LVW	Poids du ventricule gauche (left ventricle weight)
MAP	Pression artérielle moyenne (mean arterial pressure)

Mb	Megabases (6×10^6) bp
mmHg	Millimètres de mercure
MNS	Rat Milan Normotensive
NGFR	Récepteur de facteur de croissance neuronale (nerve growth factor receptor)
NOS2	Synthase de l'oxyde nitrique inductible (Nitric oxide synthase 2)
PA	Pression artérielle
PAC	P1 Artificial Chromosome
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
QTL	Locus pour trait quantitatif (quantitative trait locus)
RRH	Hybride de radiation de rat (rat radiation hybrid)
RKW	Poids du rein droit (right kidney weight)
RVW	Poids du ventricule droit (right ventricle weight)
S	Rat Dahl « salt-sensitive »
SAP	Pression artérielle systolique (systolic arterial pressure)
S.L. X	Lignée congénique X entre la souche S et la souche LEW
YAC	Yeast Artificial Chromosome
VeZF1	Protéine « Vascular Endothelial Zinc Finger 1 »

PARTIE I

OBJECTIFS

L'objectif général de cette étude est de localiser des loci pour traits quantitatifs (QTL) pour l'hypertension artérielle chez le rat Dahl salt-sensitive (S). Puisque le chromosome 10 du rat a préalablement été ciblé comme contenant des QTL pour la pression artérielle par études de liaison (Hilbert *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991, Deng et Rapp 1992, Deng and Rapp, 1995) et par la création de lignées congéniques (Dukhanina *et al.*, 1997; Garrett *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2001; Garrett *et al.*, 2001), le but plus spécifique de l'étude est de prouver la présence de ces QTL sur le chromosome 10, et de rapetisser la région qu'ils couvrent par la construction de lignées de rats congéniques étroites. Ces lignées auront leur génome de génotype presque entièrement S tandis qu'une petite zone, celle suspecte de contenir le QTL, de génotype Lewis (LEW). La prémisse est la suivante : si le rat congénique a une pression artérielle plus basse que la souche parentale S, alors la région qui a été remplacée par le génotype LEW contient un QTL pour la pression artérielle. Puisque les lignées congéniques construites seront de plus en plus étroites autour de la région du QTL, ces lignées permettront aussi de réduire la zone d'intérêt. Idéalement, celle-ci devrait être limitée à une longueur de 1 à 2 cM, permettant par conséquent une analyse moléculaire.

Le but suivant est de poursuivre le clonage positionnel du QTL. La région étant devenue assez petite pour procéder à cette étape, il sera indispensable de poursuivre le clonage positionnel par les méthodes de génétique moléculaire. En effet, l'objectif à ce stade sera d'élaborer la carte physique de la région, de déterminer quels gènes candidats ou séquences exprimées s'y trouvent, et de cloner ces gènes. Une analyse de la séquence génétique des gènes candidats pour chaque souche parentale de rat révélera possiblement une mutation génétique.

Un objectif parallèle de cette étude est de trouver les régions homologues humaines. Les régions homologues trouvées, situées sur le chromosome 17, seront possiblement les causes de l'hypertension essentielle chez les humains. Le but ultime est donc de trouver les causes de l'hypertension essentielle chez les êtres humains, en se servant d'un modèle animal, le rat.

CHAPITRE 1 :
RECENSION DE
LITTÉRATURE

1.1 HYPERTENSION

L'hypertension artérielle n'est pas une maladie en soit. C'est un désordre physiologique qui est un facteur de risque important pour le développement d'une multitude de problèmes de santé. En effet, l'hypertension artérielle est une cause majeure de mortalité par des maladies cardiaques, cérébro-vasculaires, rénales et vasculaires périphériques (Société québécoise d'hypertension artérielle, 2002). La maîtrise de la pression artérielle (PA) élevée contribue par le fait même à la diminution du risque de ces maladies. La qualification d'hypertension artérielle débute lorsque la PA est supérieure ou égale à 140/90 mmHg (pression systolique / pression diastolique) (Société québécoise d'hypertension artérielle, 2002). Les paramètres de diagnostic sont indiqués au tableau I.I ci-dessous.

Catégorie	Systolique (mmHg)	Diastolique (mmHg)
Optimale	< 120	< 80
Normale	< 130	< 85
Normale élevée	130-139	85-89
Hypertension Grade 1 (légère)	140-159	90-99
Hypertension Grade 2 (modérée)	160-179	100-109
Hypertension Grade 3 (sévère)	≥ 180	≥ 110
Hypertension systolique isolée	> 140	< 90

Tableau I.I : Classification de l'hypertension artérielle selon l'Organisation Mondiale de la Santé (1999), pris de Société québécoise d'hypertension artérielle, 2002.

On estime que près d'un quart de la population des pays industrialisés souffre d'hypertension artérielle (Levy *et al.* 2000), et que la proportion de gens en souffrant dans les pays en développement et ceux de l'ancien bloc socialiste grimpe continuellement (Guidelines Subcommittee, 1999). Ceci dit, seulement 27% des gens atteints dans les pays industrialisés ont réussi à atteindre leurs objectifs de traitement entre 1988 et 1991 (Guidelines Subcommittee, 1999), tandis que cette proportion

diminue à 13% au Canada en 2002 (Société québécoise d'hypertension artérielle, 2002). Il reste donc 70-85% de la population souffrant d'hypertension artérielle dans les pays industrialisés qui ne réussissent pas à contrôler leur affliction. Voilà pourquoi la recherche sur l'hypertension est très active, englobant 18% de tous les articles publiés jusqu'en 1997 (Pinto *et al.*, 1998).

L'hypertension artérielle est causée par une multitude de facteurs environnementaux et génétiques. C'est précisément cet aspect qui rend son étude si laborieuse. L'hypertension essentielle (hypertension primaire, c'est-à-dire non causée par un facteur intrinsèque tel la grossesse) est caractérisé par une pression artérielle élevée, et ce malgré l'absence des causes environnementales qui y sont normalement associés. L'hypertension essentielle est donc d'origine génétique et ce type d'hypertension affecte 15% à 20% de la population (Rapp et Deng, 1995). Il est souvent difficile de discerner entre l'hypertension essentielle et l'hypertension de cause environnementale, car les deux sont fréquemment combinées. Afin de tenter de les distinguer, il est primordial de connaître les facteurs environnementaux qui élèvent la PA. Dans les « 1999 Guidelines for Management of Hypertension » (Guidelines Subcommittee, 1999) les facteurs suivants sont cités en tant que facteurs environnementaux précipitant l'avènement des maladies cardiovasculaires suite à l'hypertension artérielle : l'âge, le sexe, une historique d'autres maladies cardiovasculaires, une historique de maladies rénales et de microalbuminurie, une historique de diabète, d'hyperinsulinémie ou d'hyperglycémie, le tabagisme, le niveau de lipides et de lipoprotéines sanguins, l'obésité, le niveau sanguin de fibrinogène, la consommation d'alcool, le niveau d'activité physique, l'hormonothérapie, le statu socio-économique, l'ethnie et le lieu de résidence géographique. Outre ces facteurs, une panoplie d'effets génétiques sont à la base de l'hypertension essentielle. En effet, une multitude d'influences génétiques combinées causent souvent l'hypertension. L'hypertension essentielle est ainsi classifiée en tant que désordre polygénique, donc sous l'influence de plusieurs gènes. Afin de trouver tous ces gènes, il faut les identifier individuellement et indépendamment. Pour élucider les causes génétiques potentielles de l'hypertension artérielle, il est important de comprendre d'abord les mécanismes normaux du contrôle de la pression artérielle.

1.2 CONTRÔLE NORMAL DE LA PRESSION ARTÉRIELLE

Le contrôle de la pression artérielle (PA) se fait en deux temps : le contrôle à court terme et le contrôle à long terme. Puisque ces deux systèmes existent, ils fonctionnent de façon hiérarchique, débutant par les contrôles réagissant immédiatement aux stressors suivis par les systèmes qui réagissent progressivement, jusqu'à ceux qui réagissent lentement mais à long terme (Guyton, A.C., 1980).

Le système de contrôle réagissant le plus rapidement est celui du système nerveux. Celui-ci fonctionne d'abord en activant le réflexe des barorécepteurs. Ces derniers sont situés dans les artères carotides et dans l'arche de l'aorte. Ils détectent les changements de PA, ils envoient ensuite des signaux nerveux vers le centre vasomoteur du cerveau postérieur. Ce centre réagit en altérant la force contractile cardiaque et la constriction des vaisseaux sanguins périphériques. D'autres mécanismes de contrôle rapides au niveau du système nerveux sont les réflexes chémorécepteurs, la réponse ischémique du système nerveux central et les réflexes dans les oreillettes, dans les artères pulmonaires et dans les muscles squelettiques. Les systèmes agissant à moyen terme sont essentiellement les trois mécanismes suivants : le transfert de fluides entre les petits capillaires et le fluide interstitiel, la compliance vasculaire et les systèmes hormonaux impliquant l'angiotensine et la vasopressine. Comme il en sera mentionné ci-bas, l'angiotensine agit aussi à long terme, en modulant l'action des reins par l'aldostérone. Ces effets à moyen terme et à court terme fonctionnent surtout à travers la vasoconstriction des artérioles. Les systèmes rapides et à moyen terme sont toutefois incapables de remettre la PA complètement à la normale; il est donc nécessaire pour le corps de faire appel à des mécanismes de contrôle agissant à long terme (Guyton, A.C., 1980).

La modulation de la PA à long terme implique le contrôle du volume sanguin par l'altération du volume d'eau dans le sang. Ce système est principalement sous le contrôle des reins, mais aussi sous l'influence de tout système affectant la capacité des reins à manipuler l'eau et les électrolytes corporels. Essentiellement, lorsque la PA augmente, les reins réagissent par l'excrétion accrue d'eau et de sodium, ce qui mène à la baisse du volume sanguin, et par conséquent de la PA. Ce mécanisme de

base peut être défini graphiquement par la 'courbe de la fonction rénale', illustré à la figure 1.1. Plus la PA augmente, plus les reins travaillent à excréter l'urine et le sodium. Cette fonction est sous l'influence de cinq autres facteurs importants.

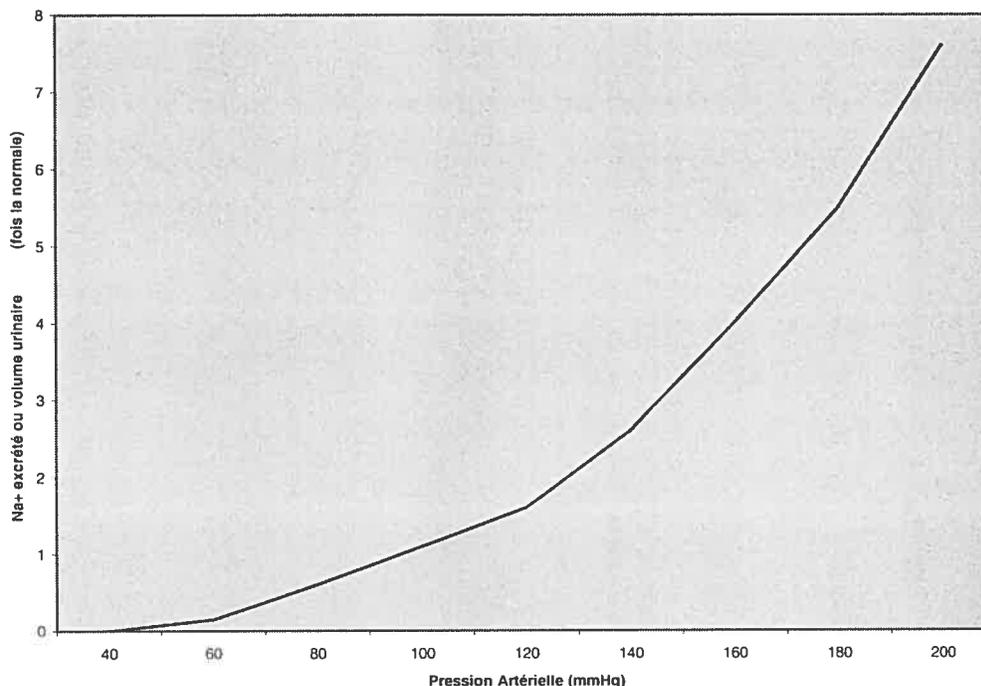


Figure 1.1 : Courbe de la fonction rénale, pris de Guyton, A.C., 1980

Premièrement, la sécrétion d'aldostérone est un facteur important influant sur le contrôle qu'exercent les reins sur la PA. En effet, l'aldostérone détermine le degré de réabsorption d'électrolytes et d'eau au niveau des tubules rénaux. Une augmentation de l'aldostérone dans la circulation stimule la rétention d'eau et de sodium au niveau des tubules, causant une hausse de la PA (Guyton, A.C., 1980).

Deuxièmement, le degré de production de rénine et d'angiotensine affecte l'action des reins sur la PA. Le système rénine-angiotensine altère le 'point-fixe' du système rénal et son rapport avec le volume sanguin, ceci se fait par un décalage de la courbe de la fonction rénale (figure 1.1). Cette courbe se décale vers la droite, causant ainsi la nécessité d'une plus haute PA pour stimuler une excrétion d'eau et de sodium par les reins. Finalement, le résultat à long terme est une augmentation de la pression

artérielle. L'angiotensine I, suite à sa conversion par la rénine, est encore activée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour former l'angiotensine II. Le mécanisme proposé par lequel l'angiotensine II décalerait la courbe de la fonction rénale est d'abord par la stimulation de la sécrétion d'aldostérone au niveau du cortex rénal, et ensuite par la stimulation directe des reins pour la rétention d'eau et de sel. Dans le système rénine-angiotensine, l'effecteur principal sur la PA est l'aldostérone; les hormones qui y sont associés font principalement partie du mécanisme de rétroaction de ce système, illustré dans la figure 1.2 ci-dessous.

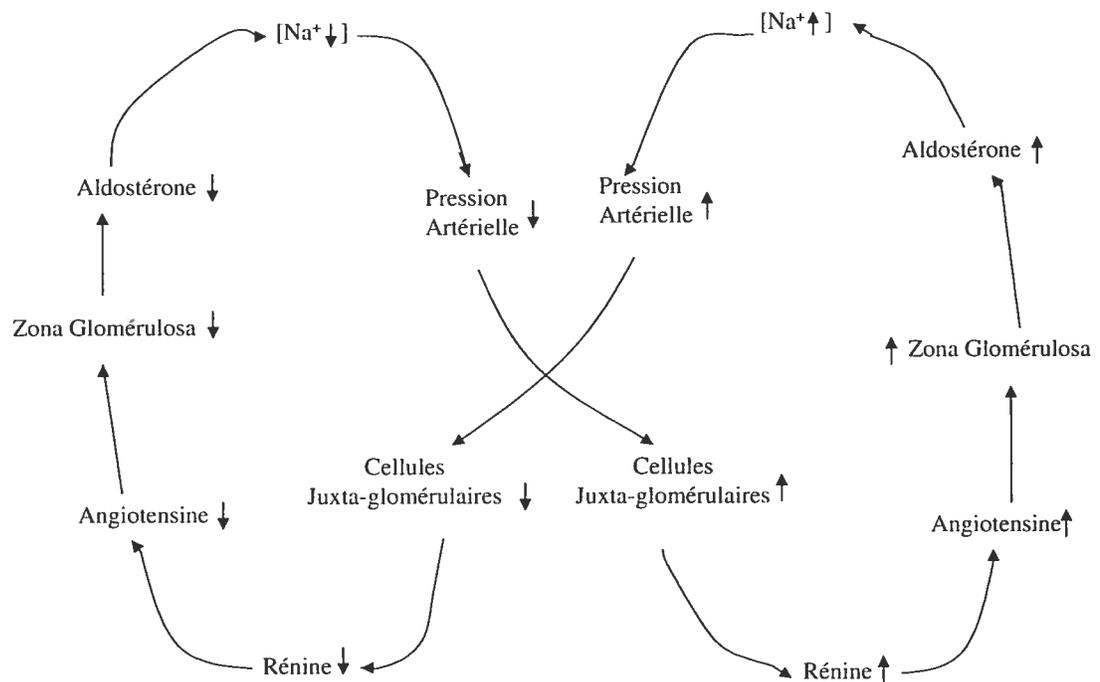


Figure 1.2 : Le système rénine-angiotensine et l'homéostasie du sodium. Les flèches indiquent les augmentations (\uparrow) et les réductions (\downarrow) des facteurs indiqués. Au niveau des cellules juxta-glomérulaires et de la zona glomérulosa, il s'agit d'activation de la sécrétion par ces cellules. Adapté de Hadley, M.E., 1996.

Le système rénine-angiotensine affecte aussi la PA d'une autre manière, indépendamment de son effet sur les reins. Le système a aussi un effet vasoconstricteur (Guyton, A.C., 1980). En effet, dès la découverte de cette hormone

en 1939, la première caractéristique qu'on lui attribua est qu'elle est un puissant vasoconstricteur des artérioles: ceci affecte la PA à court terme. Son effet sur l'augmentation de la PA par l'intermédiaire des reins, effet à long terme, ne fut découvert que plus tard.

Troisièmement, le rythme d'ingestion de sodium et d'autres électrolytes affecte le travail du rein dans le maintien de la pression artérielle. Quatrièmement, la sécrétion de l'hormone antidiurétique (ADH) diminue la capacité et le rythme avec lesquels les reins vont éliminer l'eau, stimulant une rétention d'eau et une augmentation de la PA. Cinquièmement, les pathologies et anomalies au niveau des reins peuvent intervenir avec le fonctionnement normal de cet organe (Guyton, A.C., 1980).

1.3 MODÈLES ANIMAUX POUR L'ÉTUDE DE L'HYPERTENSION

Plusieurs modèles animaux, expérimentaux et génétiques, ont été développés afin d'étudier l'hypertension artérielle : le chien (Pinto *et al.*, 1998), le cochon, la souris, le mouton, le lapin et le rat, entre autres (De Jong, 1984). Le rat a été utilisé de façon extensive, beaucoup plus fréquemment que les autres modèles animaux (Pinto *et al.*, 1998). Les modèles expérimentaux ont pour but d'induire l'hypertension artérielle par chirurgie. Ceci se fait fréquemment par l'obstruction des artères rénales (une ou les deux), ou par l'enveloppement ou l'ablation d'un rein (Birkenhäger et Reid, Elsevier, 1984). Les modèles génétiques d'animaux sont des souches animales ayant des divergences génétiques par rapport à la normale : ces divergences les rendent hypertendus. Plusieurs souches de rats (*Rattus norvegicus*) ont d'ailleurs été développés spécifiquement pour la recherche en hypertension artérielle. Certains des modèles de rats transgéniques démontrent de la génétique Mendélienne, qui n'est que très rare chez les humains. En effet, les humains souffrent plus fréquemment d'hypertension essentielle, qui comporte un amalgame complexe de facteurs génétiques. Ainsi, il existe aussi des modèles de rat qui exemplifient cette étiologie plus commune de l'hypertension humaine (Pinto *et al.*, 1998). Le tableau I.II ci-

dessous résume les souches de rats utilisées dans les études sur l'hypertension d'étiologie génétique, que celle-ci soit monogénique ou plurifactorielle.

SOUCHE	ABBREVIATION	ÉTILOGIE	ORIGINE
Souche Dahl salt-resistant	DR (ou R/JR)	génétique	Brookhaven (Dahl <i>et al.</i> , 1962)
Souche Dahl salt-sensitive	DS (ou S/JR)	génétique	Brookhaven (Dahl <i>et al.</i> , 1962)
Souche Genetically hypertensive	GH	génétique	Dunedin (Smirk et Hall, 1958)
Souche Lyon hypertensive	LH	génétique	Lyon (Dupont <i>et al.</i> , 1973)
Souche Lyon normotensive	LN	génétique	Lyon
Souche Lyon low blood pressure	LL	génétique	Lyon
Souche Milan hypertensive	MHS	génétique	Milan (Bianchi <i>et al.</i> , 1974)
Souche Milan normotensive	MNS	génétique	Milan
Souche Sabra hypertensive	SBH	génétique	Jerusalem (Ben-Ishay <i>et al.</i> , 1972)
Souche Sabra normotensive	SBN	génétique	Jerusalem
Souche Spontaneously hypertensive	SHR	génétique	Kyoto (Okamoto et Aoki, 1963)
Souche SHR-stroke prone	SHRSP	génétique	Kyoto
TGR(mRen 2)27		monogénique	
Souche Wistar-Kyoto	WKY	génétique	Kyoto

Tableau I.II : Souches de rats utilisés pour les études sur l'hypertension artérielle. Les données résumés dans ce tableau proviennent des références suivantes: De Jong, 1984; Rapp et Dene 1985; Pinto *et al.*, 1998, et ceux nommés dans le tableau. L'étiologie dite 'génétique' désigne une étiologie plurifactorielle.

Les rats Dahl *salt-sensitive* (abrégé S dans ce document) développent de l'hypertension sévère et fatale lorsqu'on leur nourrit une diète riche en sel. Lorsque leur diète est normale, ils développent aussi de l'hypertension, mais moins sévère et

plus lente à se manifester. Ces faits démontrent que le rat S est un bon modèle génétique de l'hypertension, avec la caractéristique supplémentaire d'être sensible au sel (Pinto *et al.*, 1998). En effet, les études sur les traits génétiques causant l'hypertension chez le rat S ont débuté dès 1972 (Rapp et Dahl, 1972a; Rapp *et al.*, 1989; Rapp *et al.*, 1990). La souche S et son homologue normotendue Dahl *salt-resistant* (abrégé R dans ce document) ont été développées en véritables souches consanguines par la suite, afin de diminuer l'hétérogénéité génétique à l'intérieur de chacune des souches (Rapp et Dene, 1985). Depuis, plusieurs autres études ont tenté de découvrir les gènes qui expliqueraient la différence de pression artérielle entre les rats S et les rats R. Ceci est une tâche difficile, puisqu'il y a une énorme différence au niveau génétique entre la souche S et la souche R, et puisque les différences physiologiques entre les deux souches sont fréquemment dues à des interactions entre les gènes. De plus, les différences physiologiques et biochimiques entre S et R pourraient être dues directement à des divergences génétiques, ou à l'action combinée des systèmes physiologiques différents (Deng, A.Y., 1992a). La dissection des causes génétiques est donc un travail ardu.

1.4 CONTRÔLE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE CHEZ LE RAT DAHL SALT-SENSITIVE (S)

Le rat Dahl salt-sensitive (S) exhibe certains caractères pathophysiologiques dans la manière dont sa pression artérielle est contrôlée. Effectivement, si on compare ce rat avec le rat Dahl salt-resistant (R), plusieurs divergences physiologiques existent. Il est fort probable que l'augmentation de la PA chez le rat S suite à une diète riche en sel soit due à un dérèglement au niveau du rein. En effet, lorsque le rein du rat S est transplanté dans un rat R, on voit la PA de ce dernier augmenter, tandis que lorsqu'on fait l'inverse, on voit la PA du rat S descendre (De Jong, 1984).

Le rat S réagit différemment au sel que le rat R. Une augmentation systémique du niveau de sel chez le rat R induit une diminution de la résistance périphérique des vaisseaux sanguins de 14%. Au contraire, le rat S réagit aux mêmes conditions en

augmentant sa résistance vasculaire de 9%. Ceci démontre que dans le rat S, la présence accrue de sel cause la vasoconstriction, contrairement à la vasodilatation (De Jong, 1984). Par quels mécanismes? Certaines études ont démontré que la perfusion du sang d'un rat S vers un rat R causait une augmentation de la résistance vasculaire, et ce suite à la neutralisation des nerfs sympathiques qui s'y trouvaient. Ceci indiquerait qu'une substance présente dans la circulation induit la vasoconstriction suite à une augmentation de la concentration de sel dans la diète. Cette substance n'est probablement pas l'angiotensine II, comme on pourrait le croire, car le taux de rénine dans le plasma des rats S est plus faible que le taux des rats R (De Jong, 1984).

L'injection d'angiotensine II dans le cerveau de rats S cause une augmentation de la vasoconstriction de manière plus marquée que lorsque le même traitement est infligé au rat R. Le même phénomène se produit lors de l'injection d'une solution saline hypertonique. Ceci indique que le rat S est hypersensible aux stimuli d'augmentation de PA (De Jong, 1984). L'excrétion du sodium chez le rat S semble gênée, car une plus forte pression de perfusion est nécessaire pour que le rat S excrète la même quantité de sel que le rat R, lorsque deux rats sont nourris une diète normale. De plus, lorsque l'on donne à ces rats une diète riche en sel, les rats S accumulent progressivement le sel et leur PA augmente continuellement.

Le manque de prostaglandine E_2 (PGE_2) peut possiblement être la cause de cette difficulté à excréter le sodium. Il a effectivement été remarqué que le rein du rat S contient seulement 50% de la concentration de PGE_2 du rein du rat R. La PGE_2 a plusieurs fonctions au niveau du rein : elle inhibe la pompe de chlorure de la branche ascendante de l'anse de Henle, elle inhibe la réabsorption du sodium par la tubule collectrice, elle inhibe l'action de l'hormone antidiurétique (ADH) et elle augmente le flux sanguin dans la papille rénale. Toutes ces fonctions sont anti-hypertensives en augmentant l'excrétion de sodium et d'eau. Un manque de PGE_2 peut donc être une explication de l'hypertension du rat S suite à une augmentation de sodium dans la diète (De Jong, 1984). La papille rénale est reconnue pour son rôle anti-hypertensif, et l'hypertension du rat Dahl S est fréquemment associé à sa dégradation (De Jong, 1984).

On peut remarquer une diminution du taux d'excrétion de kallikrénine rénale chez les rats S (De Jong, 1984), ce qui peut indirectement (figure 1.3) induire une augmentation de la production d'angiotensine II, puissant vasoconstricteur. L'activité réduite de la rénine chez le rat S semble pourtant contredire l'éventualité de ce mécanisme. Cette réduction de l'activité peut toutefois être considéré comme une réaction à la haute pression artérielle, comme un mécanisme de rebouclage négatif. De plus, ces faits illustrent bien l'aspect multi-factoriel de l'hypertension essentielle : certains facteurs agissent pour augmenter la pression, et d'autres agissent pour la diminuer, cumulant vers un phénotype hypertendu ou normotendu, dépendamment de l'ampleur de chacun des effets.

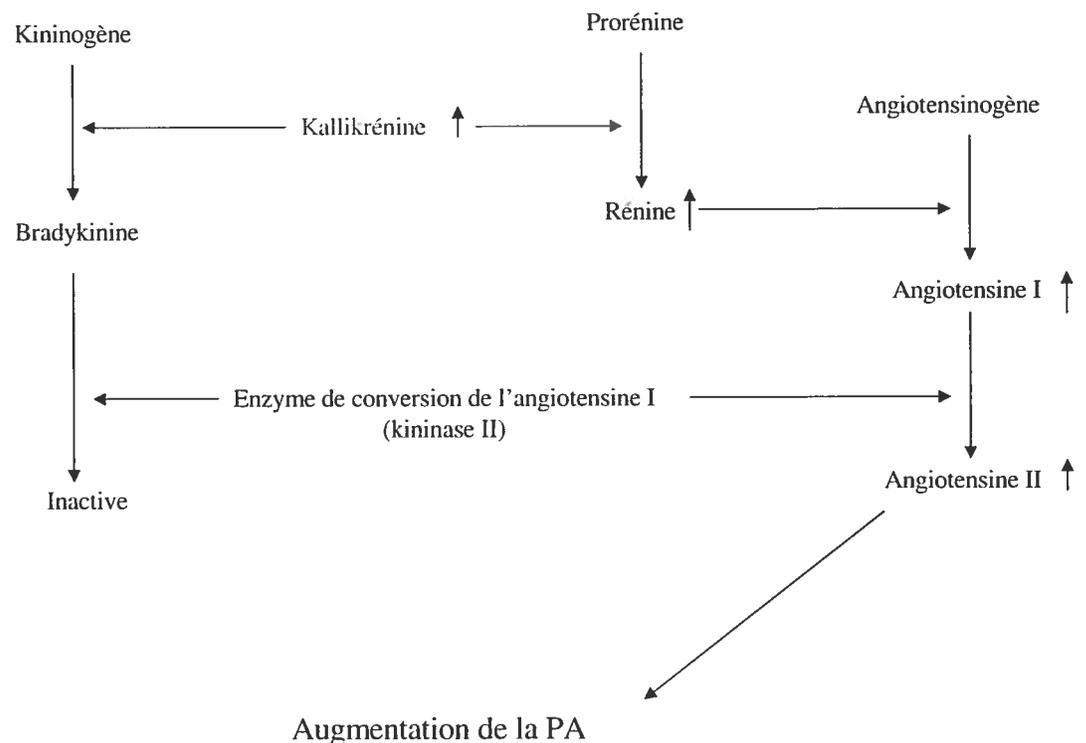


Figure 1.3 : Contrôle de la PA par le système rénine-angiotensine, indiquant l'effet d'une baisse d'excrétion de kallikrénine, donc une augmentation de la présence de celle-ci dans les reins. Adapté de Hadley, M.E., 1996.

Il y a aussi une réduction de l'activité de la (Na⁺-K⁺) ATPase chez le rat S (De Jong, 1984). Cette enzyme est responsable du fonctionnement de la pompe Na⁺-

K⁺ servant à sortir le sodium des cellules vers le sang à travers la membrane plasmique, tout en acheminant le potassium dans le sens contraire (Alberts *et al.*, 1994). Une réduction dans son activité pourrait réduire le taux de sodium sanguin, ce qui serait réactionnaire à l'augmentation de la PA chez le rat S. En plus de ces changements biochimiques du rat S par rapport au rat R normotendu, on remarque aussi certaines altérations anatomiques pathologiques au rein. Effectivement, les rats S développent des lésions rénales caractérisées par l'effondrement tubulaire, la dilatation tubulaire, la cicatrisation du tissu glomérulaire et la prolifération de tissus musculaires élastiques aux points de branchage des artéioles (De Jong, 1984).

Le système endocrinien du rat S diffère aussi de façon marquée par rapport à celui du rat R. D'abord, le rat S produit une plus grande quantité de 18-hydroxy-11-deoxycorticostérone (18OH-DOC) dans le cortex du rein (De Jong, 1984). Cette hormone, contrôlée par le gène *Hyp-1*, est effectivement responsable d'une variation de 16mmHg de pression artérielle entre le rat S et le rat R (Rapp et Dahl, 1972). Ensuite, il y a une réduction dans le taux d'aldostérone plasmatique chez du rat S. Puisque l'aldostérone agit afin de baisser le taux de sodium sanguin, il se peut que cette diminution soit une cause de la difficulté qu'a le rat S à excréter le sodium. Finalement, le niveau d'hormone anti-diurétique (ADH) semble être affecté chez le rat S. Sur une diète normale en sel, le taux d'ADH n'est pas affecté, mais lorsque l'on nourrit une diète riche en sel, le taux d'excrétion ainsi que le taux sanguin d'ADH est augmenté (De Jong, 1984).

La diète enrichie en sel semble aussi causer l'hypertrophie cardiaque du rat S, plus spécifiquement l'hypertrophie du ventricule gauche (Zhao *et al.*, 2000). L'hypertrophie cardiaque du rat S n'est pas proportionnelle au niveau de l'hypertension artérielle induite par la surcharge en sel. De plus, la surcharge de sel n'induit pas l'hypertrophie chez le rat R. Zhao et collaborateurs ont élucidé que l'hypertrophie du ventricule gauche peut être indépendante de l'hypertension artérielle chez le rat S (Zhao *et al.*, 2000). Une étude préalable avait suggéré qu'une diète enrichie en sel empêchait la suppression du système rénine-angiotensine, ce qui agirait comme un stimuli pour l'hypertrophie du myocarde (Schmieder *et al.*, 1996). En bref, quoique l'augmentation de la masse cardiaque soit un phénotype associé à

l'hypertension artérielle du rat S, il semble que les deux phénotypes soit indépendants dans certains cas du moins.

De plus, on remarque une stimulation du système nerveux sympathique périphérique et central. Plus particulièrement, une diète surchargée de sel induit l'hypertension du rat S par l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (Zhao *et al.*, 2000).

1.5 CLONAGE POSITIONNEL

Qu'est-ce qu'un QTL ? C'est un (ou des) locus (loci) pour trait quantitatif. C'est donc une région génétique contenant des gènes qui affectent un trait que l'on mesure de façon quantitative. Contrairement à un trait qualitatif qui détermine un phénotype clair et précis, comme la couleur des yeux, un trait quantitatif se manifeste en variations continues (Deng, 1998), quantifiables sur une échelle. Par exemple, dans le cas de la pression artérielle, on mesure l'effet des multiples QTL présents chez une personne en millimètres de mercure (mmHg). Puisque les effets d'un QTL ne peuvent pas être précisément définis comme les effets d'un gène affectant un trait qualitatif, il est plus difficile de les localiser.

Le clonage positionnel fournit un outil important pour la localisation de QTL pour la pression artérielle (PA). La pression artérielle est un trait polygénique, c'est-à-dire que le trait est contrôlé par plusieurs QTL. Ainsi, un QTL peut être influencé par l'effet d'un autre QTL, ce qui ajoute à la difficulté de les localiser.

Nettement, une multitude de QTL contrôlant la PA existent, mais chacun de ces QTL peut être analysé individuellement en tant que trait monogénique (Deng, 1998). En effet, la notion que le trait peut être disséqué en plusieurs facteurs Mendéliens est connu depuis plus de 80 ans (Jacob *et al.*, 1991). Le clonage positionnel est la méthodologie suivie pour la localisation individuelle des multiples gènes responsables de l'effet du QTL.

Les étapes principales dans toute tentative d'analyse de liaison visant en finalité le clonage positionnel de QTL sont d'abord le choix de deux populations

animales : l'une étant atteinte du désordre pour lequel on cherche les causes génétiques, l'autre étant normale pour ce trait. Les souches S et R semblent les choix évidents. Par contre, il existe d'autres souches de rats normotendus (tableau I.I et autres) par rapport auxquelles on peut comparer le rat S (Deng, 1992a). La souche R n'est pas nécessairement la meilleure à utiliser. D'abord, la souche Dahl salt-sensitive (S) contient beaucoup plus de QTL pour la pression artérielle que ne pourraient être révélés par la souche Dahl salt-resistant (R) (Deng, 1998). En effet, la disparité génétique entre S et d'autres souches normotendues que R peut révéler plus de QTL causant potentiellement l'hypertension essentielle humaine (Deng, 1998). De plus, il est important de posséder des outils génétiques de localisation des QTL sur les chromosomes. Les marqueurs microsatellites polymorphiques servent à cet effet. Il existe peu de marqueurs polymorphiques entre S et R (29% du total des marqueurs sont polymorphiques entre ces souches), tandis que d'autres souches normotendues offrent un meilleur rapport de marqueurs polymorphiques, soit 67% pour WKY, 50% pour LEW (Ginn et al., 1993), et 40% pour MNS (Deng, 1992a), tous par rapport au rat S. Ces pourcentages peuvent être considérés comme des paramètres de la divergence génétique entre ces souches de rats, car la consanguinité fixe tous les gènes de la souche. De plus, la souche R et la souche S contiennent plusieurs des mêmes QTL pour la pression artérielle, rendant leur comparaison non-révélatrice pour la recherche de QTL éventuels chez l'humain. Il est donc plus avantageux de choisir une souche de rat normotendue différente de R, et en soi l'utilisation d'une variété de souches normotendues à travers plusieurs études est l'idéal, puisque ces dernières exposent de nouveaux allèles de contrôle de PA, augmentant la puissance de reconnaissance de nouveaux QTL (Deng, 1998).

Le rat Lewis (LEW) est une souche normotendue de rat de laboratoire. Ce type de rat comporte plusieurs caractéristiques spécifiques. D'abord, la souche est hautement susceptible de développer des maladies auto-immunes et inflammatoires (<http://www.informatics.jax.org/external/festing/rat/docs/LEW.shtml>). Par contre, dans l'optique de l'étude de la pression artérielle, cette souche a une pression artérielle basse et un poids cardiaque relativement bas à 10 semaines (Tanase *et al.*, 1982). Ainsi, le rat LEW est un bon modèle pour la création de lignées congéniques

(décrit ci-bas) avec la souche S, car il existe une divergence particulièrement importante entre le rat Dahl S et le rat LEW en termes de physiologie se rapportant au système cardiovasculaire et en termes de pourcentages de marqueurs anonymes polymorphiques.

En plus de l'importance de bien choisir les souches de rats pour la fabrication des lignées congéniques, il est aussi important de standardiser les sexes utilisés pour les études. En effet, il est maintenant établi qu'il existe possiblement une spécificité des sexes lors de la recherche de QTL (Clark *et al.*, 1996). Ainsi, pour toute lignée congénique, il est impératif de comparer des rats du même sexe (Clark *et al.*, 1996).

Les grandes lignes de la méthodologie du clonage positionnel sont les suivantes : le point de départ est deux souches de rats de phénotypes différents, par exemple la souche hypertendue S et la souche normotendue LEW. Premièrement, une étude de liaison doit être faite pour établir de larges régions cibles (20cM ou plus) contenant un QTL. Deuxièmement, il est nécessaire de construire des lignées congéniques isolant chaque QTL. Troisièmement, il faut cartographier chacune des zones contenant un QTL par l'établissement de sous-lignées congéniques pour des segments chromosomiques de plus en plus petits, jusqu'à ce que la région du QTL soit de 1 à 2 cM. Quatrièmement, lorsqu'elle est suffisamment rapetissée, on procède à la construction d'une carte physique pour identifier les gènes qui se retrouvent dans la région. Cinquièmement, on clone les gènes candidats qui y sont situés, afin d'identifier les variations génétiques causant les divergences fonctionnelles (Rapp et Deng, 1995). Sixièmement, il faut prouver que les gènes candidats en question sont la source de la variation de pression artérielle, et ceci peut se faire par la construction d'animaux transgéniques pour les allèles des gènes identifiés. Finalement, les résultats des recherches sur le modèle animal devraient compléter des études de liaison génétiques chez des populations humaines (Jacob *et al.*, 1991).

1.6 LOCALISATION DE GÈNES PAR LIAISON

La dissection des causes génétiques de traits complexes tels l'hypertension artérielle, les maladies cardiaques, le diabète, l'asthme, la schizophrénie et la maniaque-dépression n'est pas une tâche facile (Lander et Kruglyak, 1995). La première étape dans l'identification et la localisation de QTL participant dans le développement de ces maladies est la réalisation d'études de liaison génétique. Dans ce type d'étude, chaque région chromosomique est associée à un score de liaison à la maladie étudiée. Le score en question est un « LOD score ». C'est une mesure qui compare le partage d'allèles identiques entre deux populations, dont la proportion est de $\pi(x)$. Le score LOD est la probabilité logarithmique des données observées pour un paramètre phénotypique en particulier sous l'hypothèse que la proportion d'allèles partagées a la valeur $\pi(x)$ comparativement à l'hypothèse qu'il n'y a pas de partage entre les allèles (Lander et Kruglyak, 1995). Quoique le seuil de score LOD peut varier en fonction des types de croisements et/ou du type de lien génétique, il a été établi par Lander et Kruglyak que le score LOD minimum pour un site chromosomique, ou pour qu'un allèle soit lié à une maladie est de $\text{LOD} \geq 3.6$. Ainsi, si un site chromosomique a un LOD de liaison de 3.7 pour l'hypertension artérielle dans une certaine population, il est souhaitable de poursuivre les études sur cette région, car elle contient probablement un QTL pour l'hypertension artérielle. Il est impératif dans ce type d'étude de bien choisir les paramètres statistiques car si celles-ci sont trop sévères, on risque de manquer des QTL intéressants, tandis que si elles sont trop clémentes, on risque de perdre beaucoup de temps et d'argent en se dirigeant sur des fausses-pistes.

C'est ainsi que les premières études de localisation de QTL pour l'hypertension se sont faites par des criblages de génome pour des sites de liaison à la pression artérielle. Les sites sont identifiés par les marqueurs génétiques anonymes éparpillés à travers le génome. Dans une étude sur un modèle animal, la population à l'étude doit consister d'au moins 100 rejetons de la seconde génération filiale (F2) d'un croisement entre deux souches ayant une pression artérielle divergente (une souche normotendue croisée à une souche hypertendue). La prémisse sous-jacente

aux études de liaison est que les allèles différentes d'un QTL pour la pression artérielle doivent être liées à des variations de pression artérielle dans une telle population ségréguée (Rapp et Deng, 1995). Ainsi, les allèles à un locus marqueur qui n'est pas génétiquement lié au QTL recherché va s'isoler indépendamment du QTL, et il n'y aura aucune association statistique entre le génotype du marqueur et la pression artérielle (PA). De tels criblages localisent des QTL dans de larges régions de près de 20 cM (Lander et Kruglyak, 1995). Une région si large doit impérativement être réduite pour poursuivre le clonage positionnel.

Par exemple, quoi que certaines études de liaison n'aient pas réussi à identifier le chromosome 10 du rat comme contenant un profil physiologique associé à l'hypertension artérielle (Stoll *et al.* 2001), d'autres études de liaison initiales ont identifiés des QTL pour la pression artérielle sur ce chromosome (Jacob *et al.*, 1991; Hilbert *et al.*, 1991; Deng et Rapp, 1992, Garrett *et al.*, 1998).

Un autre aspect à considérer dans les études de liaison est la spécificité de la population lors de l'identification des QTL. En effet, chaque croisement de deux souches différentes pour produire une deuxième génération filiale (F2) résulte dans une localisation variée des QTL pour la PA. D'ailleurs, différents marqueurs génétiques anonymes sont utilisés selon les croisements car ils ne sont pas tous polymorphiques entre chaque souche, un marqueur pouvant donc être informatif pour une paire de souches, sans l'être pour une autre paire de souches (Rapp et Deng, 1995). Afin de prouver la présence des QTL aux endroits localisés par liaison, et afin de réduire la largeur des régions d'intérêt (les régions des QTL) jusqu'à 1 à 2 cM, il est nécessaire de construire des lignées de rats congéniques. Pour ce faire, il est impératif d'avoir comme outil une carte génétique dense en marqueurs polymorphiques (Deng, 1992a).

1.7 MARQUEURS GÉNÉTIQUES ET LEURS USAGES

Plusieurs types de marqueurs peuvent servir à mener des études de cartographie génétique. En effet, certains marqueurs sont anonymes tandis que

d'autres se rapportent à des gènes. Les marqueurs se rapportant à des gènes sont généralement faciles à traquer, en observant les caractéristiques physiologiques de l'animal en question. Dans les études menées sur le rat de laboratoire, une entrave importante a toujours été le manque de marqueurs informatifs (Hilbert *et al.*, 1991). Effectivement, les marqueurs microsatellites anonymes (aussi appelés répétitions dinucléotides) doivent obligatoirement être polymorphiques entre deux souches afin d'être traqués (Ginn *et al.*, 1993). Il est souvent difficile de trouver des marqueurs polymorphiques chez le rat, car seulement 50% des marqueurs du rat sont polymorphiques entre deux souches données (McCarthy *et al.*, 2000). La génération de marqueurs pour un certain chromosome peut se faire de différentes façons. On peut par exemple isoler un chromosome, en produire une librairie entière de clones et construire des marqueurs sur les séquences de clones contenant des répétitions de di- ou tri-nucléotides (Dukhanina *et al.*, 1997). Également, on peut faire du « primer-walking » qui consiste à trouver des marqueurs polymorphiques entre ceux que l'on a déjà placés. Pour ce faire, il faut évaluer le polymorphisme de chaque nouveau marqueur entre les souches de rats utilisés.

L'identification de gènes par études de liaison (Dracheva *et al.*, 2000) et l'établissement de lignées congéniques de façon efficace (Bihoreau *et al.*, 2001) nécessite des cartes génétiques denses en marqueurs. En effet, plus la densité des marqueurs sur les cartes est forte, plus il est possible d'être précis lorsque les lignées congéniques sont bâties. Il existe déjà des cartes génétiques denses pour la souris, pour l'humain (Dracheva *et al.*, 2000) et pour le rat (*Rattus norvegicus*). Nous devons ces dernières à une variété d'équipes de chercheurs. Une multitude de cartes génétiques ont été construites (plusieurs exemples existent, dont Zha *et al.* 1993; Dukhanina *et al.*, 1997), mais les différentes équipes qui les élaborent y placent les marqueurs qu'ils ont eux-mêmes développés, et donc les cartes sont difficiles à intégrer.

Plusieurs types de cartes existent. Les cartes de liaison génétique et les cartes d'hybrides de radiation sont les plus fréquemment utilisés. Dans les cartes de liaison génétique, la distance entre les marqueurs est exprimée en centiMorgans (cM), ce qui constitue une mesure de la probabilité de recombinaison génétique entre les

marqueurs. Par exemple, si deux marqueurs sont à une distance de 8,9 cM, alors ils ont 8,9% de chance de recombinaison. Ces distances sont fiables jusqu'à 50 cM, car lorsque la chance de recombinaison est de 50% ou plus, il est statistiquement incorrect de considérer cette méthode de mesure. Les cartes de liaison sont donc seulement relativement exactes, car elles se fondent sur des probabilités et non sur des mesures réelles. Également, leur construction requiert un large éventail de marqueurs polymorphiques entre deux souches, et les distances établies sont souche-spécifiques. Ainsi, lorsque l'on étudie deux nouvelles souches, les distances entre les marqueurs peuvent varier, et les marqueurs utilisables aussi.

Les cartes d'hybrides de radiation (RH) expriment les distances entre les marqueurs en centirads (cR). Les avantages de cette technique sont qu'elle ne requiert pas nécessairement des marqueurs qui sont polymorphiques, elle a une plus grande résolution que les cartes de liaison, elle couvre le génome à 100% et elle constitue une ressource unique pour tous les laboratoires (McCarthy *et al.*, 2000). La précision de ces cartes est limitée lorsque les distances à cartographier sont sous les 2 cM. À cette résolution, l'utilisation de cartes physiques est préférable. Les cartes RH sont fondées sur un panneau unique de lignées cellulaires hybrides entre le rat et le hamster. Ce panneau est rattaché à une base de données énorme constituée de séquences de microsatellites, de marqueurs de gènes, et d'étiquettes de séquences exprimées (EST). Selon les résultats générés de l'amplification par PCR des ADN hybrides du panneau par chaque marqueur, ceux-ci sont localisés relativement au panneau. Les marqueurs sont localisés statistiquement par un serveur Internet (<http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER/>). On peut également localiser des marqueurs de gènes afin de bâtir des cartes d'homologie avec l'humain et la souris. Les cartes RH donnent une intégration directe et claire des données de cartographie générées dans différents laboratoires, utilisant des souches de rats différents (Bihoreau *et al.*, 2001). Il est effectivement nécessaire d'intégrer les cartes de plusieurs groupes, et d'intégrer les cartes de liaison avec les cartes RH, afin de transférer une panoplie d'informations sur les séquences génomiques, les contigus de clones, les cartes d'EST et de gènes, et les analyses génomiques comparatives entre les cartes de RH et les QTL de rats (Bihoreau *et al.*, 2001). Il existe maintenant des cartes intégrées

livrant des informations pour la recherche de QTL pour la pression artérielle (Bihoreau *et al.*, 2001, Dracheva *et al.*, 2000). Elles constituent un outil essentiel pour la construction rapide de lignées congéniques.

Une partie importante du travail présenté ici consiste en la production et l'élaboration de nouveaux marqueurs microsatellites anonymes. Le cadre de construction de la carte RH du chromosome 10 du rat est d'une longueur génétique de 96 cM, d'une longueur physique de 128 Mb, longueur de 1919 cR, soit 67 kb/cR et contient 111 marqueurs (McCarthy *et al.*, 2000). Ces informations aident à intégrer les différentes cartes du chromosome 10 du rat.

1.8 LOCALISATION DE GÈNES PAR LIGNÉES CONGÉNIQUES

L'usage de lignées congéniques fut conçue par Snell (Snell, 1948). La création d'une lignée congénique consiste à remplacer les allèles d'intérêt dans un rat receveur par les allèles homologues d'un rat donneur. Le terme homologue désigne chaque paire de chromosomes durant la méiose. Les quelques allèles du rat donneur se retrouvent donc dans un arrière-plan génétique du rat receveur. Cette méthodologie permet de cerner l'effet d'une région du génome sur un trait indépendamment de l'effet des autres régions génomiques sur ce même trait. Ainsi, il est possible de procéder à la dissection de traits génétiques complexes. Dans le cas d'études sur l'hypertension artérielle, on utilise une souche de rat hypertendu (par exemple, S) comme receveur et une souche normotendue (par exemple LEW) comme donneur. Tout d'abord, les souches parentales sont croisées pour produire une génération F1 de rats hétérozygotes. Par une répétition de croisements retour (au moins huit) entre un rat hétérozygote et la souche parentale receveur S, on crée une lignée 'congénique' qui a un arrière-plan génétique S, et une région d'intérêt de génotype LEW. La figure 1.4 illustre cette méthodologie. À chaque nouvelle génération de croisement retour, on diminue le pourcentage de génotype donneur LEW, pour cerner éventuellement uniquement la région d'intérêt. Lorsqu'un tel rat est finalement produit, on l'inter-

croise avec un frère ou une sœur, pour produire un rat homozygote LEW pour la région d'intérêt, et homozygote S pour le reste de son génome : un rat congénique.

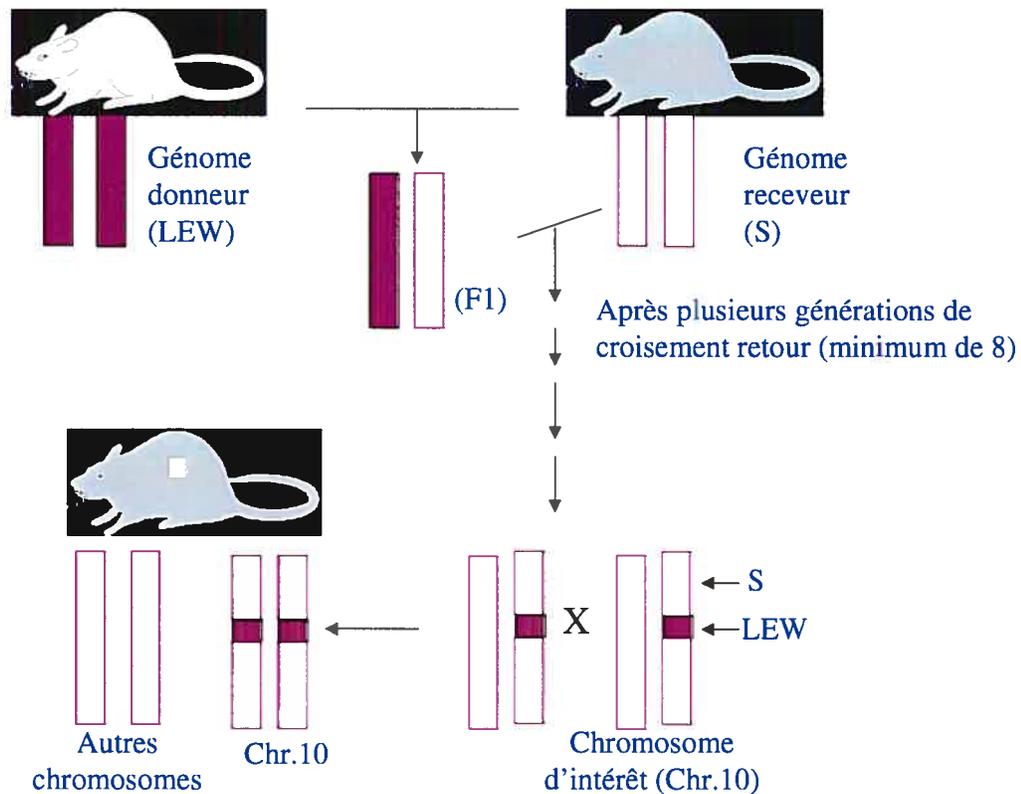


Figure 1.4 : Construction d'une lignée congénique. Illustration de la méthode d'établissement d'une lignée congénique pour une région du Chr.10.

Après une série d'au moins huit (8) croisements-retour, la lignée congénique établie contient un génome constitué à 99.9% (voir tableau I.III, panneau de gauche) du génotype du receveur (ici, le rat S) et à 0.1% du génotype du donneur (ici, le rat LEW). La cartographie de QTL à des régions précises requiert une carte génétique munie de marqueurs anonymes. Les marqueurs anonymes doivent être variants (polymorphiques) entre les deux souches de rats servant à faire les lignées congéniques (Rapp et Deng, 1995). Le polymorphisme entre les marqueurs est nécessaire afin d'identifier le génotype des rats. La méthodologie des rats congéniques est efficace et permet de prouver avec certitude la présence de QTL pour l'hypertension, mais est une méthode qui requiert beaucoup de temps à mettre en

œuvre, soit entre 2.5 et 3 ans pour la création d'une lignée congénique (Markel *et al.*, 1997). En effet, selon la loi d'uniformité des hybrides de la première génération de Mendel énonçant «la première génération d'hybrides est homogène» (<http://pst.chez.tiscali.fr/genetique.htm>), la moitié du matériel génétique d'une génération va être transmise à la génération suivante. Prenant ceci en considération, il faut mathématiquement dix (10) générations pour produire un rat dont 99.9% du génome est celui du donneur. Ceci requiert beaucoup de temps.

Récemment, la méthode de création de congéniques avec l'assistance de marqueurs ('speed congenic') a été développée (Markel *et al.*, 1997). Une carte de marqueurs microsatellites bien développée est nécessaire afin d'appliquer cette méthode. Les marqueurs peuvent servir à suivre le patron de succession des régions génomiques à chaque nouvelle génération. Ainsi, il n'est pas nécessaire de se baser uniquement sur l'information phénotypique pour la détermination des rats à reproduire pour la prochaine génération. Non seulement on choisit les rats à reproduire selon le bon génotype au bon endroit, mais on peut également sélectionner les rats contenant le moins possible de génome donneur. Cette technique réduit grandement le nombre de générations nécessaires à la construction d'une lignée congénique. Effectivement, la sélection des meilleurs reproducteurs résulte en une utilisation constante des meilleurs probabilités statistiques. Le tableau I.III (adapté de Markel *et al.*, 1997) ci-dessous illustre la simplification de la construction de lignées congéniques par la méthode assistée de marqueurs, par rapport à la méthode traditionnelle nécessitant au moins huit (8) générations de croisements retour. Ces données théoriques illustrent comment la sélection des rats à croiser pour la prochaine génération peut réduire le temps nécessaire à la création d'une lignée congénique dotée d'un fort pourcentage de génome receveur, et seulement une infime fraction de génome donneur.

Méthode traditionnelle d'élevage de lignées congéniques			Méthode d'élevage de lignées congéniques assistée de marqueurs			
Génération	% moyen de génotype hétérozygote (D/R)± DS	% génome R	Génération	% moyen génotype hétérozygote (D/R)± DS	% génotype (D/R) du meilleur mâle	% génotype R du meilleur mâle
F ₁	100.00	50.00	F ₁	100 ± 0	100	50
N ₂	50.00 ± 7.07	75.00	N ₂	50.00 ± 7.07	38.32	80.84
N ₃	25.00 ± 5.00	87.50	N ₃	19.16 ± 4.38	11.93	94.03
N ₄	12.5 ± 3.54	93.75	N ₄	5.98 ± 2.44	1.95	99.03
N ₅	6.25 ± 2.5	96.88	N ₅	0.98 ± 0.98	~0	~100
N ₆	3.13 ± 1.76	98.44				
N ₇	1.56 ± 1.25	99.22				
N ₈	0.78 ± 0.88	99.61				
N ₉	0.39 ± 0.63	99.81				
N ₁₀	0.20 ± 0.44	99.90				

Tableau I.III : Stratégie de production de lignées congéniques. Adapté de Markel *et al.*, 1997. F signifie génération filiale, N_x signifie génération x, jusqu'à l'infini. D/R signifie le rapport entre les génotypes donneur / receveur. DS représente 'déviation standard', notation statistique.

Le développement de marqueurs polymorphiques entre les deux souches de rats utilisés pour la création des lignées congéniques est essentielle. En effet, plus la lignée ou la sous-lignée que l'on essaie de produire est d'une courte longueur, plus la carte des marqueurs microsatellites doit être dense. En effet, si l'on vise au départ un criblage du génome complet, on devrait idéalement posséder une carte de marqueurs polymorphiques situées à une distance de 10 cM les uns des autres (Markel *et al.*, 1997). Si la longueur de la souche congénique doit être réduite, de nouveaux marqueurs devraient être produits dans la région, afin de mieux la définir. Le criblage génétique dépend de bonnes cartes de marqueurs, mais peut aussi parfois aider à corriger des erreurs présentes dans les cartes (Markel *et al.*, 1997).

La prémisse derrière l'usage des lignées congéniques est que si la lignée a une pression artérielle plus basse que la souche hypertendue d'origine, on sait que la

région remplacée par le génome normotendu contient un QTL affectant la pression artérielle. En utilisant cette méthodologie, il est important de construire des lignées congéniques négatives pour servir de contrôle. Une lignée négative aura une région congénique adjacente à la lignée ayant un effet sur la pression artérielle. La lignée négative ne doit pas avoir d'effet sur la pression artérielle. Cette technique permet de contrôler pour l'effet de l'arrière plan génétique (Deng, 1992a).

1.9 CARTOGRAPHIE PHYSIQUE

Dès qu'une région d'intérêt est cernée par des lignées congéniques contenant une petite région de 1 à 2 cM, la cartographie physique peut commencer. En effet, la cartographie physique et de transcription à haute résolution est essentielle pour raffiner la région du QTL et pour localiser, identifier et caractériser tous les gènes candidats potentiels qui s'y trouvent (Chalhoub *et al.*, 2001). Une carte de transcription situe tous les gènes transcrits inclus dans une région.

La cartographie physique débute avec le criblage de Yeast Artificial Chromosomes (YAC). Les YAC sont des clones de séquences génomiques d'un génome d'intérêt, dans ce cas-ci le rat, insérés dans un génome circulaire de levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Un clone YAC peut contenir une longueur de séquence allant jusqu'à 2000 kilo paires de bases (Kb) (Cai *et al.*, 1997). Ces clones peuvent servir à ordonner les séquences d'ADN du génome du rat, sur des distances de plusieurs mega paires de bases (Mb) (Shizuya *et al.*, 1992). Ainsi, la petite région contenue entre deux marqueurs que l'on ne peut pas ordonner et identifier devient accessible. L'avantage de l'usage des YACs est qu'ils sont capables de contenir de longues séquences (taille moyenne de 736 Kb dans la librairie de Research Genetics, Invitrogen corp.), ils sont donc idéals à cribler pour débiter la construction d'une carte physique, pour couvrir des larges régions génomiques. Des librairies de YACs pour différents organismes et pour le rat sont disponibles commercialement (Research Genetics, <http://www.resgen.com/products/HAVRYAC.php3>). Cette librairie couvre 9.8 fois le génome du rat. Une telle couverture assure la qualité de la librairie.

Traditionnellement, ces clones étaient criblés par hybridation entre des sondes ADN-ADN ou des sondes ARN-ADN. Maintenant, une technique plus efficace permet le criblage de ces bibliothèques par PCR, avec les marqueurs génétiques d'une région d'intérêt donnée (Green *et al.*, 1990). Certains désavantages existent pourtant avec les YAC. En effet, ils sont fortement sujets à former des chimères : entre 20-30% des clones sont chimériques (Cai *et al.*, 1997). Un clone chimérique contient des séquences non-continues du génome inséré. Par exemple, un clone pourrait contenir une séquence du chr.3 du rat suivie par une séquence du chr.18. Avec de telles chimères, il est difficile de bâtir des cartes fiables. La construction d'une carte de YAC est aussi un long travail, qui nécessite de faire pousser les clones, en faire le séquençage et continuer à 'marcher' à partir des bouts. Les YAC sont aussi fréquemment instables et il est difficile d'en obtenir de l'ADN pur en quantités suffisantes pour produire des bibliothèques (Osoegawa *et al.*, 1998). De plus, il est nécessaire de faire des vérifications pour éviter les chimères. Pour compléter des YACs en cas de chimérisme ou lorsqu'un contig est incomplet, il est possible d'avoir recours aux 'Bacterial Artificial Chromosomes' (BAC).

Les BAC sont des clones de séquences d'un génome d'intérêt, insérés dans le plasmide F de l'*Escherichia coli*. La réplication du plasmide F dans cette bactérie est sous un contrôle strict. Effectivement, le plasmide est maintenu dans un nombre réduit de copies (une ou deux copies par cellule) ce qui réduit les chances de recombinaison entre les ADN qui y sont insérés (Shizuya *et al.*, 1992). Il est possible de cloner des fragments d'ADN jusqu'à 1 Mb dans les BAC utilisant les facteurs F (Shizuya *et al.*, 1992), quoique ceci soit une plus petite capacité que dans le cas des YAC. L'ADN inséré dans les BAC est stable, facile à manipuler, et représente une source d'ADN unique, sans chimères (Shizuya *et al.*, 1992).

D'autres hôtes servant à produire des clones sont les bactériophages, à partir desquels on peut obtenir des 'P1-derived Artificial Chromosomes' (PAC). Ceux-ci sont limités en termes de la largeur des inserts qu'ils peuvent contenir : jusqu'à 100 Kb (Shizuya *et al.*, 1992). Avec les nouvelles techniques de fabrication de bibliothèques (Osoegawa *et al.*, 1998), des bibliothèques qui couvrent plusieurs fois le génome d'intérêt sont fabriquées. De plus, il est maintenant possible de cribler les bibliothèques de BAC

par homologie sur Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html> et <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/>). Pour l'établissement de contigs, ils faut 'marcher' d'un clone à l'autre pour une couverture complète de la région. Les séquences des bouts de BACs sont aussi disponibles pour criblage par homologie sur Internet (http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html).

La cartographie physique a servi dans la découverte de certains gènes associés à des maladies importantes. Par exemple, une étude visant à découvrir les facteurs génétiques associés au diabète de type 1 chez le rat s'est servi de cette technique (Yokoi *et al.*, 2002). En effet, ce groupe a cartographié avec précision un locus préalablement identifié comme contenant un facteur prédisposant au diabète. Par la suite, ils ont poursuivi le clonage positionnel avec de clones de YACs de rat, de BACs de rats et de BACs de souris. Par ceci, ils ont réussi à construire une carte de transcription, c'est-à-dire une carte incluant les gènes qui se trouvent dans la région. Avec une carte de transcription, il est possible d'identifier des gènes candidats, et d'en exclure d'autres (Chalhoub *et al.*, 2001). C'est ainsi qu'ils ont identifié le gène *Cblb*, gène important qui prédispose au diabète (Yokoi *et al.*, 2002).

Un autre exemple dans lequel la construction d'une carte physique a été essentielle est dans le clonage du gène bovin *DGAT1* chez les vaches laitières, gène affectant de façon importante la qualité et le rendement de la production de lait (Grisart *et al.*, 2001). Cette équipe s'est servi d'une carte physique de BAC bien élaborée pour identifier le gène candidat, pour le caractériser et pour déterminer qu'il portait une mutation; tout cela à partir d'un QTL initial de 3 cM. Ceci démontre aussi que cette taille de QTL est idéale pour débiter la caractérisation moléculaire d'une région d'intérêt.

1.10 LE CHROMOSOME 10 ET SES QTL

L'attention que se mérite le Chr.10 a débuté en 1991, avec deux publications fondatrices, soit celle de Howard J. Jacob et collaborateurs (Jacob *et al.*, 1991) et celle de P. Hilbert et collaborateurs (Hilbert *et al.*, 1991). Dans l'article de Jacob et

collaborateurs, une étude de liaison entre un croisement des rats SHRSP et WKY (*c.f.* au tableau I.II) a été menée, mettant en évidence une région du chromosome 10 ayant un LOD de liaison de 5.10. L'étendue du groupe de liaison était sur la quasi-totalité du chromosome 10, le facteur génétique localisé a été nommé *Bp1* et se situe plus précisément à l'extrémité du groupe de liaison, sur une région d'environ 35 cM. Ce facteur induit l'hypertension suite à une surcharge de sodium. Après une étude plus poussée sur le lieu précis de *Bp1*, Jacob et collaborateurs ont démontré que cette région était fortement liée au gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*Eca*). Il est bien connu que l'ECA participe dans la régulation de la pression artérielle. En effet une grande partie des médicaments développés pour traiter l'hypertension agissent en bloquant l'ECA, par exemple le Captopril® et l'Énalapril® (Société Québécoise d'hypertension artérielle, 2002). Dès lors, l'importance de la découverte de ce QTL ne pouvait être négligée.

Le groupe de Hilbert et collaborateurs (Hilbert *et al.*, 1991) a produit des résultats similaires. En effet, ils ont localisé un gène sur le chromosome 10, qu'ils ont nommé *BP/SP-1*. Ce gène serait lié à l'hypertension artérielle dans le croisement entre les rats SHRSP et WKY (*c.f.* tableau I.II). Comme le groupe de Jacob, ils ont par la suite identifié que ce locus était homologue à une région du chromosome 17 humain contenant le gène *ECA*. La région identifiée s'étendait sur une zone d'approximativement 40 cM, le phénotype qui y est associé répond à une charge de sodium, et semble relié à la physiologie rénale.

Une année plus tard, une nouvelle étude de liaison (Deng et Rapp, 1992) chez les rats F2 d'un croisement entre des rats S et des rats MNS a aussi localisé un QTL sur le chromosome 10 du rat, celui-ci situé entre le marqueur du gène de l'*Eca* et le marqueur anonyme D10Mit3.

Une étude subséquente a été effectuée par les mêmes auteurs, Deng et Rapp (Deng et Rapp, 1995). Ils ont mené une analyse de liaison entre des rats de deuxième génération (F2) de deux différents croisements : (S X MNS) et (S X WKY) (*c.f.* tableau I.II). Le premier croisement a révélé une grande zone de liaison à l'hypertension artérielle, soit une région d'environ 46 cM, incluant les gènes *Nos2* et *Eca*. *Nos2* est l'enzyme de synthèse inductible de l'oxyde nitrique (NO). Cette

enzyme a le rôle de produire le NO, auquel on accorde plusieurs fonctions, dont celle de la régulation de la pression artérielle par la vasodilatation (Moncada *et al.*, 1991). En contraste, le croisement entre les souches de rat S et WKY n'ont révélé qu'un locus de liaison avec l'hypertension artérielle, soit le locus centré autour de *Nos2*. De plus, la liaison chez ce deuxième croisement était plus faible qu'avec le croisement (S X MNS). Les auteurs ont conclu qu'il y avait probablement deux QTL individuels liés à la pression artérielle sur le Chr.10 du rat.

Dans l'étude de Kreutz et collaborateurs (Kreutz *et al.*, 1995), la recherche de QTL sur le chromosome 10 du rat se poursuit. Cette fois-ci, la recherche est basée sur une lignée congénique produite accidentellement afin de vérifier la présence du QTL révélé dans l'étude de Hilbert et collaborateurs. La lignée congénique provenait des deux souches parentales SHRSP et WKY, l'arrière-plan génétique du congénique était composé du génotype WKY, et la région remplacée par le génotype SHRSP était d'environ 6 cM. Grâce à cette lignée congénique, deux QTL indépendants ont été mis à l'évidence : un qui influe sur la PA basale, située dans la région congénique, et l'autre, localisé près du gène *ECA* dans une zone 20 cM, qui influe sur la PA après une surcharge de sodium. Ils ont ainsi suggéré qu'au moins deux (2) QTL pour l'hypertension artérielle se trouvaient sur le chromosome 10.

Le groupe de Dukhanina et collaborateurs (Dukhanina *et al.*, 1997) ont été les premiers à construire des lignées congéniques de rat pour localiser des QTL pour l'hypertension sur le chromosome 10. Ils ont produit quatre (4) lignées congéniques, ceux-ci ayant un arrière-plan génétique de souche S avec des régions congéniques de souche MNS. En plus du développement de ces congéniques, ils ont considérablement développé la carte génétique du chromosome 10, essentielle à la poursuite du clonage positionnel (figures 1.5 et 1.6). Leurs lignées congéniques ont permis de prouver la présence d'au moins un QTL sur le chr.10 du rat. Le QTL qu'ils ont défini était localisé à une région de 31 cM, entre les marqueurs microsatellites anonymes D10Mco6 et D10Mco1 (situés sur la figure 1.6). Cette étude a lancé une série de projets visant à raffiner la région du QTL afin de l'identifier.

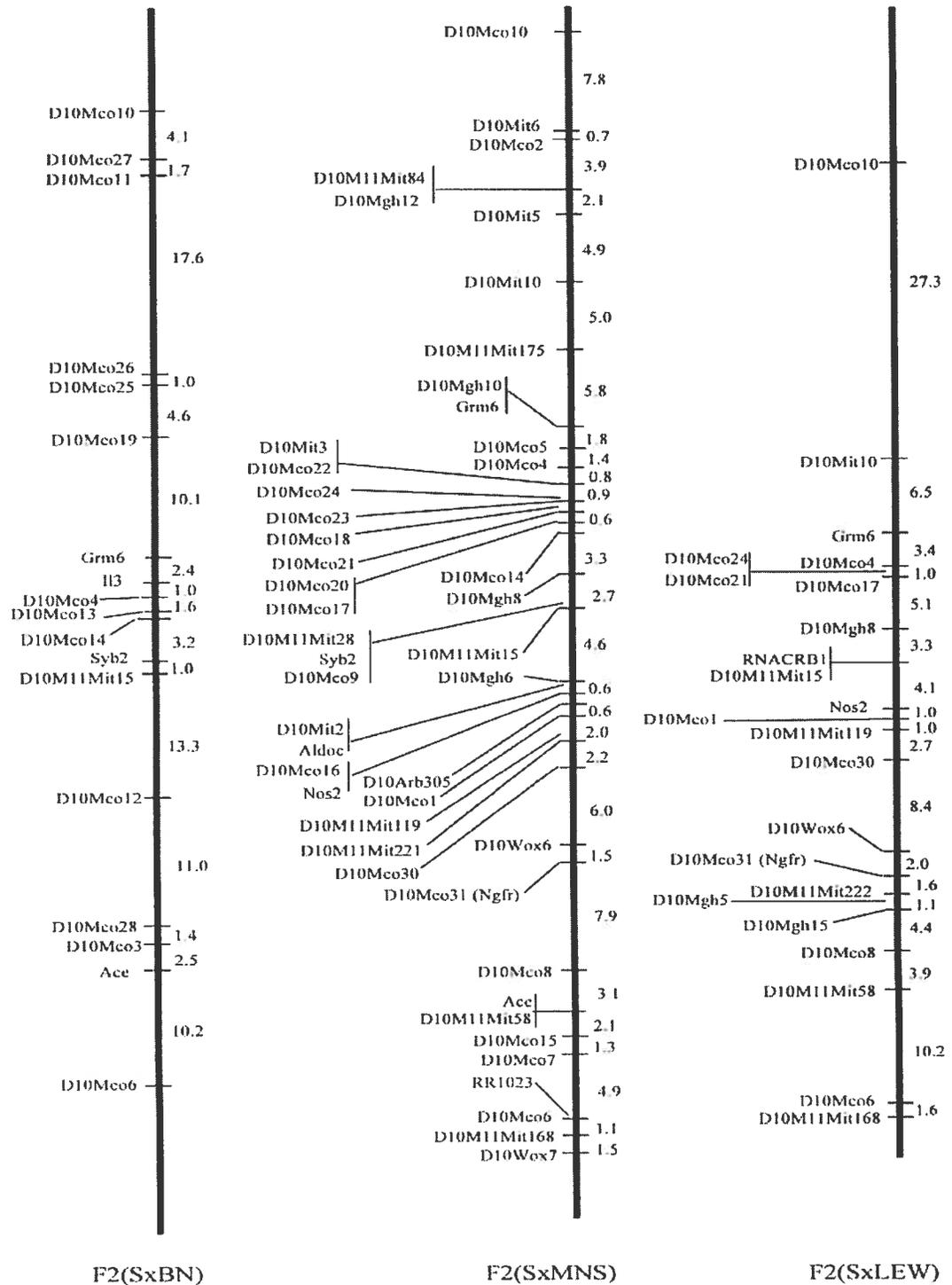


Figure 1.5 : Carte génétique du chromosome 10 pour trois différents croisements de rats. Emprunté de Dukhanina *et al.*, 1997. S, Dahl salt-sensitive; BN, Brown Norway; MNS, Milan Normotensive Strain; LEW, Lewis. Les marqueurs microsatellites sont indiqués à gauche des axes représentant de chromosome 10. Les distances en cM entre les marqueurs sont indiqués à la droite des axes.

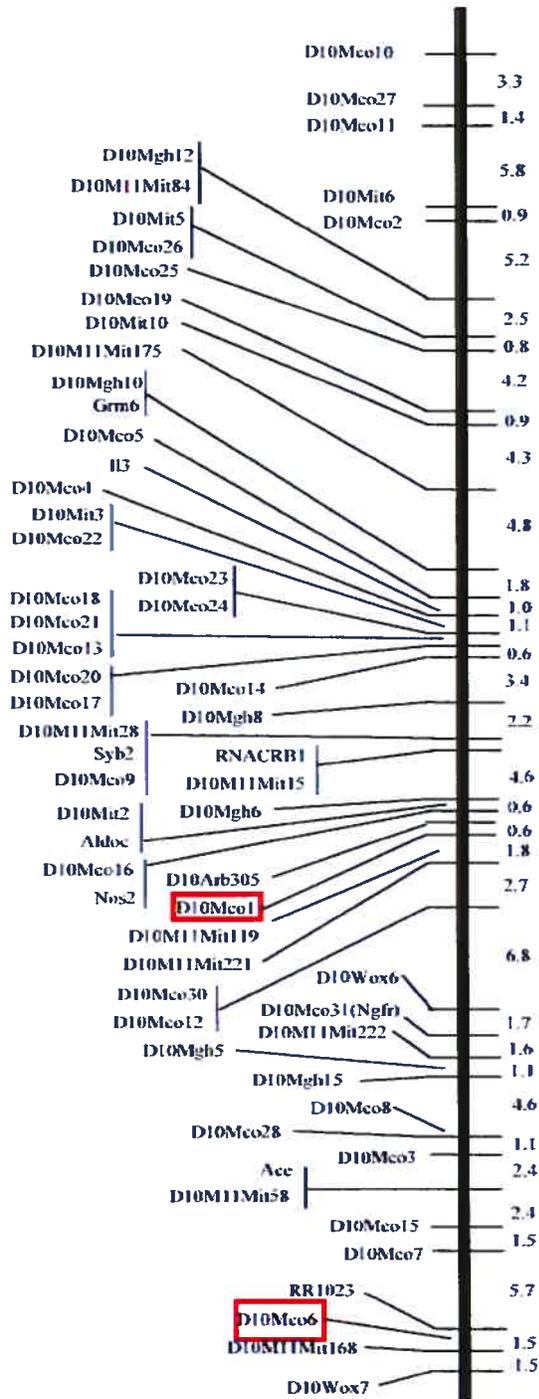


Figure 1.6 : Carte intégrée du Chr.10, dérivée des cartes à la figure 1.5. Adapté de Dukhanina *et al.*, 1997. La structure de la carte est la même qu'à la figure 1.5. Le QTL défini par cette étude se situe entre les deux marqueurs encadrés.

La construction de nouvelles lignées congéniques s'est poursuivie en 1998 (Garrett *et al.*, 1998). Cette fois-ci, les lignées produites avaient une région congénique LEW, sur un arrière-plan génomique S. Leurs études sur les congéniques ont accompagné des analyses de liaison, encore une fois en utilisant des croisements de rats S et de rats LEW. Les rats LEW sont particulièrement résistants à l'hypertension induite par le sel. Les auteurs affirment qu'en cherchant des QTL avec différentes souches de rats normotendus, il est possible d'introduire de nouveaux allèles dans l'expérimentation, permettant possiblement de révéler plus de QTL. Encore une fois, une région du Chr.10 était liée à l'hypertension artérielle. La présence du QTL a été confirmée par les lignées congéniques entre S et LEW. Cette étude soulève le fait important que différents croisements peuvent parfois révéler différents QTL, ou parfois même révéler des résultats contradictoires en termes de la présence ou de l'absence de QTL. Certains QTL (possiblement moins importants) peuvent s'absenter dans certains croisements. Le QTL du chromosome 10 reste présent dans tous les différents croisements effectués : (S X MNS), (S X WKY), (S X BN), ici (S X LEW) et comme vu dans les études précédentes (SHRSP X WKY) (Hilbert *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991).

En 2001, l'équipe menée par Garrett (Garrett *et al.*, 2001) produit une nouvelle série de lignées congéniques. Celles-ci sont de deux types : l'une d'un croisement (S X MNS) et l'autre d'un croisement (S X LEW). Elles servent à définir plus précisément la région du QTL trouvée en 1998. En fait, ces lignées prouvent qu'il existe deux (2) QTL chez le congénique MNS, le premier de moins de 2.6 cM, et le second de moins de 3.2 cM. Par contre, chez le congénique avec le rat LEW, seulement un QTL a été dévoilé et raffiné, d'une région de moins de 12 cM (figure 1.7). Parallèlement, cette étude a établi une carte d'homologie entre le chromosome 10 du rat, le chromosome 11 de la souris, et le chromosome 17 humain.

Au même moment, l'équipe menée par Deng (Deng *et al.*, 2001) définissent aussi deux (2) QTL sur le chromosome 10. Ils se servent de lignées congéniques entre S et LEW. Leur premier QTL est d'une longueur de 15 cM, tandis que le deuxième est de moins de 12 cM. Il y a un certain chevauchement dans les régions de leurs QTL avec ceux de l'étude menée par Garrett (Garrett *et al.*, 2001) (figure 1.7),

quoiqu'ils soient légèrement décalés l'un par rapport à l'autre. La recherche de QTL sur le chr.10 et le raffinement de leurs régions se poursuit. Le but est de les identifier.

Chromosome 10 Map

QTL localisation in the rat

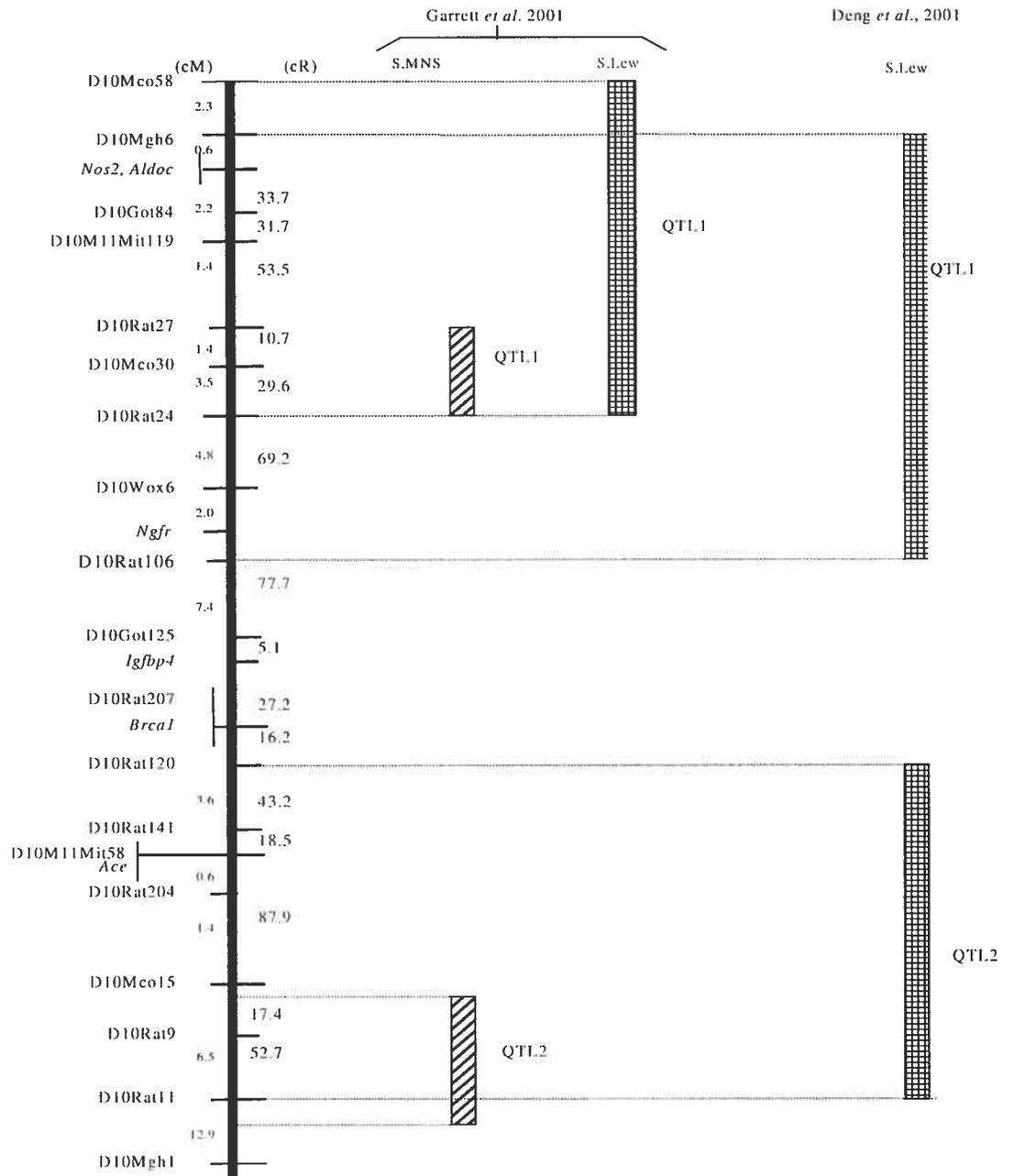


Figure 1.7 : Carte indiquant les QTL initiaux. Adapté de Garret et al., 2001 et de Deng et al., 2001

1.11 HOMOLOGIE

Le but ultime de la recherche de QTL pour la pression artérielle dans un modèle de rat est de trouver leurs équivalences chez l'humain, pour élucider les causes de l'hypertension essentielle humaine. Les études sur des modèles animaux peuvent aider à trouver des gènes associés à l'hypertension essentielle humaine en trois temps. Premièrement, il est possible que les QTL identifiés chez le rat puissent être directement utilisés pour identifier des QTL humains dans les régions homologues. Puisque plusieurs gènes sont conservés à travers l'évolution, il est probable de trouver des QTL pour le contrôle de la PA qui soient conservés (Deng, 1998). Cette possibilité se base sur des études d'homologie. Deuxièmement, la localisation d'un QTL à une large région chromosomique chez le rat, avant de parvenir à identifier ce QTL de façon moléculaire, peut tout de même être utile à la recherche de gènes candidats. En effet, si un QTL chez le rat se retrouve dans la région homologue à un gène candidat humain, ce candidat se doit d'être scruté (Deng, 1998). Par exemple, le gène humain *ECA* localisé sur le CHR.17 a été divulgué comme candidat par une étude de liaison sur le chr.10 du rat (Hilbert *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991). Ce candidat a été par la suite cloné, mais n'a pas été soutenu comme candidat après analyse : 5 nucléotides différaient dans sa séquence entre les souches SHRSP et WKY, mais sa fonction enzymatique n'était pas altérée (Koike *et al.*, 1994). D'autres candidats pourraient encore être révélés de cette manière. Troisièmement, les études de population peuvent révéler différents gènes selon chaque population. Ainsi, il est important d'étudier plusieurs populations de rats afin de soulever tous les loci possibles (Deng, 1998). Une telle variété d'études sur les populations humaines serait difficile.

Afin que les études sur des modèles de rats aient une applicabilité, il est essentiel de construire des cartes d'homologie avec l'humain. Pour plusieurs chromosomes, les homologies avec l'humain consistent en de multiples petits segments de syntenie conservée (Dutil *et al.*, 2001) sur une série de chromosomes différents (Smoller *et al.*, 2001). Il en résulte qu'il est parfois difficile d'identifier les gènes candidats homologues autour de la région d'un QTL. Dans le cas du chr.10 du

rat, par contre, la majeure partie du chromosome est homologue au CHR 17 humain et au chromosome 11 de la souris. Ceci facilite la détection des gènes candidats. De plus, la recherche sur ce chromosome est particulièrement pertinente à l'hypertension humaine. En effet, trois études de liaison indépendantes sur populations humaines ont conclu que le CHR 17 humain contient un QTL pour la pression artérielle (Julier *et al.*, 1997; Baima *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2000). Ainsi, tout QTL dévoilé dans la région homologue chez le rat, c'est-à-dire sur le chr.10, justifie potentiellement l'hypertension artérielle essentielle humaine. La figure 1.8 illustre la localisation des QTL sur le CHR 17 humain et la correspondance au chr.10 du rat et au chr.11 de la souris.

En somme, l'hypertension artérielle est une maladie complexe, qui dépend d'une multitude de facteurs. Afin d'étudier les causes génétiques de la maladie, plusieurs modèles de rats ont été développés, dont celui du rat Dahl « salt-sensitive ». Chez ce rat, le contrôle de la PA se fait de façon anormale, ce qui occasionne une hausse de la PA. Afin de localiser les gènes responsables de l'augmentation de la tension artérielle, il est possible de bâtir des lignées congéniques de rats et de procéder au clonage positionnel de régions génétiques. Ceci se fait avec des outils tels les cartes génétiques arborant une multitude de marqueurs microsatellites. Il a ainsi été possible de cartographier quelques QTL pour l'hypertension artérielle sur le chromosome 10 du rat. Ce chromosome est entre autres hautement homologue au chromosome 17 humain, qui lui-même est identifié comme ayant des régions de liaison avec l'hypertension artérielle chez l'humain.

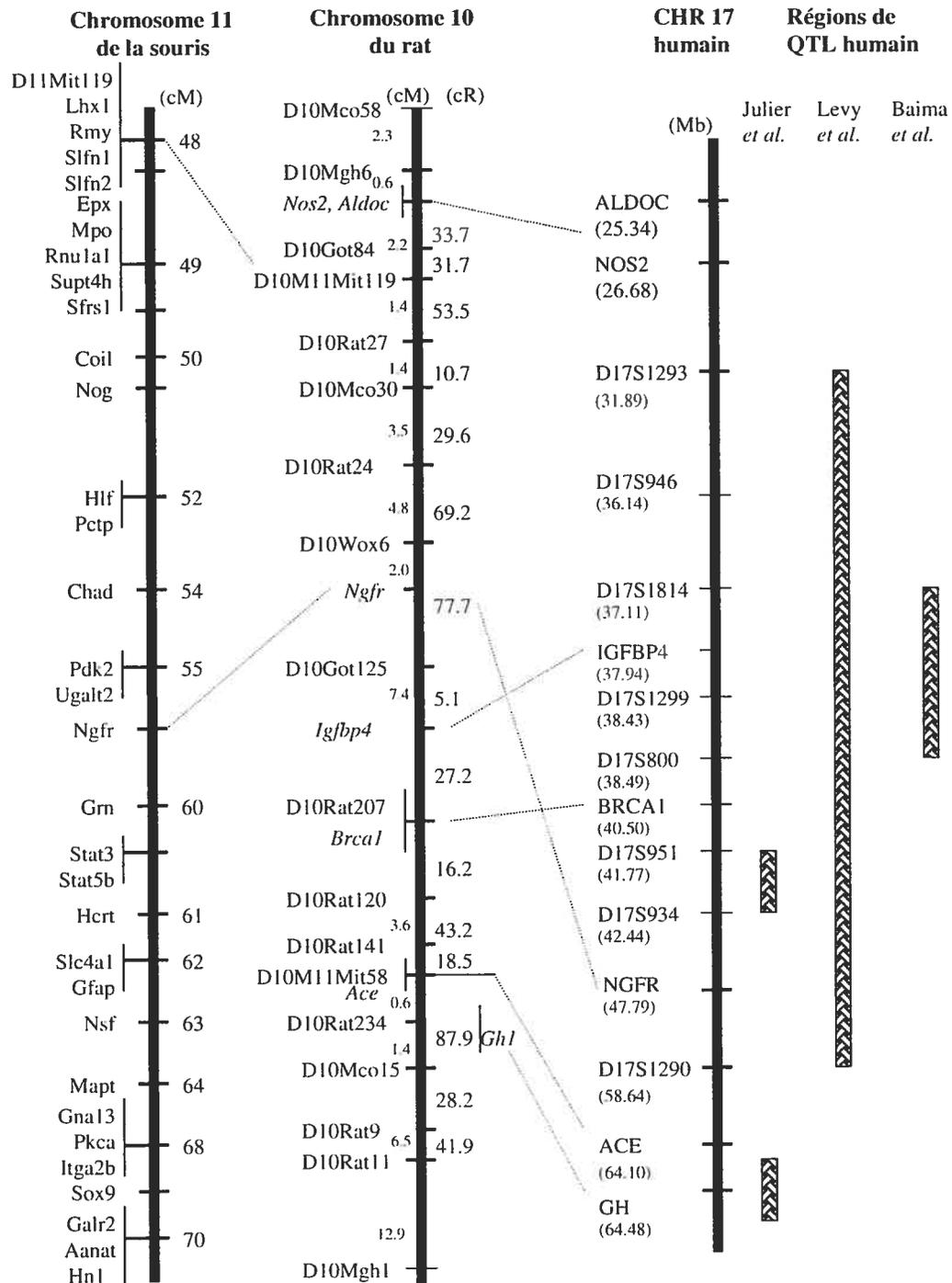


Figure 1.8 : Carte d'homologie entre le chr.10 du rat, le chr.11 de la souris et le CHR 17 humain. Les distances indiqués sur la carte de la souris sont en cM, ceux sur la carte du rat sont en cM et en cR, tandis que ceux sur la carte de l'humain sont en méga paires de bases (Mb). Adapté de Julier *et al.*, 1997; Baima *et al.*, 1999, Levy *et al.*, 2000 et Garrett *et al.*, 2001. Les régions des QTL humains sont représentés par les barres verticales hachurés à la droite.

CHAPITRE 2 :

MÉTHODOLOGIE

2.1 RATS

Les rats Dahl salt-sensitive (S) qui ont été utilisés pour bâtir les lignées congéniques ont été fournis à Dr Alan Deng par Dr John Rapp. Afin d'assurer l'intégrité génétique de tous les rats S dans le laboratoire, une méthodologie de contrôle de qualité a été appliquée. L'ADN de tous les rats utilisés pour maintenir la souche et pour les mesures de pression artérielle (PA) a été extrait. Pour assurer que le génotype des rats S reste identique à ceux obtenus à l'origine du Dr J. Rapp, les rats ont subi des tests de distinction génétique et physique. Le génotype des rats aux marqueurs indiqués au tableau II.1 a été déterminé pour chaque troisième génération d'élevage des rats S. De plus, à chaque génération, au moins un marqueur choisi par hasard a été testé sur les rats. L'échantillon d'ADN des rats S pour chaque marqueur est comparé à un standard S des rats utilisés pour les études originales. La distinction physique est obtenue par l'étiquetage de chaque nouveau rat dès sa naissance par une bague dans la peau et par une marque à l'oreille. Cette précaution réduit les chances d'erreurs de manipulation. Les rats Lewis/(Charles River, CrIBR) (LEW) ont été achetés de Charles River (LaSalle, PQ, Canada). La méthodologie de contrôle de la qualité des rats S a aussi été appliquée aux rats LEW. Les protocoles de manipulation et de maintenance des animaux ont été approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA). Toutes les procédures pour l'expérimentation étaient en règle avec les directives des instances de réglementation locales, provinciales et fédérales.

2.2 SCHÈME D'ÉLEVAGE DES LIGNÉES CONGÉNIQUES

Les rats des souches S et LEW ont d'abord été accouplés pour produire des rats de la première génération filiale, les rats F_1 . Nous avons ensuite fait des croisements retour (mieux connu sous le terme anglais 'backcross') en accouplant les F_1 avec des rats S, produisant ainsi la première génération de backcross (BC1). Nous avons procédé par la méthode de création de congéniques avec l'assistance de marqueurs ('speed congenic'). Les rats BC1 ont été génotypés pour 96 marqueurs

placés à distances à peu près égales à travers le génome. La distance moyenne entre ces marqueurs était de 18 cM (voir tableau II.I). Pour la seconde ronde de croisements retour (production de rats BC2), nous avons choisi un rat qui était hétérozygote de l'allèle Dahl salt-sensitive (S) et l'allèle LEW, exprimé SL, pour la région d'intérêt sur le chr.10, et qui parallèlement était le plus homozygote SS possible sur le reste du génome. Les rats BC2 ont été génotypés et criblés comme les rats BC1, pour dériver le meilleur reproducteur pour une troisième ronde de croisements retour. Nous avons poursuivi ce processus jusqu'à la génération BC5. À ce moment, tous les marqueurs contenus dans la région d'intérêt (figure 2.1) sur le chr.10 étaient de génotype hétérozygote SL, tandis que les autres marqueurs du reste du génome étaient homozygotes SS. La région d'intérêt visée était basée sur les études précédentes (Dukhanina *et al.*, 1997; Garrett *et al.*, 1998). Le tableau II.II rapporte un estimé du pourcentage d'hétérozygotie à chaque génération de BC.

Chr.	Marqueurs testés
1	D1Wox25 - D1Mco27 - Sa - D1Uia12 - D1Arb33 - D1Rat19 - D1Rat304
2	<i>Camk2d</i> - <i>Gca</i> - D2Rat302 - <i>Cpb</i> - D2Rat199 - D2Uia5
3	D3Rat107 - D3Rat17 - D3Rat24 - D3Rat66 - D3Wox3 - D3Rat52
4	D4Mgh1 - D4Mgh16 - D4Uia1 - D4Mit17 - D4Uia4
5	D5Rat130 - D5Uia8 - D5Mco2 - <i>Ela2</i>
6	D6Rat105 - D6Mit1 - D6Mgh3
7	D7Mgh1 - D7Rat152 - D7Rat44 - D7Rat110 - D7Rat18 - D7Rat128 - D7Rat115
8	D8Mgh11 - D8Rat134 - D8Rat43 - D8Uia2 - D8Rat55
9	D9Rat64 - D9Uia9 - D9Wox23
10	D10Mco10 - D10Mco17 - D10Mgh6 - <i>Nos2</i> - D10M11Mit119 - D10Rat27 - <i>Ngfr</i> - D10Rat106 - D10Rat120 - D10Rat141 - D10Mco15 - D10Rat11 - D10Mgh1
11	D11Rat50 - D11Mit1 - D11Uia1
12	D12Mit6 - D12Rat32 - D12Mit4
13	D13Mgh4 - D13Uia3 - D13Uia8
14	D14Wox10 - D14Uia2 - D14Uia1
15	D15Uia8 - D15Mgh2 - D15Rat126
16	D16Rat14 - D16Rat67 - D16Uia2 - D16Mit2
17	D17Wox7 - D17Mit5 - D17Mgh5 - <i>Edn1</i>
18	D18Uia6 - D18Mit8 - D18Mco6 - D18Wox7
19	D19Rat82 - D19Rat25 - D19Rat57
20	D20Wox3 - D20Wox1 - D20Mgh1
X	DXUia2 - DXMco1 - DXRat93

Tableau II.I: Marqueurs microsatellites utilisés pour vérifier les souches et pour construire les lignées congéniques.

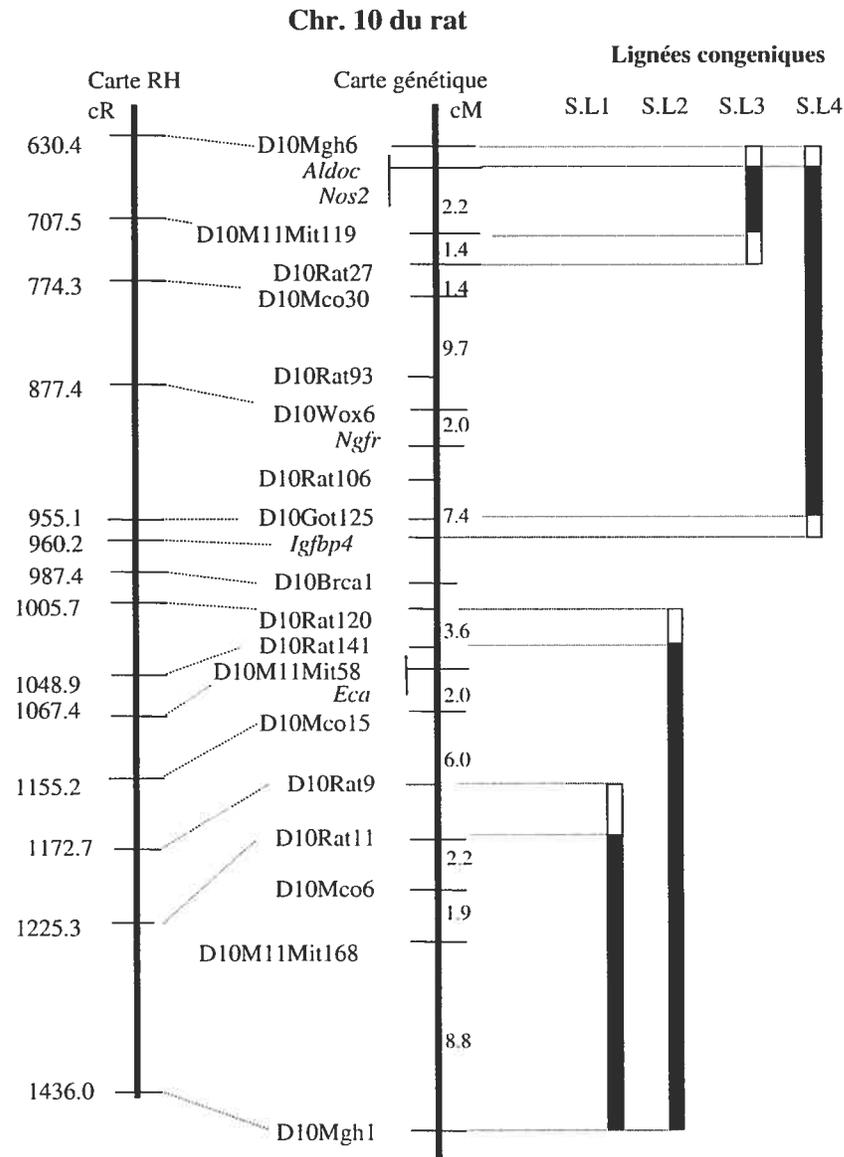


Figure 2.1 : Carte génétique du chr.10 basé sur une population F2 (S X LEW), les distances à la droite de l'axe principal sont en centimorgans (cM). L'ordre des marqueurs sur la carte a été déterminé initialement par des études de liaison en utilisant le programme MAPMAKER, et cet ordre a été vérifié lors d'évènements de recombinaison durant la construction des lignées congéniques. L'axe de gauche représente l'échelle des distances entre les marqueurs du chromosome 10 en centirads (cR). Quatre lignées congéniques ont été produites, nommées S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4. Les régions d'intérêt dans lesquels le génotype LEW remplace le génotype S sont désignées par les longues barres noires, tandis que les régions d'incertitude sont désignés par les barres transparentes aux bouts des région LEW des lignées congéniques. Les gènes représentés sont *Eca*, l'enzyme de conversion de l'angiotensine; *Aldoc*, aldolase c; *Igfbp4*, 'insulin-like growth factor binding protein

4'; *Ngfr*, 'nerve growth factor receptor' et *Nos2*, la forme inductible de la sythase d'oxyde nitrique. Les autres marqueurs sur la carte sont anonymes.

Lignées	Génération	% d'hétérozygotie SL de l'arrière-plan génomique
S.L1	BC1	(43/84) = 51%
	BC2	(20/84) = 24%
	BC3	(13/84) = 16%
	BC4	(9/93) = 10%
	BC5	(0/93) = 0%
S.L2	BC1	(43/84) = 51%
	BC2	(20/84) = 24%
	BC3	(13/84) = 16%
	BC4	(5/91) = 5.5%
	BC5	(0/91) = 0%
S.L3	BC1	(43/84) = 51%
	BC2	(20/84) = 24%
	BC3	(13/84) = 16%
	BC4	(5/93) = 5.4%
	BC5	(0/93) = 0%
S.L4	BC1	(43/84) = 51%
	BC2	(20/84) = 24%
	BC3	(13/84) = 16%
	BC4	(5/91) = 5.5%
	BC5	(0/91) = 0%

Tableau II.II : Pourcentage d'hétérozygotie à chaque génération de croisement retour (BC). Les pourcentages sont calculés par rapport au nombre de marqueurs au tableau II.I qui sont restés hétérozygotes et qui n'étaient pas localisés dans la région d'intérêt (nombre de marqueurs SL / nombre de marqueurs testés à l'extérieur de la région). Les calculs ont été faits comme suit : 84 marqueurs, dont 82 provenant d'autres chromosomes, D10Mco10 et D10Mco17 provenant du chr.10. S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4 désignent les lignées congéniques. Ces lignées ont commencé à diverger à la génération BC4. BC désigne 'backcross'.

Pour établir une lignée congénique, un rat BC5 a été accouplé à un rat S pour dupliquer le segment d'intérêt. Ensuite, un rat male et une ratte ont été croisés pour générer des rats homozygotes LEW (LL) pour les allèles de la région d'intérêt, mais homozygotes SS pour le reste de leur génome, incluant le reste du chromosome 10 (voir figure 2.1). Les quatre (4) lignées congéniques suivantes ont été produites : S.LEW- D10Rat11/D10Mgh1, S.LEW- D10Rat141/D10Mgh1, S.LEW- *Nos2*/D10M11Mit119 et S.LEW- *Nos2*/D10Got125. Ils ont été nommés S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4 respectivement. Les régions chromosomiques homozygotes LL pour les

régions d'intérêt sont désignées par des barres noires sur la figure 2.1. Tous les marqueurs dans la région ont été génotypes pour chaque lignée congénique en question.

2.3 MESURES DE PRESSION ARTÉRIELLE

Les paires de reproducteurs des rats S et de chaque lignée congénique à l'étude ont été accouplés simultanément dans le même établissement. Des rats mâles ont été choisis de deux portées distinctes de la même lignée, afin de minimiser l'effet de la portée. Les rats choisis ont été sevrés à 21 jours, maintenus sur une diète faible en sel (0.2% NaCl, Harlan Teklad 7034), puis à partir de l'âge de 35 jours et jusqu'à la fin de l'expérimentation, ils ont été nourris une diète riche en sel (2% NaCl, Harlan Teklad, 94217).

Lorsque les rats ont atteint l'âge de 56 jours, avec un poids corporel entre 250g et 320g, des sondes de télémétrie implantables (model PA-D70, Data Sciences Inc.) leur ont été chirurgicalement implantées. La procédure a suivi celle recommandée par Data Sciences (St. Paul, Minnesota, USA). Les rats ont été anesthésiés avant la chirurgie par inhalation d'isoflurane à une dose de 4% pour 3 minutes. Pendant la chirurgie, l'état d'anesthésie a été maintenu par l'isoflurane à une dose de 1.5–2%. L'implantation du cathéter de pression, qui contient le gel biocompatible à sa pointe et le fluide non-compressible liant la pointe au senseur de pression, a été mené par l'artère fémorale jusqu'à ce que ce cathéter atteigne l'aorte abdominale. Le cathéter a été retenu et fixé par des sutures au vaisseau sanguin. Le corps de l'engin de télémétrie, qui regroupe le senseur de pression, le module électronique réutilisable et la batterie a été fixé au muscle de la cavité abdominale. L'engin de télémétrie est illustré à la figure 2.2. Les rats ont eu une convalescence de 10 à 17 jours après la chirurgie. Durant les trois (3) premiers jours, du Jell-O® contenant l'analgésique buprenorphine à 0.5% mg/kg leur a été nourri. Ensuite, ils ont été nourris d'une diète de laits frappés Ensure® avec du chocolat, en plus de leur diète normale de 2% NaCl. Ce supplément de lait frappé durait environ cinq (5)

jours, afin de faciliter leur appétit et encourager la prise de poids. En tout, les rats ont eu au moins dix (10) jours pour la récupération post-opératoire. Le poids des rats a été minutieusement surveillé quotidiennement, et seuls les rats avec des poids corporels comparables ont été retenus pour les mesures de pression artérielle subséquentes.

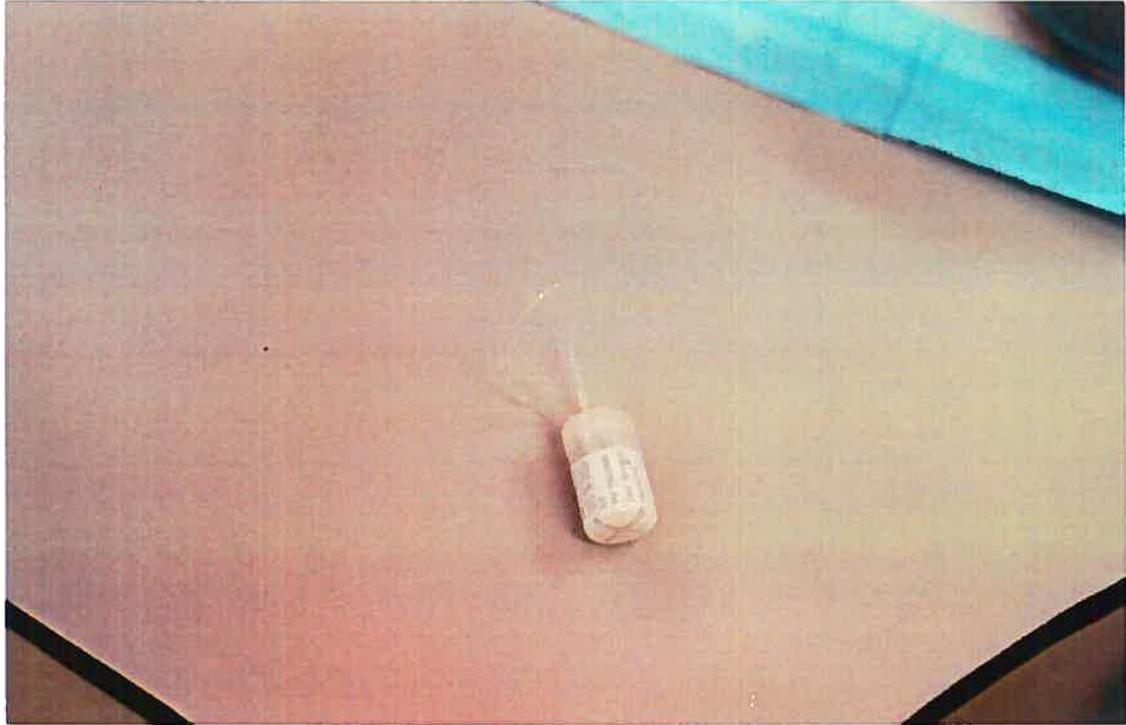


Figure 2.2 : Implant télémétrique de Data Sciences Inc. et son cathéter.

Le système de télémétrie de Data Sciences Inc. a été utilisé pour mesurer la pression artérielle (PA). Chaque sonde de télémétrie a été calibrée avant usage et nettoyée après, selon les recommandations du manufacturier. À la 30^{ième} journée suivant le début de mesures de PA, les animaux ont été sacrifiés pour l'extraction des données physiologiques suivantes.

2.4 EXTRACTION DES TISSUS

Les rats ont été sacrifiés par décapitation. Les organes d'intérêt ont été retirés, nettoyés des tissus connectifs et gras environnants, tamponnés afin de retirer le sang excédentaire et puis ils ont été pesés immédiatement. Les organes d'intérêt étaient les reins, le cœur et l'aorte. Le cœur entier a par la suite été disséqué en deux parties: le ventricule droit et le ventricule gauche. Le poids de chaque organe a été corrigé pour le poids corporel de l'animal complet, selon une procédure suggérée dans la littérature (Masciotra *et al.*, 1999). Le poids de l'aorte a aussi été corrigé pour sa longueur, mesurée à la règle (figure 2.3).

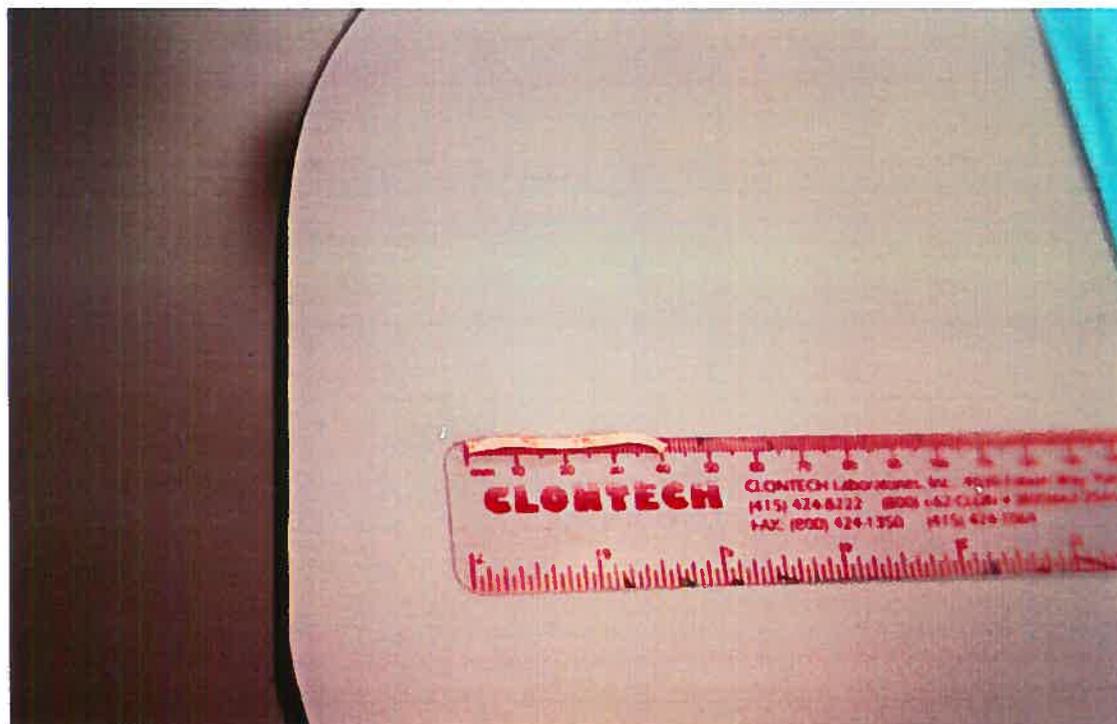


Figure 2.3 : Mesure de la longueur de l'aorte à la règle graduée.

2.5 ANALYSE STATISTIQUE

Pour comparer les différences, les niveaux de signification statistique ou le manque de différence significative dans la PA et dans les autres paramètres

physiologiques entre les rats S et les lignées congéniques, l'analyse de variation à mesures répétées (ANOVA), suivi par le test de Dunnett effectués par le programme SYSTAT 9 (SPSS Sciences, Chicago, Illinois, USA) ont été appliqués. À chaque fois, la lignée congénique a été comparée au groupe témoin de la souche S. Dans l'analyse, une composante de PA (pression artérielle moyenne (MAP), pression artérielle systolique (SAP), pression artérielle diastolique (DAP) ou fréquence cardiaque (HR)) a été comparée à chaque jour entre les lignées pour la période complète de la télémétrie.

2.6 EXTRACTION DE L'ADN ET ÉTABLISSEMENT DES GÉNOTYPES

L'ADN de chaque rat a été extrait à partir d'une biopsie de la pointe de la queue. L'ensemble d'extraction 'Qiagen Genome Kit'® (Mississauga, Ontario, Canada) a servi à extraire l'ADN. Le génotype de chaque rat a été déterminé par amplification en chaîne par polymérase (ACP), mieux connu sous 'polymerase chain reaction (PCR)'. Les cycles d'ACP pour les marqueurs de rats étaient programmés comme suit : 95°C pour 5 min; 30 cycles de 94°C pour 40 s, 50, 55 ou 60°C pour 40 s, et 72°C pour 1,5 min; et finalement une extension pour 5 min à 72°C.

2.7 CARTOGRAPHIE PAR HYBRIDES DE RADIATION

Un panneau de 96 hybrides de radiation (RH) entre le rat et le hamster a été acheté de Research Genetics (Huntsville, Alabama, USA; <http://www.resgen.com>). Chaque marqueur à cartographier a été génotypé en utilisant l'ADN du panneau RH amplifié par ACP (selon le protocole élaboré ci-haut). Pour localiser un marqueur d'intérêt par rapport au cadre RH existant, les résultats du marqueur étaient soumis au site Internet suivant : <http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER>.

CHAPITRE 3 :

RÉSULTATS

3.1 CONSTRUCTION DES LIGNÉES

La construction de quatre (4) lignées congéniques a été accomplie en cinq (5) générations seulement, en appliquant la technique de création de congéniques assistée de marqueurs, c'est-à-dire en sélectionnant le meilleur rat reproducteur à chaque génération de BC. Nos résultats sont les mêmes que ceux prédits théoriquement (Markel *et al.*, 1997). Tous les marqueurs (tableau II.I) génotypés étaient homozygotes SS à la génération BC5, sauf pour la région d'intérêt (figure 2.1). Les régions chromosomiques contenant les substitutions LEW dans les lignées congéniques sont représentés à la figure 2.1 par les barres verticales noires. En somme, le génotype de la région d'intérêt du rat S a été remplacée par les séquences homologues du rat LEW, donc une région LL sur un arrière-plan génétique SS a été produite.

3.2 ÉTUDE DE PRESSION ARTÉRIELLE

Les rats ont été élevés selon les méthodes établies au chapitre précédent. Toutes les composantes de la pression artérielle ont été mesurées, dont la pression artérielle moyenne (MAP), la pression artérielle systolique (SAP), la pression artérielle diastolique (DAP) et la fréquence cardiaque (HR) pour les lignées congéniques S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4, et pour les souches parentales S et LEW. Les résultats sont présentés aux figures 3.1 et 3.2. Pour alléger la présentation des graphiques, chaque point dans le temps est une moyenne des mesures sur 24 heures, prises à chaque 4 heures.

3.3 CARTOGRAPHIE DE DEUX QTL POUR LA PRESSION ARTÉRIELLE

La figure 3.1 montre la différence qui existe entre les souches parentale S et LEW pour les paramètres de la PA. En effet, la MAP, la SAP et la DAP de LEW est significativement ($P < 0,001$) plus basse que celle de S. Les mesures des lignées

congéniques ayant un effet sur la pression artérielle devraient donc se retrouver entre les deux courbes présentés à la figure 3.1.

La figure 3.2 montre la comparaison de la MAP, la SAP et la DAP entre les rats S et les rats des lignées congéniques S.L1 et S.L3. La MAP, la SAP et la DAP des rats de la lignée S.L3 étaient plus basses ($P < 0,03$) que ceux des rats de la souche S. Au contraire, la MAP, SAP et DAP des rats S.L1 n'étaient pas différents ($P > 0,80$) de ceux des rats S. Les mesures de MAP de S.L2 et de S.L4 étaient plus basses, ($P < 0,0001$) et ($P < 0,04$) respectivement, que celles de la souche S (figure 3.3). Les valeurs de DAP et de SAP étaient concordantes avec celles de la MAP. Le manque d'effet sur la PA de la lignée S.L1 indique que quoique fasse cette portion du génome LEW sur l'arrière-plan S dans la lignée S.L2, elle n'influence pas la PA. Conséquemment, au moins deux (2) QTL doivent exister dans les segments du chr.10, l'un dans la région de S.L3 entre les marqueurs D10Mgh6 et D10Rat27 (4,2 cM), et l'autre entre les marqueurs D10Rat120 et D10Rat11 (moins de 12,1 cM). La carte de la figure 3.6 illustre la localisation des deux QTL.

Contrairement aux mesures de pression artérielle, les fréquences cardiaques des lignées congéniques S.L2 et S.L4 n'étaient pas différentes ($P > 0,05$) de la fréquence cardiaque de S (figure 3.4).

3.4 ÉVALUATION DE L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE, AORTIQUE ET RÉNALE

Le poids des tissus d'intérêt de chaque lignée congénique a été mesuré et comparé au poids des tissus de la souche S. La figure 3.5 illustre la comparaison entre les poids cardiaque, aortique, et rénal des lignées congéniques et de S, tous corrigés pour le poids corporel de l'animal. Le poids aortique est aussi corrigé pour la longueur de la section excisée. Le poids cardiaque, le poids du ventricule gauche et de l'aorte étaient significativement baissés pour les lignées S.L2, S.L3 et S.L4 ($P < 0,003$), mais pas pour la lignées S.L1 ($P > 0,16$) (Figure 3.5, a, c). En comparaison, seulement le poids rénal de S.L3 était significativement plus bas ($P < 0,05$) que celui

des rats S, tandis que le poids rénal de S.L1, S.L2 et S.L4 ne différait pas de celui des rats S (Figure 3.5b).

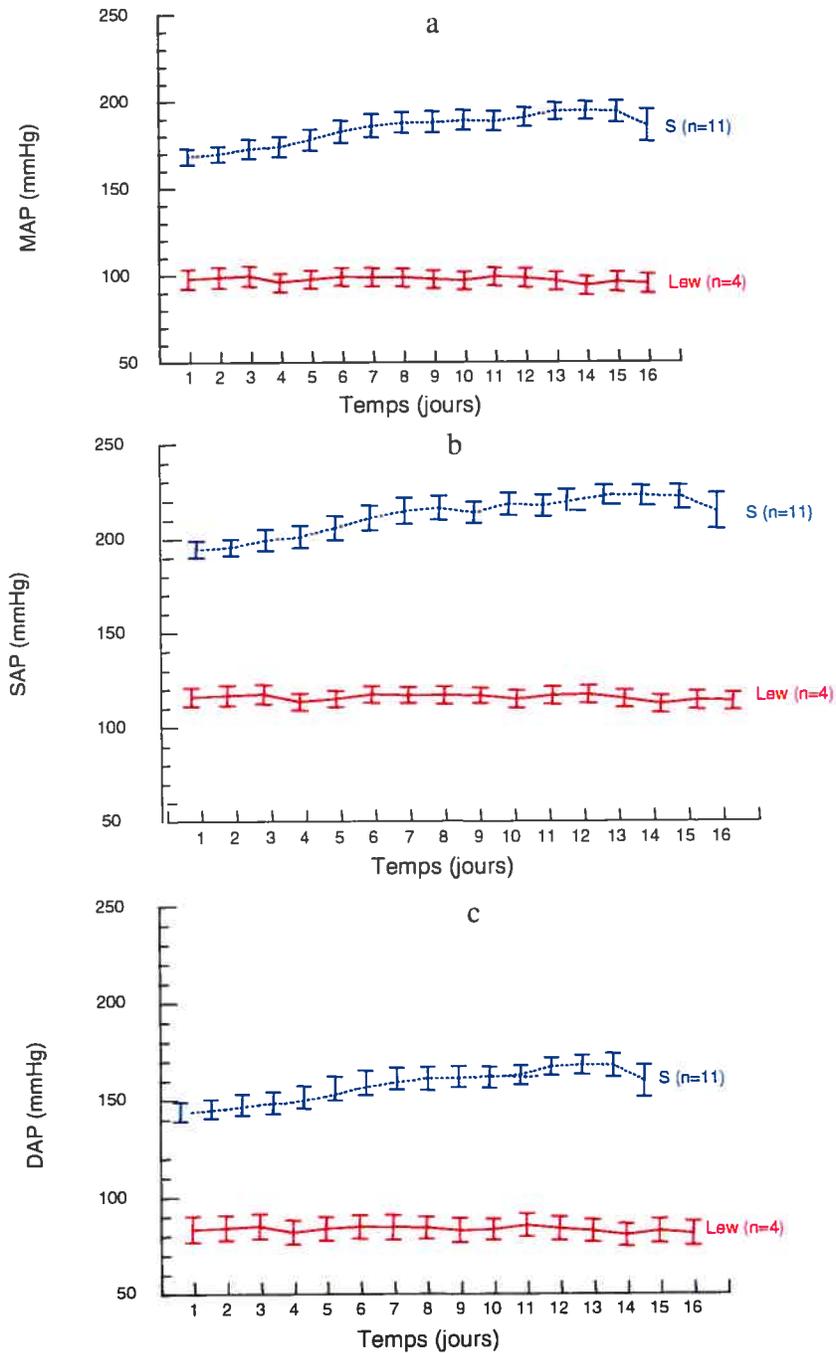


Figure 3.1 : Comparaison de a) pression artérielle moyenne (MAP), b) pression artérielle systolique (SAP) et c) pression artérielle diastolique (DAP) entre la souche parentale S ($n = 11$) et la souche parentale LEW ($n = 4$). Pour les trois paramètres, la différence entre les deux lignées était fortement significative ($P < 0,0001$).

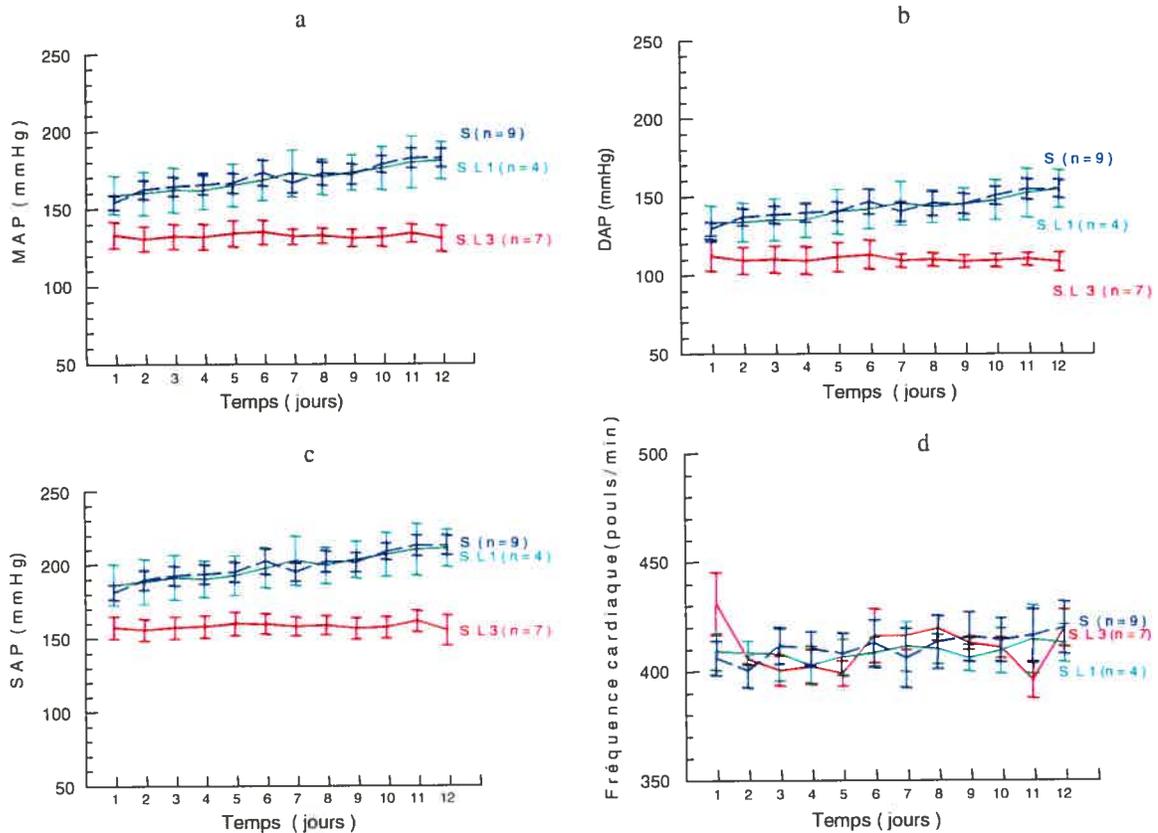


Figure 3.2 : Comparaison des éléments de la pression artérielle (PA) entre la souche S et les lignées congéniques S.L1 et S.L3. a) La pression artérielle moyenne (MAP), b) la pression artérielle diastolique (DAP), et c) la pression artérielle systolique (SAP) étaient significativement plus basses ($P < 0.03$) chez S.L3 ($n = 7$) que chez S ($n = 9$). Au contraire, les différences de MAP, DAP et SAP entre S.L1 ($n = 4$) et S ($n = 9$) n'étaient pas significatives ($P > 0.80$). d) les fréquences cardiaques n'étaient pas différentes ($P > 0.50$) de S pour aucune des lignées. Chaque point de temps sur les graphiques représentent une moyenne de lectures sur 24 heures. S.L1 et S.L3 représentent les souches congéniques S.LEW-D10Rat11/D10Mgh1 et S.LEW-Nos2/D10M11Mit119 respectivement. S représente la souche Dahl salt-sensible.

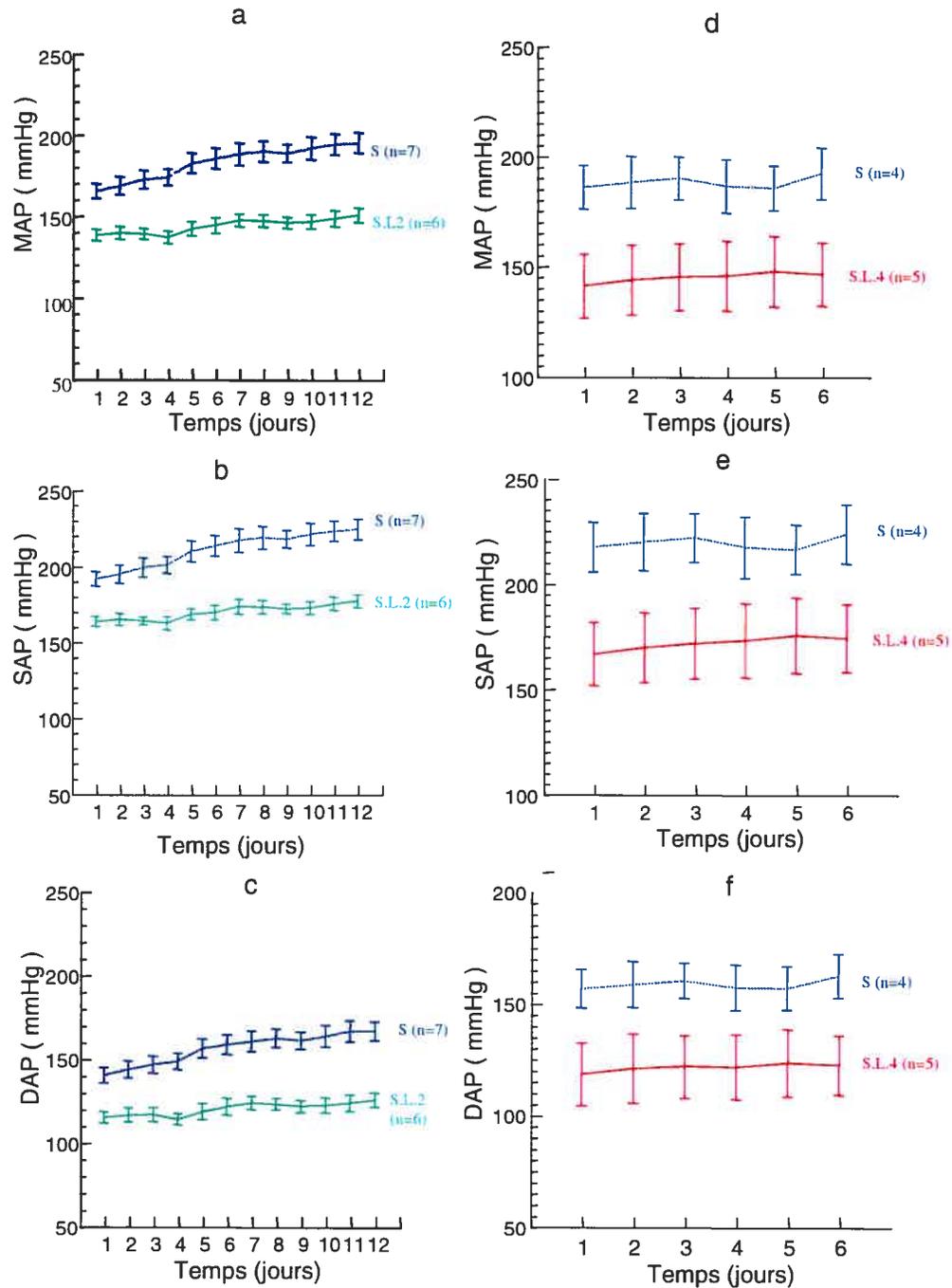


Figure 3.3 : Comparaisons entre a) la MAP, b) la SAP et c) la DAP entre la lignée congénique S.L.2 ($n = 6$) et S ($n = 7$), et de d) la MAP, e) la SAP et f) la DAP entre la lignée congénique S.L.4 ($n = 5$) et S ($n = 4$). Entre S.L.2 et S, les trois mesures étaient significativement plus basses ($P < 0.0001$) que pour S.L.2. Parallèlement, les mêmes paramètres étaient aussi plus bas ($P < 0.04$) pour S.L.4 que pour S. Chaque point dans le temps sur les graphiques représente une moyenne pour 24 heures. S.L.2 et S.L.4 sont S.LEW-D10Rat141/D10Mgh1 et S.LEW-Nos2/D10Got125 respectivement.

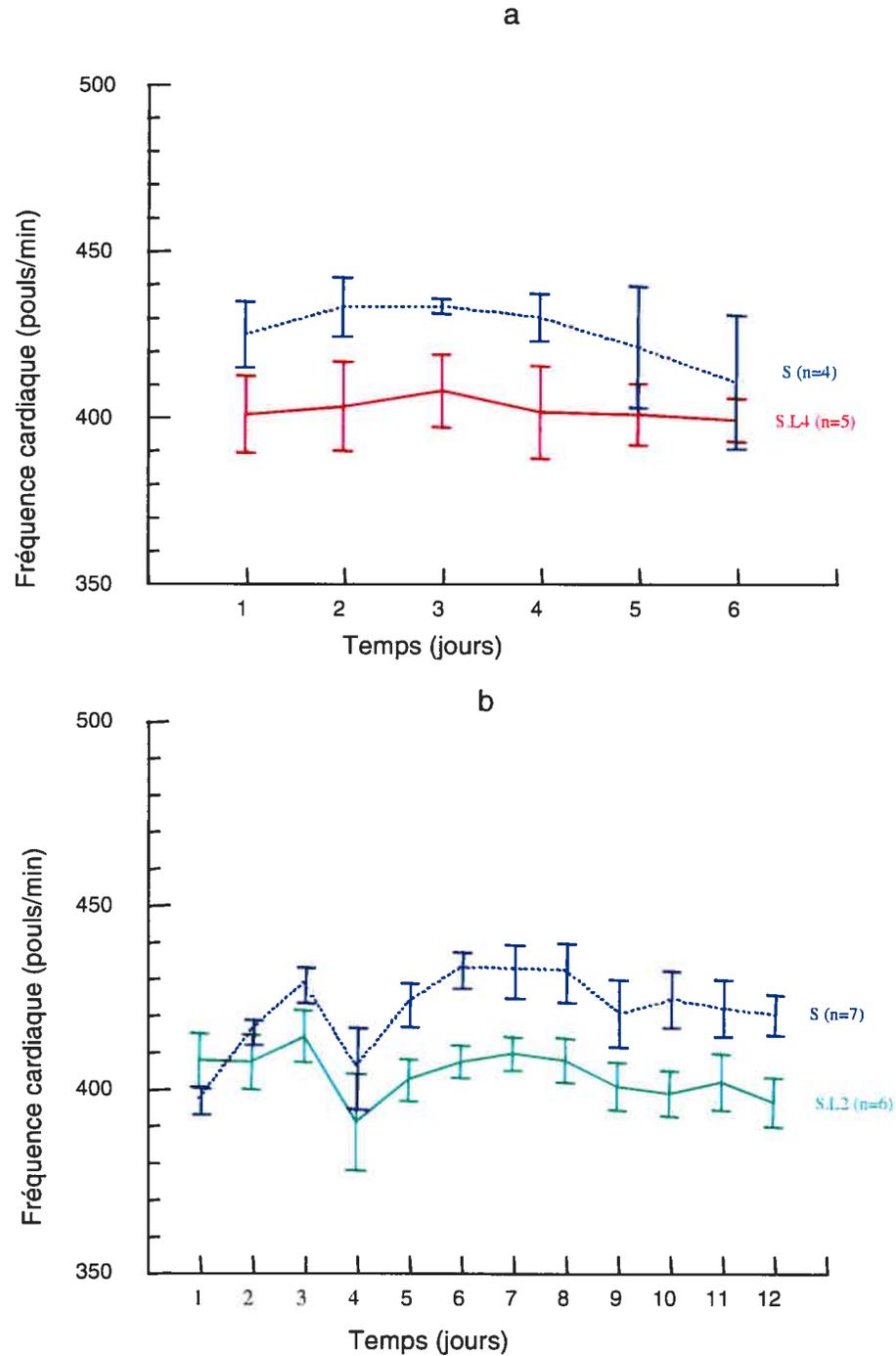


Figure 3.4 : Comparaison des fréquences cardiaques entre a) S.L.4 ($n = 5$) et S ($n = 4$) et b) S.L.2 ($n = 6$) et S ($n = 7$). Dans l'ensemble, les fréquences cardiaques entre les lignées congéniques et la souche S n'étaient pas différentes ($P > 0.05$). La description des lignées désignées S.L.2 et S.L.4 se retrouve à la légende de la figure et 3.3.

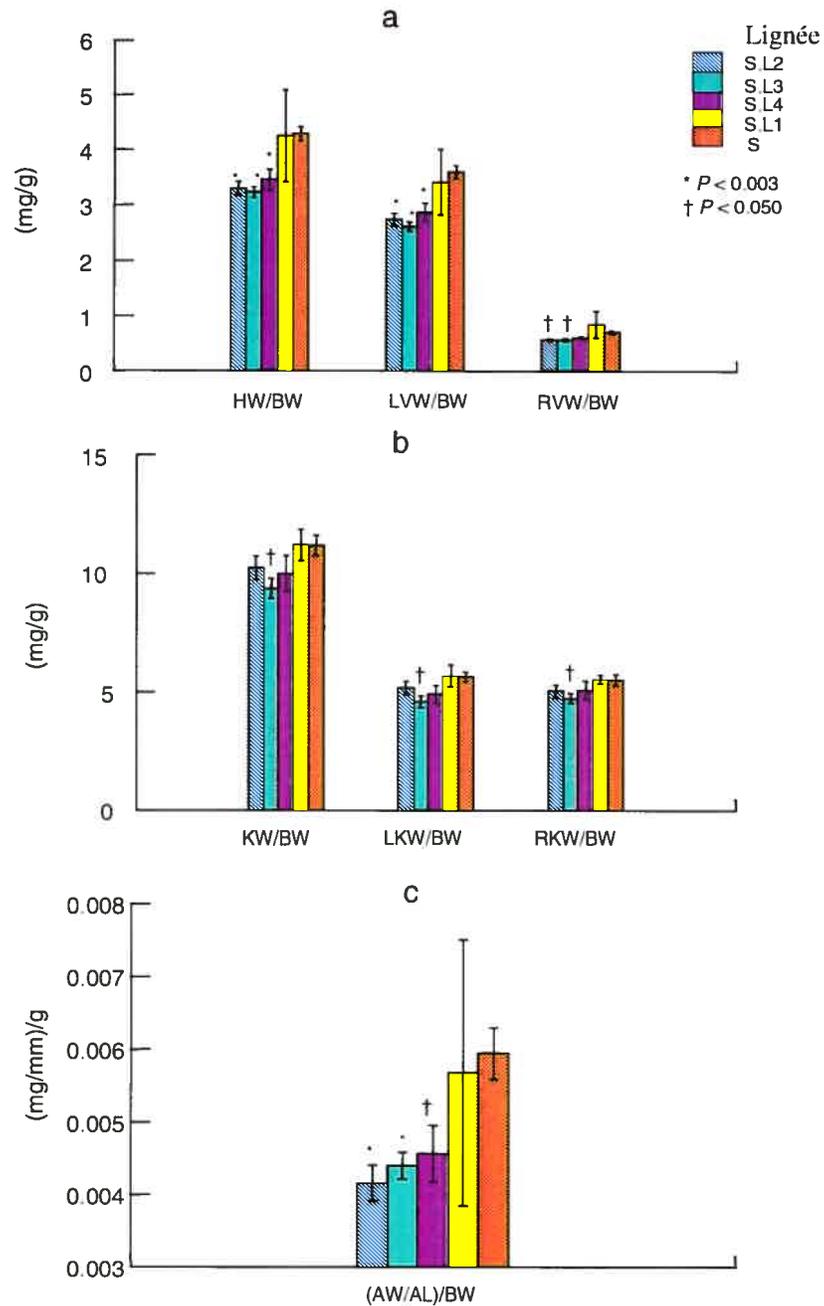


Figure 3.5 : Comparaison des paramètres d’hypertrophie cardiaque, rénale et aortique entre les lignées congéniques S.L1 ($n = 4$), S.L2 ($n = 7$), S.L3 ($n = 9$) et S.L4 ($n = 6$) et la souche S ($n = 12$). Dans chacun des graphiques, BW : Poids corporel; a) HW : Poids cardiaque; LVW : poids du ventricule gauche; RVW : poids du ventricule droit; b) KW : poids rénal total; LKW : poids du rein gauche; RKW : poids du rein droit; c) AW et AL : poids et longueur aortique respectivement. Toutes les mesures de poids ont été corrigés pour le BW. La description des lignées désignées S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4 se retrouve aux légendes des figures et 3.2 et 3.3.

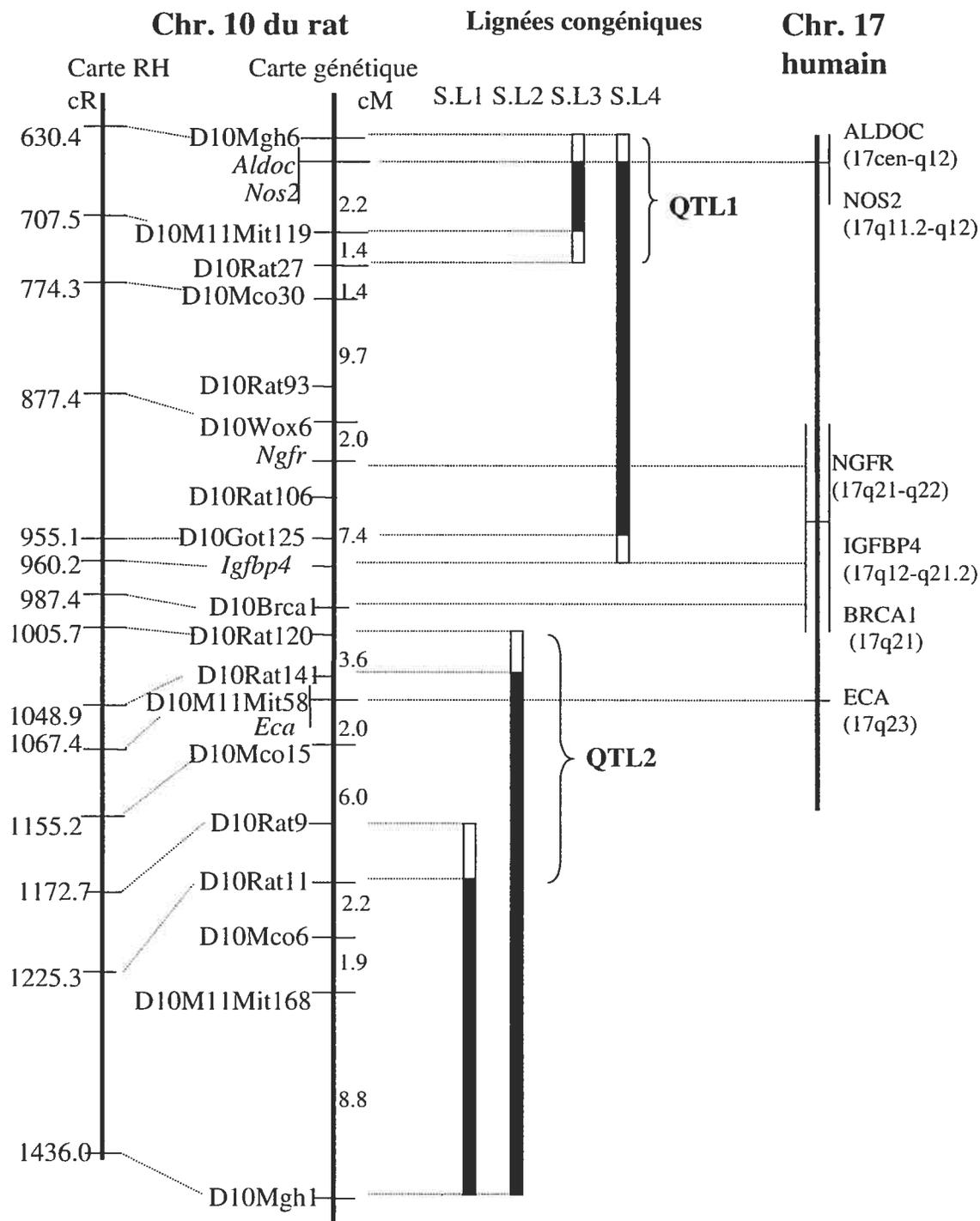


Figure 3.6 : Cartographie des QTL pour la PA. Carte génétique basée sur une population F2 (S X LEW), les distances à la droite de l'axe principal sont en centimorgans (cM). L'ordre des marqueurs sur la carte a été déterminé initialement par des études de liaison en utilisant le programme MAPMAKER, et cet ordre a été

vérifié lors d'évènements de recombinaison durant la construction des lignées congéniques. L'axe de gauche représente l'échelle des distances entre les marqueurs du chromosome 10 en centirads (cR). Quatre lignées congéniques ont été produites, nommées S.L1, S.L2, S.L3 et S.L4. Les régions d'intérêt dans lesquels le génotype LEW remplace le génotype S sont désignées par les longues barres noires, tandis que les régions d'incertitude sont désignés par les barres transparentes au bouts des région LEW des lignées congéniques. Les gènes représentés sont *Eca*, l'enzyme de conversion de l'angiotensine; *Aldoc*, aldolase c; *Igfbp4*, 'insulin-like growth factor binding protein 4'; *Ngfr*, 'nerve growth factor receptor' et *Nos2*, la forme inductible de la synthase d'oxyde nitrique et *BRCA1*, 'breast cancer 1'. Les autres marqueurs sur la carte sont anonymes. Les régions des QTL sont identifiés par des accolades. Les gènes homologues trouvés sur le CHR 17 humain sont basés sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> et http://ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/comparative_home.pl.

CHAPITRE 4 :

DISCUSSION

4.1 LOCALISATION DES QTL

Les résultats présentés sont un exemple de la cartographie physique d'un QTL de 4.2 cM pour la PA à partir de deux souches consanguines de rats en utilisant l'approche de 'speed congenic', c'est-à-dire la création de congéniques par l'usage de marqueurs (Markel *et al.*, 1997). La taille de ce QTL tombe dans l'échelle des résultats tirés par le séquençage à haut rendement et par les autres techniques génomiques tels les 'Yeast Artificial Chromosome', les 'Bacterial Artificial Chromosome' et les 'P1 Artificial Chromosome' (YAC, BAC et PAC). Cette étude a tiré profit des données et des ressources génomiques établies pour le rat, pour viser systématiquement une région connue pour contenir un QTL. De plus, l'usage des lignées congéniques a confirmé la présence de deux (2) QTL, dans la région du chromosome 10 du rat, tel que suggéré par des études de liaison d'origine (Deng et Rapp, 1995; *c.f.* recension de littérature). Ces QTL relèvent des contrastes entre les souches S et LEW. La fine cartographie, basée sur des évènements de recombinaison durant la méiose, mènera à la localisation d'une région encore mieux définie. Récemment, un QTL pour le lupus chez la souris a été décelé par la cartographie fine de lignées congéniques (Morel *et al.*, 2001), démontrant l'utilité de cette technique.

4.2 LE CHROMOSOME 10

Le chromosome 10 du rat semble particulièrement important car des études de liaison chez l'humain ont révélés des QTL pour l'hypertension sur son chromosome homologue, le CHR 17 (Julier *et al.*, 1997; Baima *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2000). Ainsi, les QTL que nous trouvons sur le chr.10 sont potentiellement importants pour l'hypertension essentielle humaine. En termes de gènes candidats, il est notable que le gène *Nos2* se trouve dans la région de S.L3, ce dernier ayant un effet sur la PA, *Nos2* est donc toujours dans la région d'intérêt. Dans un étude indépendante avec un croisement entre les souches S et MNS (Dukhanina *et al.*, 1997), le gène *Nos2* s'est retrouvé à l'extérieur de la région du QTL. Cette divergence de résultats reflète possiblement des différences dans les souches donneuses, c'est-à-dire qu'il est

possible que LEW contienne des allèle de *Nos2* qui diminuent la PA que la souche MNS ne contient pas. Alternativement, il se peut que le QTL se retrouve dans la région qui n'est pas commune entre les deux lignées congéniques, S.L2 de cette étude et S.M(10d) de Dukhanina et collaborateurs. Cette région se situe entre les marqueurs D10M11Mit119 et D10Rat27 (figure 3.6).

4.3 CRÉATION DES RATS CONGÉNIQUES

L'approche de 'speed congenic' a réduit le temps de génération de lignées congéniques de près de 30%. Cette comparaison a été établie de la manière suivante : le passage de 9 à 6 générations pour créer les congéniques : $9-6$ génération = 3; $3/9 = 33\%$. Un total de 6 générations (5 générations de croisements retour plus une génération pour dupliquer la région chromosomique d'intérêt) sont nécessaires pour créer une lignée congénique par l'approche assistée de marqueurs ('speed congenic'), tandis que 9 générations sont nécessaires pour la technique traditionnelle (8 générations de croisements retour plus une génération pour dupliquer la région chromosomique d'intérêt) (Rapp et Deng 1995; *c.f.* recension de littérature).

4.4 ÉTUDE D'HYPERTROPHIE

On remarque que les effets de PA sont associés avec l'hypertrophie cardiaque dans les lignées S.L2, S.L3 et S.L4, indiquant que le QTL1 et le QTL2 sont possiblement associés à des phénotypes cardiaques. Les effets sur l'hypertrophie cardiaque peuvent être expliqués par la réduction du poids des ventricules gauches (Figure 3.5a). Les poids aortiques mesurés par rapport à leur longueur démontrent similairement une corrélation (Figure 3.5c). Ces corrélations sont-elles des exemples de relations cause à effet? Il est difficile de déterminer, dans le cas de ces traits phénotypiques, si l'hypertension est due à des changements anatomiques ou si ceux-ci sont dus aux effets physiologiques compensatoires de l'hypertension. Certaines

publications relèvent de la relation directe entre les deux paramètres, sans pouvoir établir la relation cause à effet (Triggle, 1985). D'autres suggèrent possiblement un rôle de cause à effet dans certain cas spécifiques (Lee *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1986). Encore d'autres études de liaison sur des modèles de rats indiquent que les deux phénotypes, c'est-à-dire l'hypertrophie ventriculaire gauche et la PA, peuvent être dissociés. Par exemple, le locus de *Hsp27* sur le chr.12 du rat est lié à l'hypertrophie ventriculaire gauche seulement (Hamet *et al.*, 1996). Dans un autre cas, un locus d'hypertrophie du ventricule gauche seulement a été trouvé sur le chr.14 dans la souche SHRSP (Clark *et al.*, 1996). De plus, l'hypertrophie du ventricule gauche est indépendant de l'hypertension artérielle, comme l'a démontré une étude de liaison de rats F2 entre la souche WKY et un dérivé hyperactif de WKY (Masciotra *et al.*, 1999). Cette population F2 exhibait une liaison entre l'hypertrophie du ventricule gauche et le locus du peptide natriurétique de l'oreillette (*Nppa*) sur le chr.5, tandis qu'aucune de deux souches parentales n'était hypertendue. D'autres affirment depuis un certain temps que dans certaines souches de rats, par exemple chez le rat GH (tableau I.II), l'hypertrophie du cœur et des vaisseaux sanguins se produit suite à l'élévation de la pression artérielle (Simpson et Phelan *in* Handbook of Hypertension, 1984). Ainsi, la relation cause-effet entre l'hypertrophie cardiaque et la PA reste un sujet de débat.

La région chromosomique contenue entre les marqueurs D10Mgh6 et D10Rat27 semble associée à la masse rénale dans la lignées S.L3 mais pas dans la lignée S.L4 (figure 3.5b). Cette dernière lignée contient une plus grande région chromosomiques d'origine LEW que la lignées S.L3, tel que défini par les marqueurs D10Rat27 et *Igfbp4* (figure 3.6). Il est probable qu'un facteur entre ces deux (2) marqueurs affecte le trait de façon contraire. Ceci implique qu'il pourrait se trouver dans la région couverte par S.L3 un gène régulant l'hypertrophie rénale. Cowley et collaborateurs (Cowley *et al.*, 2001) ont démontré que l'hypertrophie rénale est associée avec des blessures tubulaires et glomérulaires chez des rats SS/Medical College of Wisconsin (Mcw). Il serait intéressant de découvrir si le même phénomène se produit chez les rats de la lignée S.L3. Ce même groupe (Cowley *et al.*, 2001) a

trouvé un QTL associé à la PA et à l'hypertrophie rénale sur le chr.13 d'une lignée consomique entre les rats SS/Mcw et BN (voir tableau I.II). Pourtant, la réponse à une diète enrichie en sel est faible chez ce consomique. Ainsi, il se peut qu'ils aient élucidé un QTL affectant la PA indépendamment de la surcharge de sel. Il serait intéressant d'étudier les QTL des souches S.L2 et S.L3 lorsque les congéniques reçoivent une diète normale en sel. Il se peut que les QTL ne soient pas maintenus sous ces conditions, ce qui impliquerait que les QTL trouvés ci-dessus sont spécifiques au contrôle du sel ingéré, et pas nécessairement à l'hypertension en général. Une telle étude donnerait aussi des indices quant aux gènes candidats à rechercher.

PARTIE II

CHAPITRE 5 :
RAFFINEMENT DES
QTL

5.1 RÉDUCTION DE LA RÉGION COUVERTE PAR LE QTL 1

Des nouvelles lignées congéniques ont été développés dans la région du QTL 1 afin de réduire l'étendue de celui-ci. En effet, à partir de la lignée S.L3, d'une longueur de 4,2 cM, nous avons produit trois (3) nouvelles lignées nommées S.L9, S.L10 et S.L13 (figure 5.1). Ces lignées congéniques ont été soumis aux mêmes protocoles et analyses statistiques qu'exposés dans la section méthodologie, au chapitre 2. Nous avons mesuré par télémétrie la pression artérielle moyenne (MAP), la pression artérielle systolique (SAP) et la pression artérielle diastolique (DAP). En guise de simplicité, et car les résultats de SAP et DAP sont de pair avec ceux de la MAP, seul les valeurs de cette dernière sont présentés ici (voir figure 5.2). Nous avons également évalué d'autres paramètres de l'hypertension artérielle, soit l'hypertrophie cardiaque, aortique et rénale (figure 5.3). Ces données nous ont permis de réduire la région du QTL 1.

Seules les souches S.L.9 et S.L.10 ont une MAP (concordante avec la SAP et la DAP) plus basse ($P < 0.03$) que S. Ainsi, nous pouvons réduire la région d'intérêt à la zone couverte par S.L.9, puisqu'elle peut par elle-même rendre compte de l'effet de la pression artérielle. Tel qu'indiqué sur la figure 5.1, cette zone s'étend entre les marqueurs D10M11Mit119 et D10Rat27. La longueur du QTL 1 est de moins de 1,4 cM; assez restreinte pour débiter une analyse moléculaire.

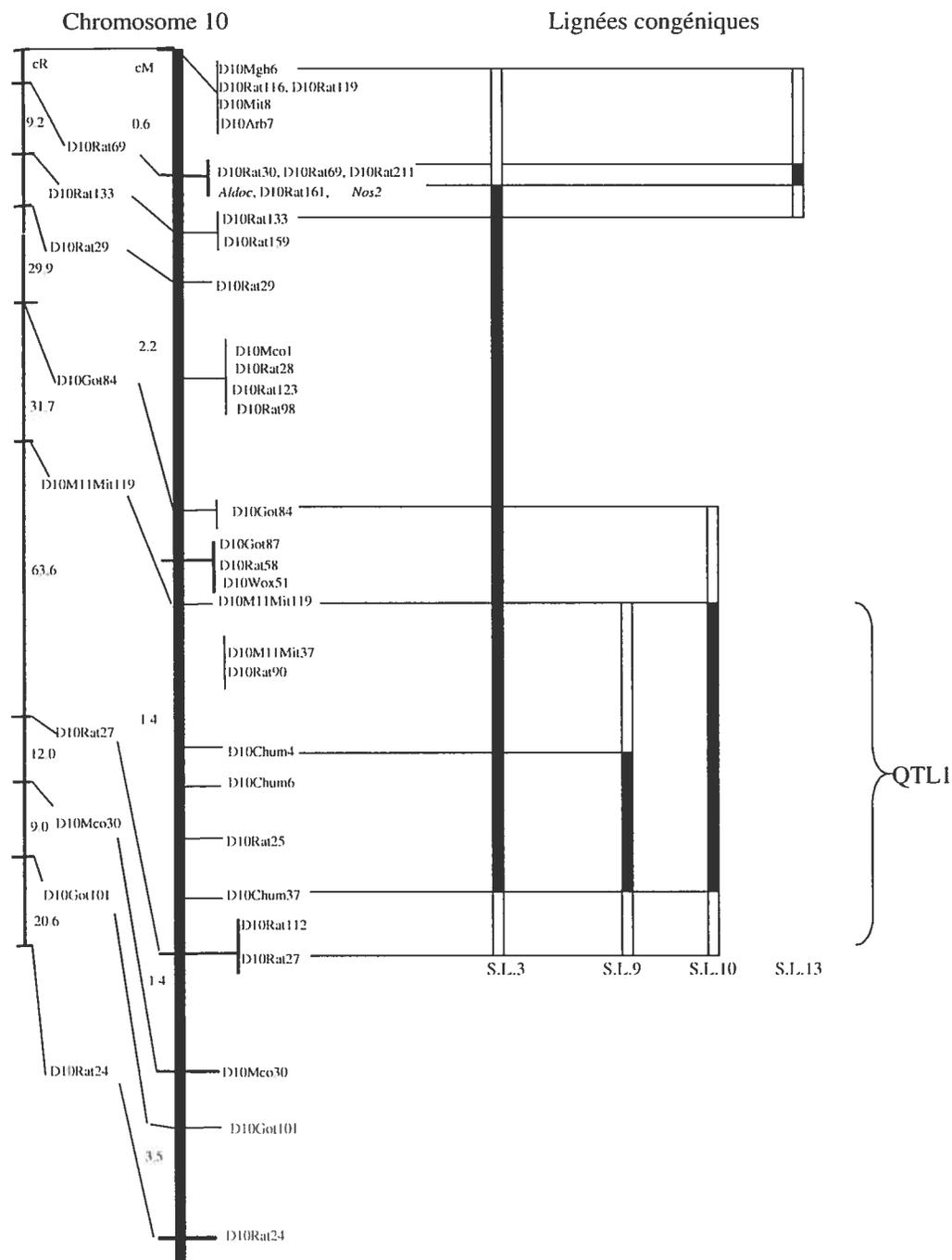


Figure 5.1 : Lignées congéniques développés dans la région du QTL 1. Les lignées congéniques sont représentés par des barres noires pleines, les régions d’incertitude sont représentés par des barres vides. La lignée congénique originale S.L.3, et les nouvelles nommées S.L.9, S.L.10, S.L.13 sont indiquées au bas de chaque lignée, et représentent respectivement les lignées S.LEW-*Nos2*/D10Rat26, S.LEW-Chm4/D10Rat26, S.LEW-D10M11Mit119/D10Rat26 et S.LEW-D10Rat30/*Nos2*. Les distances entre les marqueurs en cM et en cR sont indiqués. Les gènes représentés sont *Aldoc* pour ‘aldolase c’, *Nos2* pour synthase de l’oxyde nitrique inductible.

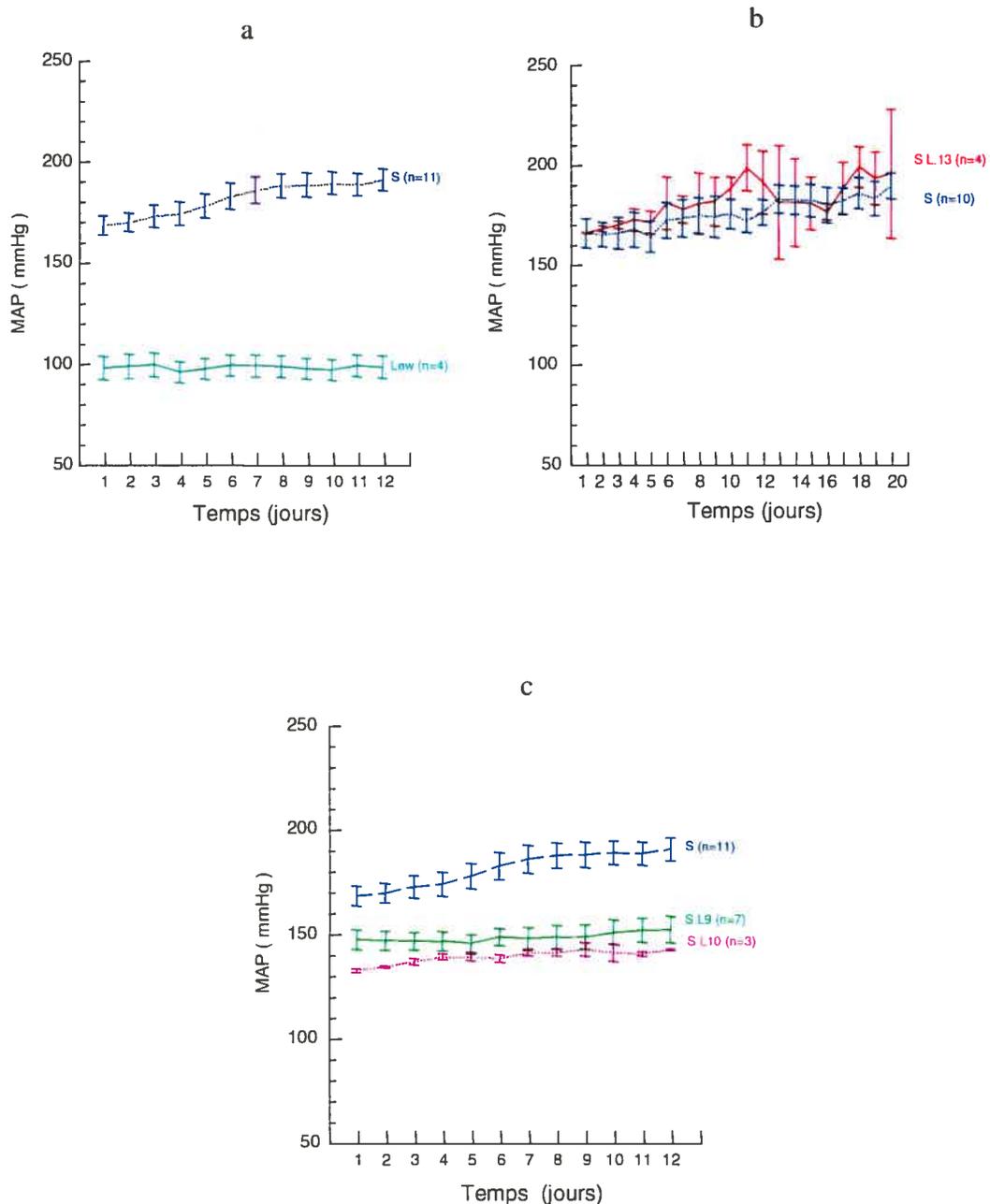


Figure 5.2 : Comparaison des MAP entre a) les souches parentales S et LEW, b) S.L13 et S et c) S.L9, S.L10 et S. Chaque point sur les graphiques représente la moyenne des mesures prises à chaque 4 heures sur une période de 24 heures. Les MAP de S.L.9 ($n=7$), S.L.10 ($n=3$) ($P<0,03$) et LEW ($n=4$) ($P<0,0001$) étaient significativement plus basses que la MAP de S ($n=11$). Par contraste, S.L.13 ($n=4$) (b) n'avait pas une MAP significativement plus basse ($P>0,9$) que S. Les mesures de MAP étaient concordantes avec les mesures de SAP et de DAP.

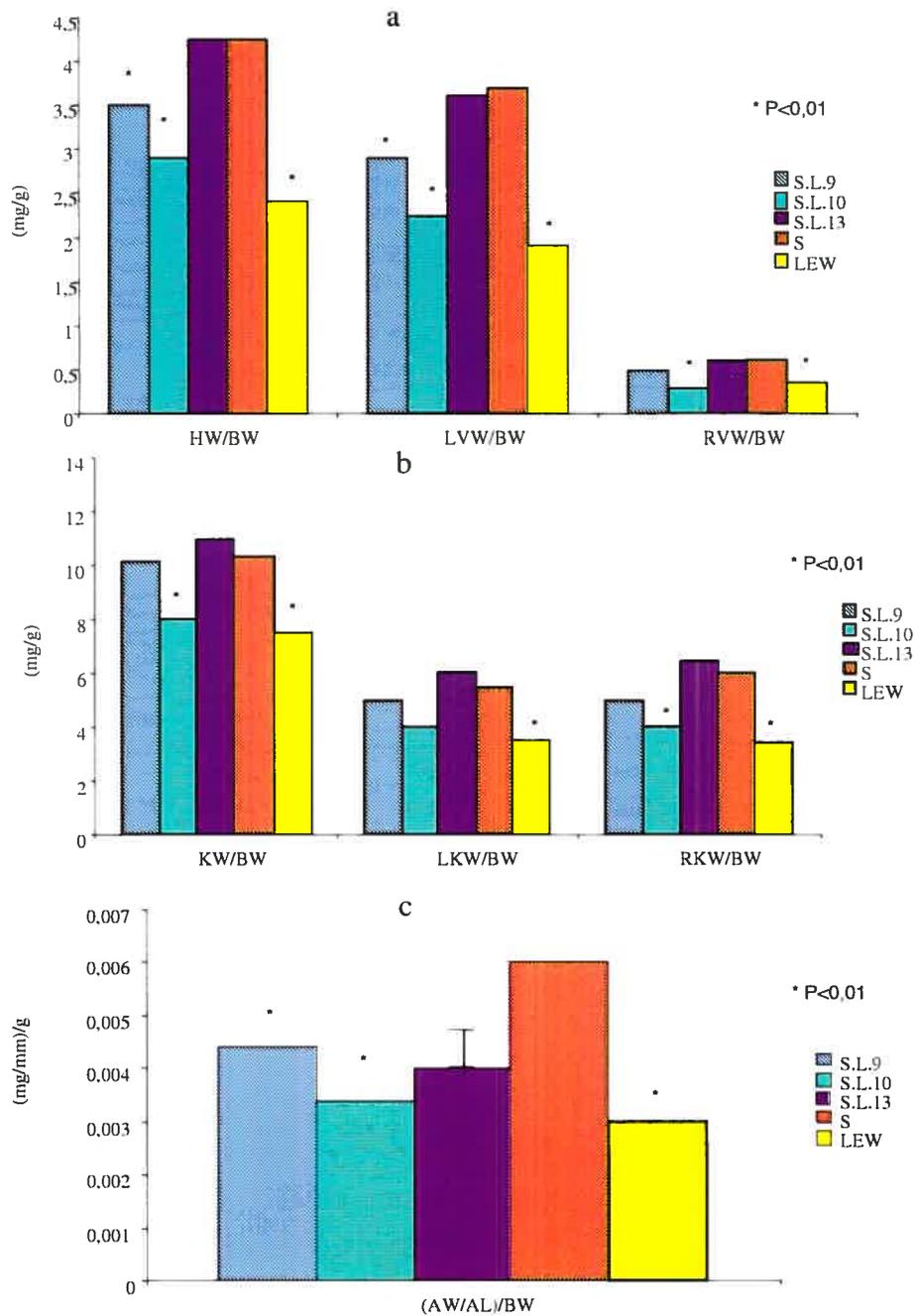


Figure 5.3 : Comparaison des paramètres d'hypertrophie a) cardiaque, b) rénale et c) aortique entre les lignées congéniques S.L.9 ($n=4$), S.L.10 ($n=3$), S.L.13 ($n=4$), et les souches parentale S ($n=11$) et LEW ($n=4$). Dans chacun des graphiques, BW : Poids corporel; a) HW : Poids cardiaque; LVW : poids du ventricule gauche; RVW : poids du ventricule droit; b) KW : poids rénal total; LKW : poids du rein gauche; RKW : poids du rein droit; c) AW et AL : poids et longueur aortique respectivement. Toutes les mesures de poids ont été corrigés pour le BW. La description des lignées désignées S.L.9, S.L.10 et S.L.13 se retrouve à la légende de la figure 5.1.

5.2 RÉDUCTION DE LA RÉGION COUVERTE PAR LE QTL 2

Le QTL 2 a également été raffiné. Deux (2) nouvelles lignées, S.L.6 et S.L.8, ont permis de réduire la région à une longueur de moins de 7.9 cM (figure 5.6). Les valeurs de MAP (figure 5.4) de S.L. 6 étaient plus bas ($P<0,03$) que S, tandis que ceux de S.L.8 n'étaient pas plus bas ($P>0,10$) que S. Les deux lignées avaient un poids cardiaque plus bas ($P<0,01$) que S (figure 5.5a), mais seulement S.L6 avait un poids aortique ($P<0,01$) et rénal ($P<0,04$) plus bas que S (figure 5.5b et c). Le QTL 2 peut donc être réduit à la région où S.L6 et S.L8 se chevauchent (figure 5.6).

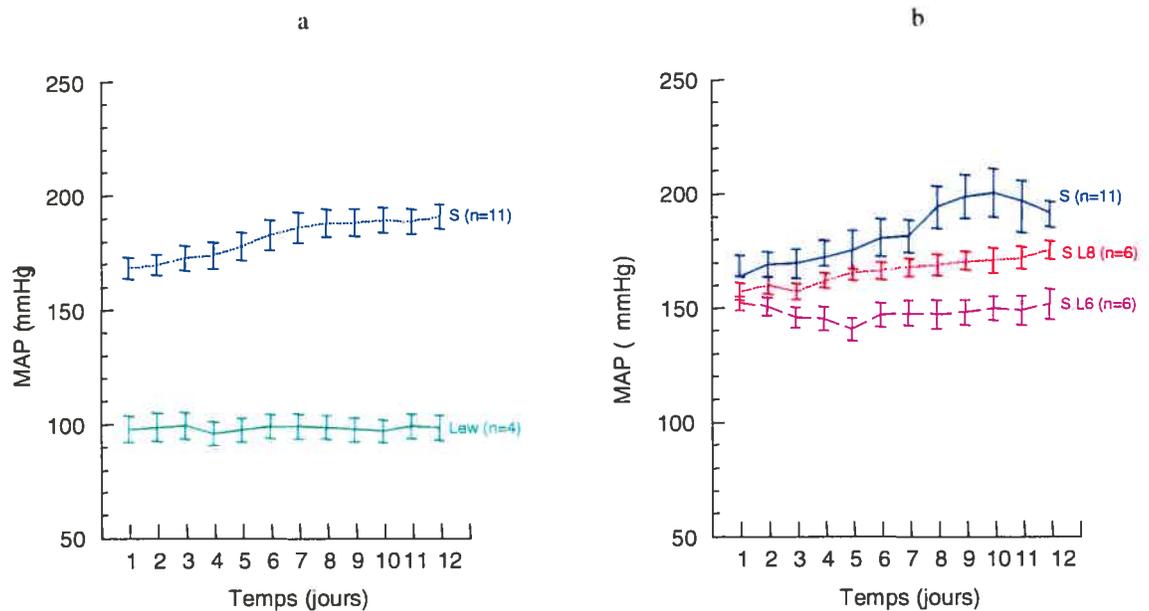


Figure 5.4 : Comparaison de la MAP a) des souches parentales S ($n=11$) et LEW ($n=4$), et b) des lignées congéniques S.L6 ($n=6$) et S.L8 ($n=8$). Chaque point sur les graphiques représente la moyenne des mesures prises à chaque 4 heures, sur une période de 24 heures. La lignée LEW a une MAP plus basse ($P<0,0001$) que S, comme la souche S.L6 ($P<0,03$), mais contrairement à S.L8 ($P>0,10$).

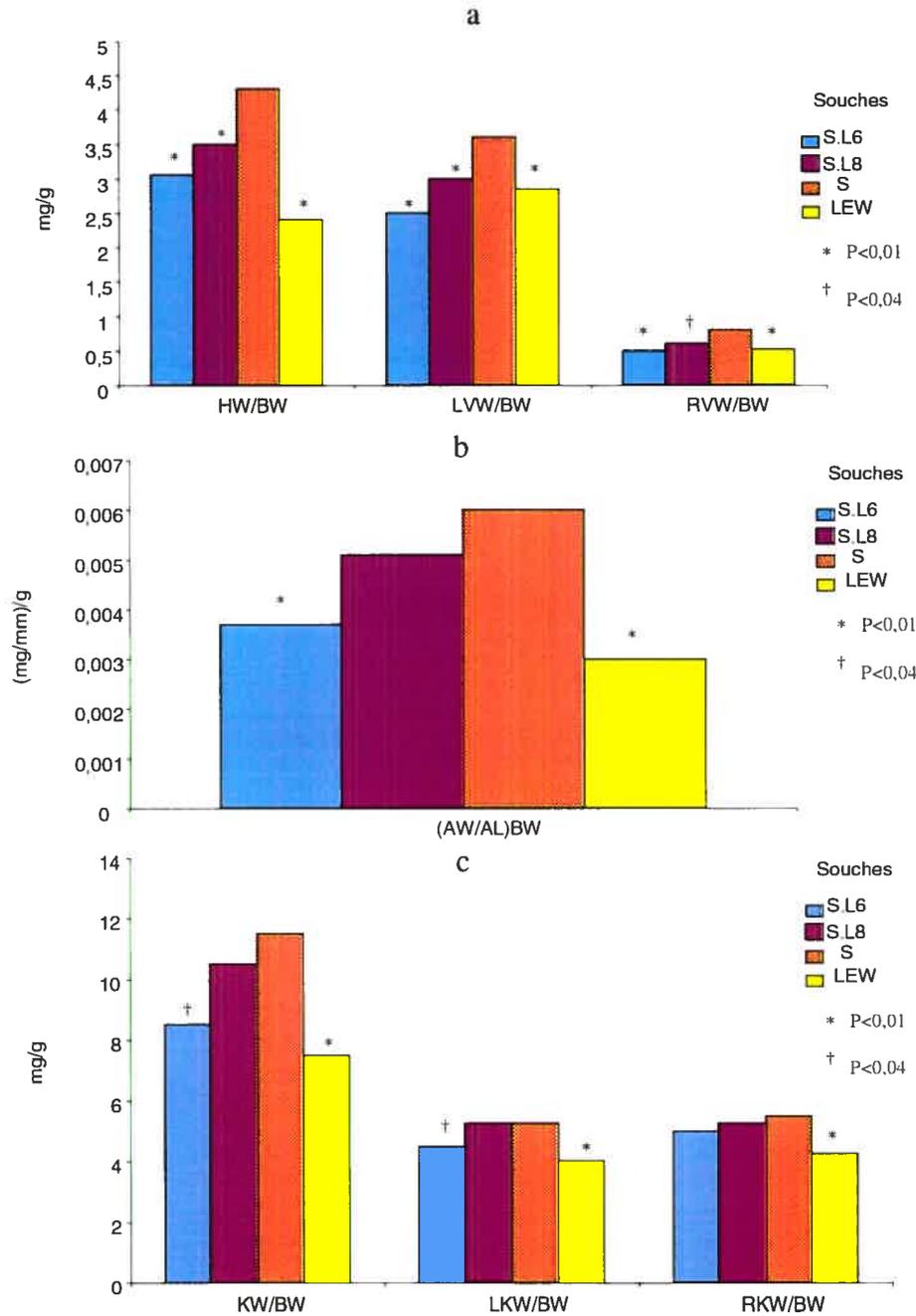


Figure 5.5 : Comparaison des paramètres de poids a) cardiaque, b) aortique et c) rénal entre les lignées congéniques S.L6 ($n=4$), S.L8 ($n=6$), et les souches parentales S ($n=11$) et LEW ($n=5$). Dans chacun des graphiques, BW : Poids corporel; a) HW : Poids cardiaque; LVW : poids du ventricule gauche; RVW : poids du ventricule droit; b) KW : poids rénal total; LKW : poids du rein gauche; RKW : poids du rein droit; c) AW et AL : poids et longueur aortique respectivement. Toutes les mesures de poids ont été corrigé pour le poids corporel. La description des lignées désignées S.L6 et S.L8 se retrouve à la légende de la figure 5.6.

Chromosome 10 du rat

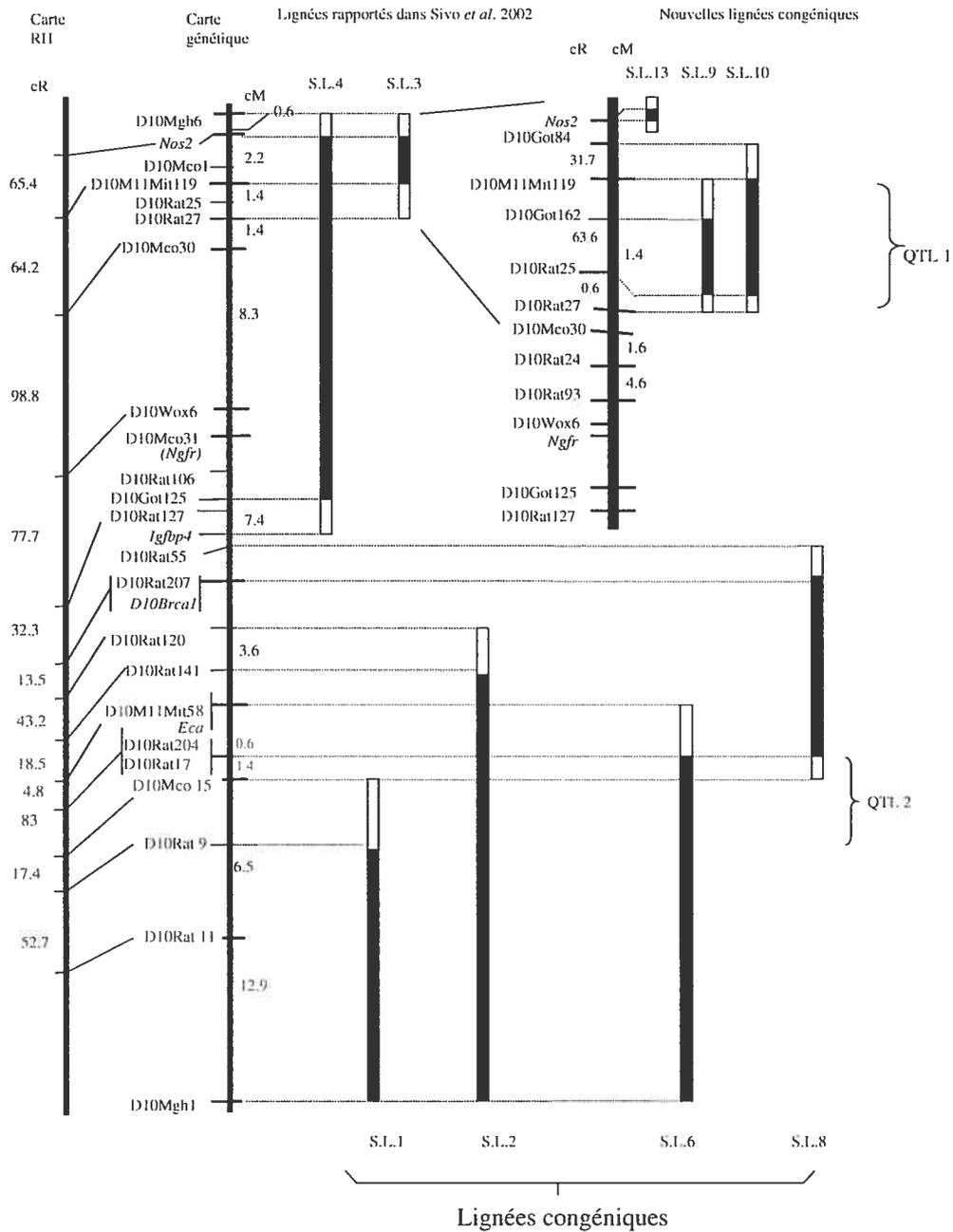


Figure 5.6 : Nouvelles lignées congéniques ayant permis de mieux définir le QTL 2, avec une vue globale sur les QTL du chromosome 10 du rat. Cette figure a une composition similaire à la figure 5.1. Les lignées S.L1, S.L2 et S.L4 sont décrites aux figures 3.2 et 3.3. S.L6 et S.L8 sont S.LEW-D10Rat204/D10Mgh1 et S.LEW-D10Rat207/D10Rat204. Les gènes représentés sont *Eca*, l'enzyme de conversion de l'angiotensine; *Aldoc*, aldolase c; *Igfbp4*, 'insulin-like growth factor binding protein 4'; *Ngfr*, 'nerve growth factor receptor'; *Brca1*, breast cancer 1 et *Nos2*, la forme inductible de la syntase d'oxyde nitrique. Les autres marqueurs sur la carte sont anonymes. Les régions des QTL sont identifiées par des accolades.

5.3 CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DE LA RÉGION DU QTL 1

Étant réduite à une longueur de 1,4 cM, la région du QTL 1 nécessitait l'élaboration d'une carte plus précise, soit une carte physique.

La carte physique a été construite, d'abord en criblant les marqueurs microsatellites de la région sur la librairie de YAC. La librairie utilisée était la Harvard/EC/HGF Rat YAC library de Research Genetics (<http://www.resgen.com/products/HAVRYAC.php3>). Le criblage systématique a été mené en débutant par les marqueurs D10M11Mit119 et D10Rat27 aux extrémités de la région d'intérêt, suivi par le marqueur D10Rat25 et de trois (3) séquences exprimées (EST) localisés à la région. Ces EST, dont les séquences sont disponibles sur Internet (http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html) ont été localisés en alignant leurs séquences sur les séquences des marqueurs déjà connus. Situées à distances approximativement égales les unes des autres, le but était de construire un contig en utilisant les bouts des YAC criblés par ces marqueurs. Chaque clone identifié par criblage a été obtenu, puis l'ADN de celle-ci a été extrait. Cet ADN a été amplifié par ACP, selon les conditions décrites au chapitre 2, en utilisant les marqueurs environnants celui ayant servi au criblage. Si un marqueur réussit à amplifier l'ADN, c'est qu'il fait partie de ce YAC. Les bouts des YAC ont été isolés par excision directe à partir d'un gel d'agarose à 1%. L'excision a été faite par lame de rasoir, sous lampe UV pour localiser les bandes d'ADN. Le bout de gel découpé a été digéré pour en extraire l'ADN. Par la suite, cette séquence a été clonée dans un vecteur TA (pCR 2.1), l'amplifiée dans ce vecteur, puis le séquençage des extrémités a été mené. Par la suite, les sondes produites avec les séquences des bouts ont servi à vérifier par ACP sur l'ADN de YAC s'il y a chevauchement avec les YAC déjà présents. Ceci a été fait dans le but de bâtir un contig complet.

Pour compléter les contig partiels de YAC, la librairie de BAC de rats CHORI-230 (Osoegawa *et al.*, 1998) disponible sur Internet a été utilisée comme ressource principale de clones. Pour le criblage de la librairie, les ressources *in silico* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> et http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html) ont été employés. Tous les

marqueurs microsatellites et EST de la région ont servi pour le criblage. Également, les gènes de rat, souris et humain soupçonnés d'être dans la région ont été soumis, afin de vérifier s'ils sont réellement présents dans la région. Le criblage était refait à tous les mois, car les banques de données sur Internet évoluent rapidement. La carte physique des BAC et des YAC est présentée à la figure 5.7. Les noms des clones en question sont omis et remplacés par des numéros et des lettres. Ces clones sont aussi à l'origine des marqueurs Chm présentés ci-bas. La carte de transcription de la région est présentée à la figure 5.8. Cette carte démontre entre autres l'homologie importante qui existe entre le chromosome 11 de la souris, le chromosome 17 humain et la région du QTL 1 du chromosome 10 du rat.

5.4 ÉTUDE D'HOMOLOGIE

L'homologie entre la région du QTL 1 et le chromosome 17 humain rend le QTL 1 d'un intérêt particulier. En effet, plusieurs régions du CHR 17 humain ont été ciblées par des études de liaison (Julier *et al.* 1997, Baima *et al.* 1999, Levy *et al.* 2000) comme comportant des QTL pour la pression artérielle. Ainsi, notre QTL 1 est fortement susceptible d'être relié à l'hypertension essentielle chez les humains. En localisant les gènes humains contenus dans la région du QTL 1, nous mettons de l'avant les gènes candidats chez l'humain.

L'identification de gènes candidats doit être complétée par la localisation de séquences exprimées (EST) qui ne sont pas encore associées à des gènes. Puisque nous identifions une région chromosomique entière comme contenant un facteur déterminant l'hypertension artérielle, toute séquence génétique est candidate. Ainsi, la carte de transcription (figure 5.8) contient aussi les EST localisés dans la région. Ceux-ci sont pareillement des candidats.

Nous avons également développé une carte d'homologie couvrant les deux (2) QTL du chromosome 10. Cette carte indique la localisation des zones de liaison trouvés chez les humains (Julier *et al.* 1997, Baima *et al.* 1999, Levy *et al.* 2000), et les QTL du rat trouvés dans des études usant de rats congéniques de différentes

souches parentales que les nôtres (Figure 5.9). Dans cette carte, il est possible de voir que le chromosome 10 du rat et le CHR 17 humain semblent contenir une agglomération de QTL pour l'hypertension artérielle.

5.5 RAFFINEMENT DE LA RÉGION D'INTÉRÊT DU QTL 1

La longueur de la région couverte par le QTL 1 peut encore être réduite, diminuant ainsi le nombre de gènes et de séquences candidats. Le QTL 1 étant d'une longueur de 1,4 cM, les chances de recombinaison sont de 1,4%. Il est donc encore possible de produire des nouvelles lignées congéniques couvrant une partie de cette région. De nouveaux marqueurs dans cette région devaient être produits afin de cribler précisément pour des événements de recombinaison. En utilisant les séquences de BAC disponibles sur Internet (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/>), des nouveaux marqueurs microsatellites ont été produits. Les séquences microsatellites ont été trouvés parmi la séquence complète de BAC, et des sondes ont été créées pour les amplifier. Un logiciel disponible sur Internet (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) a servi à concevoir les sondes. Une vérification a été menée par étude d'alignement BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) pour assurer que les nouvelles séquences microsatellites n'étaient pas celles des marqueurs déjà utilisés. Les nouveaux marqueurs développés ont été nommés du suffixe CHM, pour le lieu de développement, suivi d'un numéro particulier. En moyenne, deux marqueurs par clone BAC ont été construits. Puisque certains des nouveaux marqueurs n'étaient pas polymorphiques entre la souche de rats S et la souche de rats LEW, certains clones BAC ont servi à la production de plusieurs marqueurs microsatellites. Les marqueurs non-polymorphiques ne peuvent pas servir pour la criblage d'évènements de recombinaison, mais peuvent être cartographiés par hybrides de radiation et sur les YAC. Le tableau V.I résume les informations pertinentes aux marqueurs CHM produits.

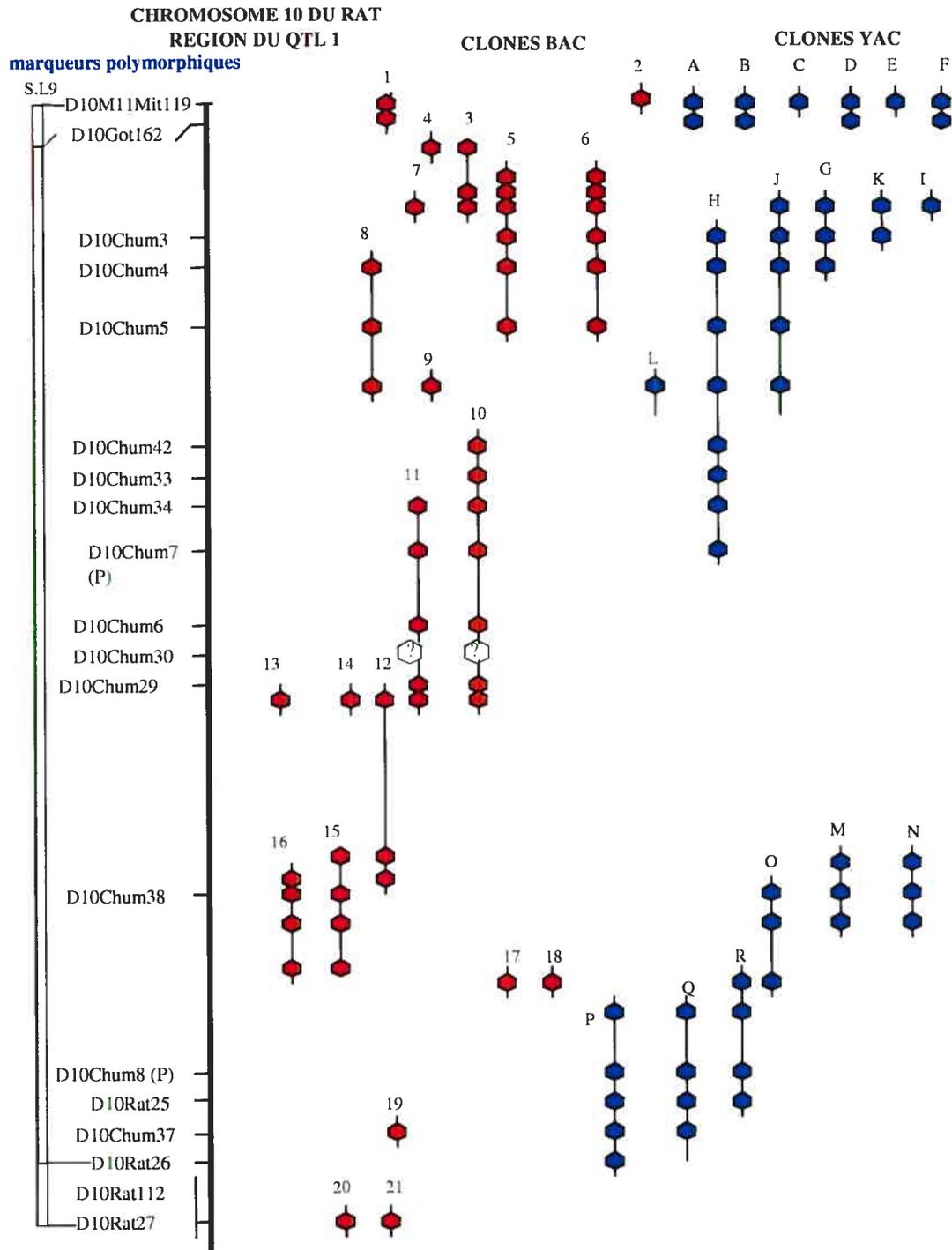


Figure 5.7 : Carte physique de la région du QTL 1. La barre de gauche représente la lignée S.L9, donc la région du QTL 1 agrandie. La longueur totale est de 1,4 cM. Les marqueurs microsatellites polymorphiques sont placés le long de la région. Les points rouges représentent l'alignement des marqueurs microsatellites avec des BAC, tandis que les points bleus indiquent l'alignement avec des YAC. Certains points qui ne semblent pas s'aligner avec des marqueurs sur l'axe indiquent des régions d'alignement de BAC entre eux, et de BAC avec des YAC.

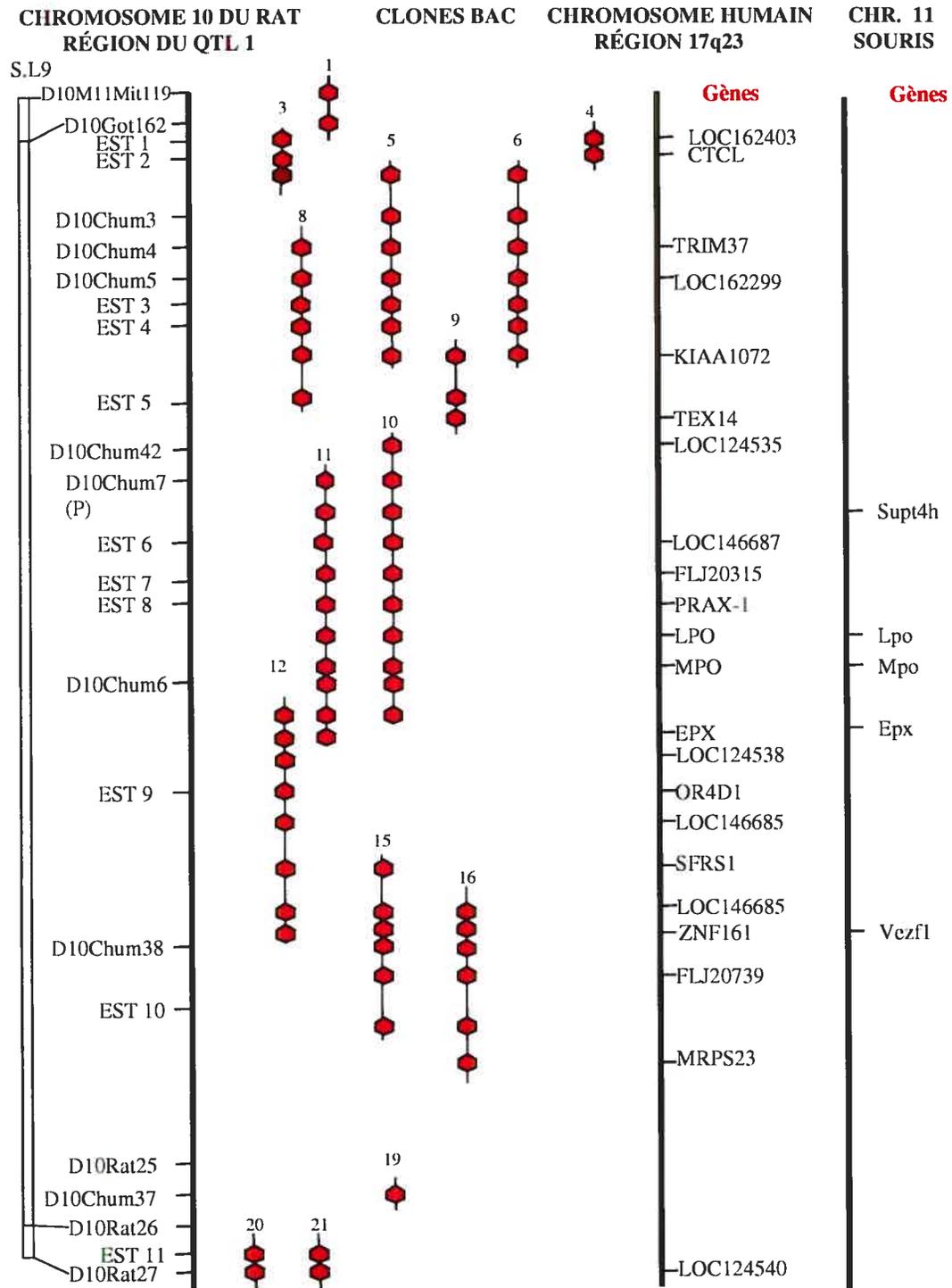


Figure 5.8 : Carte de transcription de la région du QTL 1. La structure de cette carte est similaire à celle de la figure 5.7. À la gauche, les marqueurs microsatellites du rat et les EST s'alignant sur chaque BAC sont indiqués. À droite, les gènes humains du CHR 17 et les gènes de souris du Chr 11 s'alignant sur les BAC sont indiqués. Certains points qui ne semblent pas s'aligner sur les marqueurs ou les gènes indiqués aux axes sont des points d'alignement des BAC entre eux.

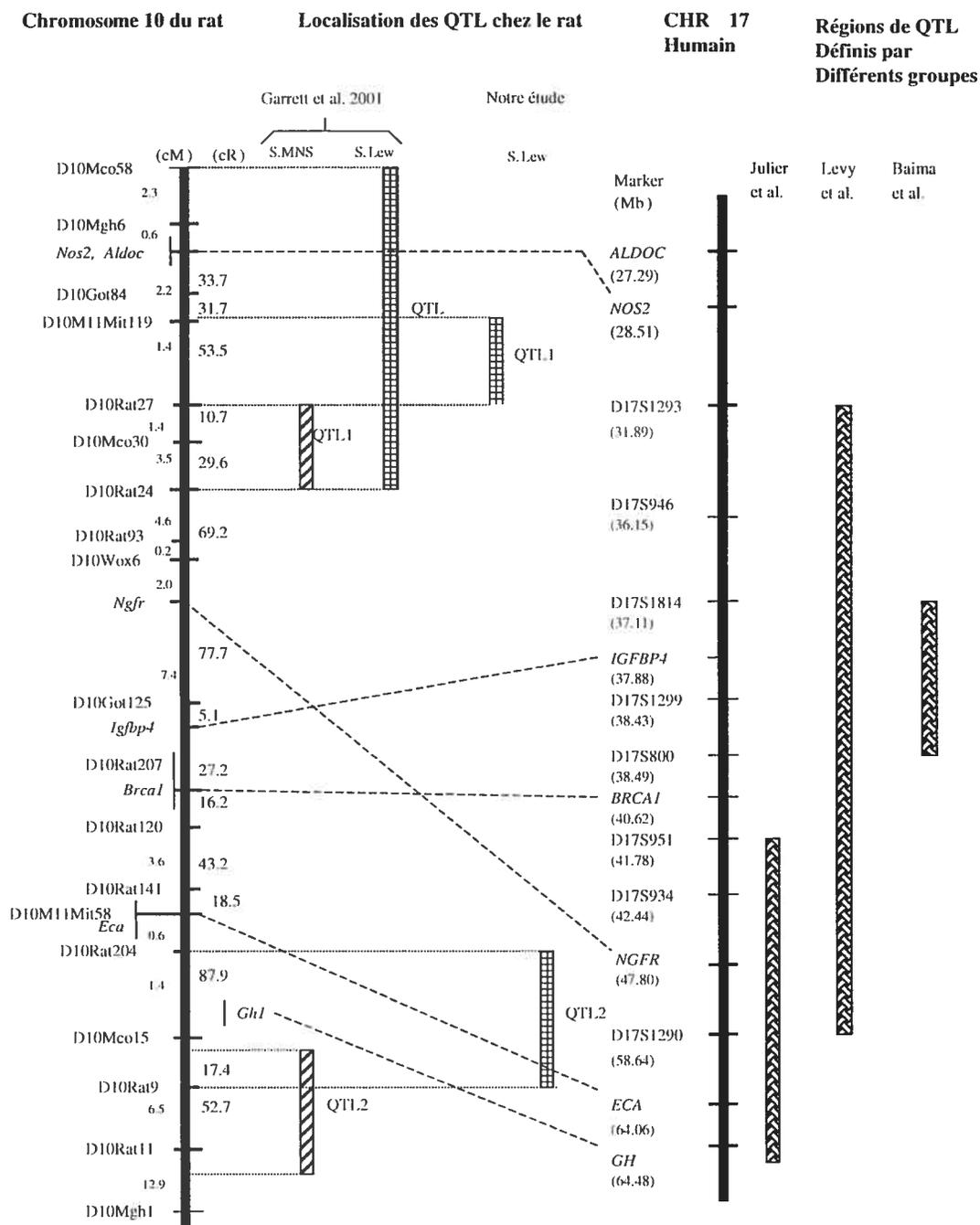


Figure 5.9 : Localisation des QTL et cartographie comparative avec le CHR 17 humain. La carte du Chr 10 du rat est essentiellement la même qu'à la figure 5.1. Nos QTL ainsi que la localisation des QTL d'autres groupes sont indiqués. Les croisements de rats sont indiqués au haut. Les régions humaines identifiées par études de liaison sont indiquées à la droite par les barres verticales hachurées. Mb : Méga paires de bases. Voir la figure 5.6 pour la légende des gènes sur la carte. De plus, *GH* : hormone de croissance.

Nom du Marqueur	Température (°C)	Condition (P ou A)	polymorphisme	Taille (pb)
D10Chm 1	60	P	S=L	194
D10Chm 2	60	P	S=L	180
D10Chm 3	60	A	S<L	190
D10Chm 4	60	A	S<L	130/194
D10Chm 5	60	A	S<L	234
D10Chm 6	60	A	S<L	194
D10Chm 7	55	P	S=L	194
D10Chm 8	60	P	S<L	230
D10Chm27	60	P	S=L	210
D10Chm 28	55	P	S=L	260
D10Chm 29	60	A	S<L	156
D10Chm30	60	A	S>L	141
D10Chm32	55	P	S=L	150
D10Chm 33	55	A	S<L	192
D10Chm34	50	A	S>L	181
D10Chm35	60	P	S=L	238
D10Chm36	55	P	S=L	201
D10Chm37	55	A	S>L	180
D10Chm38	60	A	S<L	148
D10Chm40	60	P	S=L	172
D10Chm42	60	P	S>L	185

Tableau V.I : Marqueurs microsatellites développés à partir des séquences de BAC.
Conditions de migration : P : Polyacrylamide; A : Agarose.

CHAPITRE 6 :
ANALYSE
MOLÉCULAIRE

6.1 ÉTUDE DE PROFILAGE D'EXPRESSION GÉNIQUE

Pour compléter la technique d'identification de QTL par le développement de lignées de rats congéniques, nous avons mené une étude de profilage d'expression génique. En effet, nous avons comparé le niveau d'expression génique entre trois de nos souche de rats :

- La souche parentale S
- La souche parentale LEW
- Une lignée congénique S.L.C10-16, dont le chromosome 10 du marqueur D10Mgh6 au marqueur D10Mgh1 (voir la figure 3.6) et la totalité du chromosome 16 (Moujahidine *et al.*, 2002) sont de génotype LEW, tandis que le reste de leur génotype est S. Cette lignée est congénique pour les deux (2) QTL identifiés sur le chromosome 10 (voir chapitres 3 et 5).

En comparant le niveau d'expression génique entre ces trois types de rats, nous menons une étude à large échelle, nous permettant d'identifier plusieurs séquences exprimées à des niveaux différents à travers le génome du rat. Les séquences qui seraient localisés dans les régions du QTL 1 ou du QTL 2 sur le chromosome 10 seraient des candidats particulièrement intéressants.

Cette étude a débuté par l'extraction de l'ARN de rein des souches et de la lignée d'intérêt. Nous avons utilisé FastTrack® 2.0 mRNA Isolation Kit d'Invitrogen pour extraire l'ARN. Les rats qui ont servi pour l'extraction de l'ARN étaient jeunes de cinq (5) semaines, réduisant ainsi l'effet de l'âge et de l'environnement et de l'état physiologique sur l'expression des gènes. En effet, un rat hypertendu a des mécanismes d'adaptation à l'hypertension, incluant un changement de l'expression de certains gènes (Yang *et al.*, 2002). L'ARN a été conservé à -80°C jusqu'à la réalisation de l'expérience. Nous avons délégué le déroulement de l'expérience au Montreal Genome Center de l'Université McGill. Les puces d'hybridisation d'Affymetrix (GeneChip®) ont été choisi pour cette expérience. Trois (3) puces ont été utilisé : Rat chip U34 A, Rat chip U34 B et Rat chip U34 C (chacun ayant 8700 gènes par puce).

Une série de 30 gènes et EST étaient différentiellement exprimés entre notre lignée congénique S.L.C10-16 et la souche S. Ceci représente seulement 1,25% du total des gènes examinés. De ceux-ci, seulement huit (8) ont été localisés sur le chromosome 10 ou le chromosome 16 du rat (tableau VI.I). Seuls ces résultats ont été considérés comme pouvant mener à l'identification d'un gène candidat dans ces régions d'intérêt spécifiques. Si les différences entre LEW et S.L.C10-16 avaient été considérées, les résultats n'auraient pas été valables en tant que de la source de la différence entre S et LEW causant l'hypertension artérielle, puisque le Chr 10 de LEW et de S.L.C10-16 sont de génotype LEW.

Identité de la séquence	S.L.C10-16 vs S	Localisation
Exp. EST 1	-4,32	Chr. 10
Exp. EST 2	-4,96	Chr. 10
Exp. EST 3	-3,83	Chr. 10
Exp. EST 4	2,58	Chr. 10
Exp. EST 5	2,58	Chr. 10
Exp. EST 6	-3,35	Chr. 10
Exp. EST 7	-2,51	Chr. 16
Exp. EST 8	2,51	Chr. 10

Tableau VI.I : Comparaison de l'expression génique entre la souche S.L.C10-16 et la souche parentale S

Note : Sur un total de 24 000 gènes est EST examinés, seulement 30 (1,25%) étaient différentiellement exprimés entre les souches S.L.C10-16 et S, dont 7 localisés sur le chromosome 10. La limite acceptable pour expression différentielle était de $\pm 2,50$ fois exprimé. Un signe négatif (-) devant les nombres signifie une sous-expression, tandis qu'une absence de signe signifie une sur-expression. La localisation des séquences a été accomplie par une combinaison d'une ou plusieurs des méthodes suivantes : *in silico* : <http://ratest.eng.uiowa.edu/cgi-bin/database/search> combiné avec <http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. *In vitro* : cartographie par hybrides de radiation, par génotype de marqueurs microsatellites sur les souches de rats du chromosome 10 et sur les YAC de la région d'intérêt. Plus de détails concernant la localisation sont indiqués dans le tableau VI.III.

Les séquences différentiellement exprimés qui ont été localisés au chromosome 10 par méthodes *in silico* (<http://ratest.eng.uiowa.edu/cgi-bin/database/search> combiné avec <http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ont

aussi été localisés par méthodes *in vitro* pour confirmer et raffiner le lieu de localisation. Nous avons développé des marqueurs à partir des séquences différentiellement exprimés (sondes dénommées Exp EST 1 à Exp EST 13, voir tableau VI.III), tel qu'ils nous ont été livré dans la banque de résultats. De plus, d'autres marqueurs ont été développés à partir des séquences EST auxquels les résultats se rapportent. Finalement, une nouvelle série de marqueurs CHM a été construite, chaque marqueur provenant d'une séquence microsatellite d'un BAC qui s'alignait avec la séquence différentiellement exprimée (tableau VI.II). Toutes les sondes ont été construites par l'usage d'une ressource Internet (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Les marqueurs microsatellites polymorphiques pouvaient être cartographiés directement par génotype sur nos lignées congéniques. Les autres marqueurs, non-polymorphiques, ont été cartographiés par hybrides de radiation. Les résultats ont été soumis au site <http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER/>. Pour les séquences ne pouvant pas être localisées par ces méthodes, des études d'homologie avec la souris ont été faites. En combinant toutes ces méthodes, sept (7) EST ont été localisé sur le chromosome 10 du rat (tableau VI.III). De ces 7 EST, aucun n'est situé dans la région d'un des deux QTL. La figure 6.1 montre la localisation précise de ces Exp. EST différentiellement exprimés. Tel que mentionné ci-haut, les Exp. EST ont été placés par cartographie par hybrides de radiation, par homologie sur le génome de la souris, par amplification par PCR des marqueurs produits à partir des séquences de clones BAC de la région, ou par amplification par PCR sur les clones YAC de la région (figure 5.7).

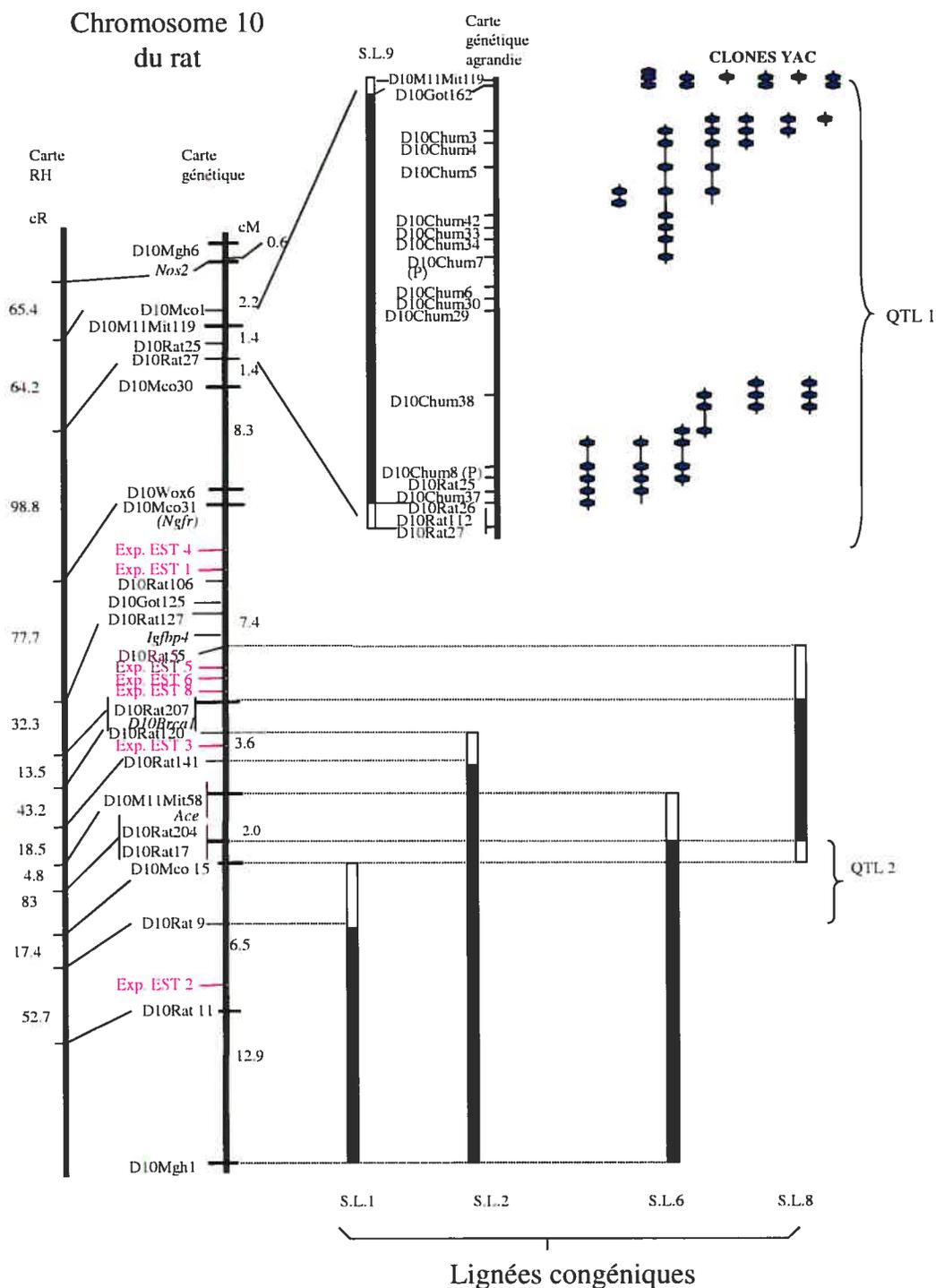


Figure 6.1 : Localisation des séquences différentiellement exprimées sur le chromosome 10, soit Exp EST 1 à Exp EST 6 et Exp. EST 8. La carte est une combinaison des figures 5.6 et 5.7. La « carte génétique agrandie » représente un agrandissement de la région entre D10M11Mit119 et D10Rat27.

Nom du Marqueur	Température (°C)	Condition (P ou A)	Polymorphisme	Taille (pb)
D10Chm 50	60	P	S=L	250
D10Chm 51	60	P	S=L	170
D10Chm 52	60	P	S=L	200
D10Chm 53	60	P	S=L	230
D10Chm 54	60	P	S=L	280
D10Chm 55	60	P	S=L	195
D10Chm 56	60	A	S>L	230/271
D10Chm 57	60	A	S<L	195
D10Chm 58	55	P	S=L	235
D10Chm 60	50	A	S>L	180
D10Chm 61	55	A	S<L	250
D10Chm 62	60	P	S=L	200
D10Chm 63	50	P	S=L	190

Tableau VI.II: Marqueurs microsatellites développés pour localiser les résultats de profil d'expression

Légende :

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

Temp. : Température de la réaction de polymérase en chaîne

S : Souche parentale Dahl salt-sensitive

L : Souche parentale Lewis (LEW)

Pb : paires de bases

P : gel de polyacrylamide

A : gel d'agarose

Note : La librairie de BAC de rats CHORI-230 a été utilisée comme ressource principale de clones (Osoegawa *et al.*, 1998). Pour le criblage de la librairie, les ressources *in silico* suivantes ont été employées :

<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Numéro d'EST	Localisation	Méthode de localisation	Nom des marqueurs utilisés	Confirmation par Iowa
Exp. EST 1	entre QTL 1 et QTL 2	RH	D10Chm50, D10Chm51, sonde Exp EST 1	Oui
Exp. EST 2	sous QTL 2	homologie	sonde Exp. EST 2	Chr. 18
Exp. EST 3	entre QTL 1 et QTL 2	homologie	D10Chm52, D10Chm 53, sonde Exp. EST 3	n/a
Exp. EST 4	entre QTL 1 et QTL 2	RH	D10Chm 50, D10Chm51, sonde Exp. EST 4	Oui
Exp. EST 5	entre QTL 1 et QTL 2	souches	D10Chm56, D10Chm 57, sonde Exp. EST 5	Oui
Exp. EST 6	entre QTL 1 et QTL 2	RH	D10Chm58, D10Chm59, sonde Exp. EST 6	Oui
Exp. EST 7	Chr. 16	ressources Internet		Oui
Exp. EST 8	entre QTL 1 et QTL 2	souches	D10Chm 56, D10Chm 57, sonde Exp. EST 8	n/a
Exp. EST 9	Chr. 4	homologie	D10Chm 62, D10Chm 63	Chr. 4
Exp. EST 10	Chr. 4	ressources Internet		Oui
Exp. EST 11	Chr. 8	ressources Internet		Oui
Exp. EST 12	Chr. 13	ressources Internet		Oui
Exp. EST 13	Chr. 9	ressources Internet		Oui

Tableau VI.III : Localisation des étiquettes de séquences exprimés (EST)

Légende :

Chr. : chromosome

Exp. EST : Étiquettes de séquences exprimés (EST) de façon différentielle

n/d : non-disponible

QTL : locus pour trait quantitatif

RH : localisation par hybrides de radiation

YAC : Yeast Artificial Chromosome

Note : pour les références des ressources Internet, consulter la légende du tableau VI.II.

6.2 LE CLONAGE DE *VEZFI* :

L'analyse moléculaire de la région du QTL continue par le clonage et le séquençage des gènes qui se trouvent dans la région. Il est probable que le QTL subisse encore une réduction de taille, mais il est tout de même efficace de débiter le clonage de certains gènes particulièrement pertinents. *VeZF1* est un des gènes candidats situés dans la région du QTL 1, car sa séquence s'aligne sur les clones BAC 12, 15 et 16 (figure 5.8). Après une analyse de tous les candidats situés dans cette région, nous avons décidé de nous attarder sur *VeZF1*, 'vascular endothelial zinc finger 1'. Ce gène code pour une protéine de 56kDa, dont l'expression est limitée aux cellules endothéliales vasculaires, et semble être liée à la vasculogénèse et à l'angiogénèse (Xiong *et al*, 1999). L'homologue humain de ce gène est *ZNF161*, situé sur le CHR.17. Cette protéine est exprimée dans une douzaine d'organes, incluant les reins et le cœur. Le gène *VeZF1* est composé de cinq (5) exons et de quatre (4) introns. La longueur totale du gène codant (incluant ses introns) est de 1596 bp chez la souris (Xiong *et al*, 1999). Nous avons vérifiées l'alignement du gène de la souris avec celui du rat selon les séquences de BAC sur lesquelles le gène s'alignait. Un logiciel disponible sur Internet (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>) sert à étudier l'alignement entre 2 séquences. Nous avons établi qu'une grande homologie (ex : exon 1 à 97% d'homologie) existe dans les exons entre la séquence murine et celle du rat. Par conséquent, la séquence de souris, disponible sur Internet, a servi à fabriquer des sondes pour le clonage du gène chez le rat. Deux sondes ont été construites : *VeZF1* MID, amplifiant une partie (1257 bp) du cDNA, et *VeZF1* TOP, amplifiant 1658 bp, donc le cDNA complet. Les sondes ont été utilisées sur du cDNA de rein de rat S. Les bandes ont été extraites d'un gel d'agarose, l'ADN a été isolé, puis cloné dans un vecteur TA (pCR 2.1). Ce vecteur a été multiplié, l'ADN de *VeZF1* de nouveau extrait. Les séquences du rat S pour *VeZF1* MID et *VeZF1* TOP ont par la suite été envoyés au Sheldon Center de l'Université McGill, pour séquençage. Pour mener une comparaison des séquences, il est essentiel d'isoler ce gène chez le rat LEW. Ceci devra être fait lorsqu'une librairie de cDNA LEW sera disponible. L'empêchement principal à cela est le coût : une telle librairie doit être faite sur mesure, pour nos rats, et les coûts qui y sont associés sont très élevés. Une autre

option serait l'utilisation de l'ADN génomique, mais il est possible d'introduire des erreurs de séquence lors de l'amplification de celle-ci par ACP.

CHAPITRE 7 :
CRITIQUES ET
DISCUSSION

7.1 DESCRIPTION DES QTL

Le développement des nouvelles lignées congéniques s'est fait à partir de la lignée S.L3, qui avait un effet sur la PA (chapitre 3). Le but était idéalement de construire une série de lignées non-chevauchantes couvrant la région de S.L3. Des lignées non-chevauchantes permettent de confirmer un effet à un endroit, en infirmant l'effet dans la région adjacente. En effet, si une lignée est positive et l'autre est négative, la localisation du QTL est faite par élimination. Dans le cas de mon étude, au chapitre 5, le QTL a été identifié par suffisance. Dans ce cas, une région restreinte est suffisante pour avoir un effet sur la PA. Ceci n'exclut pas la présence d'un QTL dans d'autres régions. D'ailleurs, il est possible de voir à la figure 5.2 que la lignée S.L10 a tendance à avoir une PA plus basse que S.L9. Ainsi, la lignée S.L10 peut contenir un régulateur, promoteur ou autre médiateur du QTL localisé dans la région de S.L9. Dans un cas comme celui-ci, il serait préférable de construire une lignée congénique couvrant uniquement la région non-chevauchante entre S.L9 et S.L10, afin de voir l'effet de cette région individuellement. Il pourrait y avoir une agglomération (clustering) de gènes pour le contrôle de la PA dans la région. De plus, afin d'infirmar la présence d'un QTL dans le reste de la région couverte par S.L3, il serait souhaitable de construire une lignée dans la région de S.L3 ne chevauchant pas avec S.L9. Cependant, la construction de telles lignées n'est pas toujours rapide. En effet, plus la région que l'on essaie de cerner est petite, plus les chances de recombinaison à l'intérieur de celle-ci sont faibles, car les chances de recombinaison diminuent proportionnellement avec la distance (Griffiths, A.J.F., 1996). De plus, certaines régions chromosomiques sont plus ou moins sujettes à la recombinaison (Froenicke *et al.*, 2002), ce pourrait être le cas dans cette zone du chr.10. Une nouvelle lignée congénique devrait toutefois être produite. D'ici là, il est important de se concentrer sur la plus petite région possible ayant un effet sur la pression artérielle, donc la distance couverte par S.L9, de 1,4 cM, afin d'identifier un premier QTL. Les autres QTL secondaires, possiblement contenus dans la zone couverte par S.L10, devront être analysés ultérieurement.

Il est difficile de commenter sur les effets différentiels de S.L.9 et S.L.10 au niveau de l'hypertrophie des organes, car les tensions artérielles des deux congéniques sont différentes, et qu'il existe peut-être un seuil à partir duquel la pression artérielle influence le poids des organes.

La lignée S.L13 ne semble pas reliée au contrôle de la pression artérielle, puisque aucun des paramètres mesurés par télémétrie ou lors du sacrifice des rats ne semble être significativement différent entre S et la lignée S.L13. Cet aspect souligne un point important. Le gène *Nos2*, de la synthétase d'oxyde nitrique 2, se trouve dans la région couverte par la lignée S.L13. Puisque la lignée S.L13 n'est pas retenue comme contenant un QTL pour la PA, le gène *Nos2* n'est pas soutenu comme étant un gène candidat. Plusieurs études ont déjà souligné l'intérêt qu'a *Nos2* dans le contrôle de la PA (Deng et Rapp, 1995; Moncada *et al.*, 1991). Toutefois, après une analyse plus approfondie, le gène a été exclu des régions identifiées comme contenant des QTL par liaison dans certains croisements de rats (Deng et Rapp, 1995), et dans certaines études utilisant des lignées congéniques (Dukhanina *et al.*, 1997; Deng, 1998b), quoique les données physiologiques appuient l'effet de la protéine de *Nos2* sur la PA (Deng, 1998b). Des études de « knock-out » ont aussi suggéré que cette protéine a la caractéristique de diminuer la PA (Deng, 1998b). Il est possible que le gène affecte un autre facteur qui indirectement influe sur la PA, ce qui expliquerait le manque de liaison directe entre la région génétique de *Nos2* et la pression artérielle. De plus, la région du QTL est adjacente au locus de *Nos2*, ce qui laisse supposer qu'il pourrait y avoir des séquences génétiques activatrices, promotrices ou inhibitrices du locus de *Nos2* dans la région du QTL. Ainsi, même si le QTL n'est pas situé où *Nos2* est situé, celui-ci pourrait affecter le gène du QTL indirectement. Pour vérifier cette hypothèse, l'expression du gène *Nos2* dans les différentes lignées devrait être mesurée. Cette stratégie expérimentale pourrait tester le rôle possible de séquences génétiques activatrices ou inhibitrices.

Le QTL2 a été localisé par les lignées S.L6 et S.L8, la première ayant un effet sur la PA et la seconde n'en ayant pas (figure 5.4b). Le QTL couvre donc une région de moins de 7.9 cM (figure 5.6). On voit par les données de MAP que la lignée S.L8

a tout de même une pression artérielle plus basse de S, mais que cette différence n'est pas significative. Il s'y trouve donc possiblement un gène ou un facteur influant faiblement sur la pression artérielle. En effet, puisque la seule variable par lequel la lignée S.L8 diffère significativement de S est l'hypertrophie cardiaque (figure 5.5a), il se peut qu'un gène qui s'y trouve ait un rapport à cette variable, mais que ce ne soit pas assez pour baisser la PA de façon significative. Dans le cas de la lignée S.L6, on remarque que l'hypertrophie cardiaque et aortique sont significativement réduites par rapport à la lignée S (figure 5.5a, b). L'hypertrophie rénale est également réduite, excluant le rein droit (figure 5.5c). Puisque plusieurs paramètres associés à la PA sont altérés par rapport à S, il est logique de croire que dans ce cas-ci, c'est la baisse de la PA qui est la source de la réduction de l'hypertrophie. Autrement, il serait surprenant de voir qu'un seul QTL affecte tous les paramètres de la PA. Cette remarque appuie l'hypothèse de cause à effet, c'est-à-dire qu'une altération de la PA (par un facteur physiologique quelconque) cause des changements anatomiques dans les organes associés au contrôle de la PA (De Jong, 1984). En contraste, il est possible d'émettre l'hypothèse que la lignée S.L6 contient un gène pléiotropique. La pléiotropie désigne la capacité d'un gène d'affecter plusieurs traits de façon simultanée (Schork *et al.*, 1996). Ainsi, l'effet de S.L6 ne serait peut-être pas un appui pour le modèle de cause à effet de la PA sur les autres paramètres, mais plutôt un modèle de pléiotropie. Il serait par contre très difficile de concevoir une étude pour élucider la relations entre les phénotypes, sans avoir préalablement identifié de gène en question (Schork *et al.*, 1996).

Afin d'analyser l'étendue de l'effet des QTL1 et QTL2, il serait intéressant de construire des doubles congéniques avec d'autres régions génomiques contenant aussi des QTL. C'est ainsi que l'on déterminera la toile des QTL et les interactions entre ceux-ci pour contrôler la PA. En effet, une étude a déjà déterminée qu'il existe une interaction épistatique entre une grande région du chr.10 et une région du chr.2 (Rapp *et al.*, 1998). De telles interactions gène-gène, qu'elles soient épistatiques, complémentaires ou suppressives, affectent fréquemment un phénotype polygénique (Deng, 1998a). Afin d'élucider et de comprendre globalement la génétique de

l'hypertension essentielle, il sera important à l'avenir d'éclaircir ces interactions géniques. Pour débiter une telle entreprise, une lignée double congénique entre le chromosome 10 et le chromosome 16 a été créée. Les résultats de télémétrie et d'hypertrophie pour cette lignée sont en attente. Une autre technique qui permettrait de confirmer nos résultats et possiblement d'élucider de nouveaux QTL serait de construire des lignées congéniques avec des génotypes inverses. Un arrière-plan LEW arborerait un remplacement homologue de génotype S à la région d'intérêt. Le rat congénique devra alors voir sa PA augmenter par rapport à celle de LEW, si la zone congénique contient un QTL pour la PA. Le problème majeur avec cette méthodologie est qu'il se peut que la souche LEW ait un effet génique trop dominant. Ainsi, les mesures de PA risquent de ne pas être significativement différents entre S et LEW, malgré la présence d'un QTL. Dans ces cas, il faudrait alors baisser les niveaux de signifiante statistiques.

Une étude pharmacogénétique parallèle à celle présentée ci-contre serait intéressante. Dans une telle étude, les lignées congéniques seraient soumises à des traitements pharmacologiques, comme des inhibiteurs de l'ECA. Dans le cas du chromosome 10 en particulier, les QTL étant situés près du gène de l'ECA. De plus, une telle étude impliquerait le système rénine-angiotensine (Schork *et al.*, 1996), donc révélerait des QTL se rapportant à ce système de contrôle.

Outre ces aspects, il serait également important de considérer le stade de développement des rats. Rares sont les études de cartographie de QTL qui prennent ce facteur en considération (Schork *et al.*, 1996). En effet, différents gènes exercent leurs effets à différents âges, il serait donc profitable de soumettre les rats congéniques à la télémétrie à différents âges. Ceci révélerait possiblement de nouveaux QTL, ou procurerait de l'information supplémentaire quant aux QTL déjà localisés.

7.2 CARTOGRAPHIE PHYSIQUE

À 1,4 cM, la région du QTL1 était assez restreinte pour débiter son analyse moléculaire. Ceci s'est entamé par le développement de la carte physique de la

région. Celle-ci a été commencée par des YACs, et c'est alors que la ressource Internet de BAC est devenue disponible (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/>, http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html). Ainsi, la poursuite de la cartographie est devenue beaucoup plus rapide et efficace par l'usage des BACs. De plus, la carte de YAC était déjà bien développée, mais contenait certains trous qui étaient difficiles à remplir. En criblant la librairie de BAC sur Internet avec nos marqueurs, plusieurs de ceux-ci se sont alignés sur les BACs. Les paramètres minimaux pour une homologie étaient de au moins 85% d'homologie, sur un minimum de 100 bp, avec des discontinuités maximales de 20 bp, tel que suggérés par Kwitek et collaborateurs (Kwitek *et al.*, 2002). Il reste tout de même des discontinuités dans la carte physique, probablement parce que les BACs de rat ne sont pas encore tout à fait séquencés. La carte physique a permis d'établir une carte de transcription de la région du QTL 1. En effet, 11 séquences exprimés (EST) y ont été placés. Il a été difficile de localiser des gènes, puisque le séquençage du génome du rat est encore peu développé et que peu de séquences génétiques sont disponibles. Ainsi, il a été nécessaire d'utiliser la cartographie par homologie pour construire une carte de transcription complète.

Les BACs qui se trouvent dans la région servent aussi à créer des marqueurs. Sur les 42 marqueurs développés à partir de séquences microsatellites dans les BACs (tableau V.I), 11 étaient polymorphiques entre les souches S et LEW. Ceci représente 26% des marqueurs. C'est un faible pourcentage considérant que théoriquement, 50% des marqueurs devraient être polymorphiques entre ces deux souches de rats (Ginn *et al.*, 1993). Malgré cela, les marqueurs polymorphiques sont très utiles au criblage d'évènements de recombinaison pour la construction de nouvelles lignées congéniques et pour la cartographie génétique plus précise des lignées existantes. De plus, avec des nouveaux BACs et avec des nouvelles séquences microsatellites dans les BACs existants, il est probable que des nouveaux marqueurs polymorphiques soient trouvés.

Les séquences des gènes humains susceptibles de se trouver dans la région homologue selon la cartographie brute ont été soumises au pairage d'homologie aux

BACs de rats. Cette méthodologie a permis de situer plus de 20 gènes (figure 5.8) dans la région du QTL 1. Ceci constitue un grand nombre de gènes pour une petite région de 1,4 cM. En effet, il est connu que certaines régions sont enrichies en gènes par rapport à d'autres (Venter *et al.*, 2001). Puisque la région du QTL1 est dense en gènes, plusieurs gènes candidats s'y trouvent. En fait, puisque plus d'un QTL pour l'hypertension artérielle se trouvent sur le chr.10, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'il y a une agrégation ('clustering') de gènes de contrôle de la PA sur le chr.10. L'agrégation génique est définie par deux ou plus de loci contrôlant des fonctions reliées, qui sont situés sur un même fragment de transcription génique, et qui ne sont pas séparés par un gène non-relié (Genetic Analysis, 1996). Le phénomène d'agrégation a déjà été élucidé dans le cadre de l'hypertension artérielle essentielle (Pravenec *et al.*, 2002), donc cette possibilité n'est pas négligeable dans le cas des QTL du chromosome 10.

Lorsque les candidats seront choisis pour le clonage, la nature de ceux-ci devra être analysée en profondeur, afin de détecter des relations possibles entre les gènes, de par leurs fonctions. Idéalement, puisque plusieurs gènes se trouvent dans cette région malgré le fait qu'elle soit petite, il serait aussi souhaitable de produire encore des sous-lignées congéniques, afin de réduire le nombre de candidats.

7.3 HOMOLOGIES HUMAINES

Les régions identifiées comme étant des QTL pour l'hypertension sur le chr.10 du rat ont potentiellement une grande importance pour l'hypertension essentielle humaine. Effectivement, le CHROMOSOME 17 humain est homologue au chr.10 du rat sur une grande région, incluant celle des deux QTL. De plus, le CHR 17 a été isolé par des études de liaison (Julier *et al.*, 1997; Baima *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2000), qui ont démontrés que certaines régions de ce chromosome co-ségréguaient avec le phénotype de l'hypertension dans certaines populations humaines. Après avoir réduit la région des QTL sur le chr.10 du rat, on remarque que ceux-ci se situent toujours dans les régions d'intérêt homologues chez les humains

(figure 5.9). Les gènes humains qui ont été trouvés par la construction de la carte de transcription sont donc tous des gènes candidats pour l'hypertension essentielle humaine. La prochaine étape dans l'identification du QTL est le clonage de ces gènes (en ordre d'importance selon leur fonction) chez le rat, la détermination d'une mutation entre les souches S et LEW, puis ensuite la confirmation par la création d'un rat transgénique pour le gène. Une telle étude sur le gène de l'*Eca* a déjà été menée (Koike *et al.*, 1994). Ce gène a été cloné dans deux souches de rats, soit les souches SHRSP et WKY. L'étude avait révélée des mutations, mais celles-ci n'avaient pas d'effets fonctionnels sur la protéine. Cette même méthodologie a été entamée pour le gène *Vezfl* du rat, homologue à *ZNF161* humain.

Le gène l'*Eca* doit être discuté à ce point. Notre étude ne supporte pas ce gène en tant que candidat de contrôle de la PA. Ceci est surprenant car il est bien établi dans la littérature que l'enzyme de conversion de l'angiotensine a un effet marqué sur la PA. En effet, plusieurs médicaments anti-hypertenseurs sont des inhibiteurs de l'ECA chez l'homme (SQHA, 2002). Il est possible que dans le croisement spécifique des rats S et LEW, *Eca* ne soit réellement pas un facteur. Dans ce croisement, il se peut que le QTL soit un facteur associé à l'*Eca*. On peut émettre l'hypothèse que le QTL contrôle le métabolisme du sel. En effet, l'augmentation de la production de l'ECA est induite par l'augmentation de sel dans la diète, mais est indépendante de l'hypertension artérielle (Zhao *et al.*, 2000).

7.4 SOURCES D'ERREURS

Cette étude se base sur une confiance dans les données de pression artérielle et d'hypertrophie. Par conséquent, la méthode de mesure de ces paramètres doit être la plus précise possible. Plusieurs techniques servent à mesurer la PA chez les animaux. Certaines méthodes sont indirectes, tel le serrement par la queue, tandis que d'autres sont directes, comme le cathéter rempli de solution saline (Van Vliet *et al.*, 2000). De plus, certaines méthodes nécessitent l'anesthésie, tandis que d'autres sont applicables sur des rats en éveil. Également, certaines méthodes restreignent le mouvement des

animaux, tandis que d'autres leur permettent de se déplacer librement. Finalement, certaines méthodes peuvent mesurer la PA sur de courtes périodes seulement, tandis que d'autres prennent des mesures à long terme. La télémétrie est une des plus efficaces techniques de mesure de la PA. Elle permet aux rats de se déplacer librement, en état d'éveil, elle mesure la PA de façon directe et sur une période de temps prolongée. De plus, elle permet d'obtenir des mesures de haute-fidélité et de haute-précision, pourvu que l'engin soit re-calibré à chaque nouvelle implantation (Van Vliet *et al.*, 2000). Trois désavantages de la télémétrie existent. Premièrement, c'est une technique invasive, c'est-à-dire qu'il faut implanter la sonde à l'intérieur des animaux. Ce fait ne constitue pas un grand problème lorsqu'une personne expérimentée implante la sonde, en suivant une méthodologie éprouvée. Deuxièmement, la sonde implantée à l'intérieur de l'abdomen de l'animal peut affecter la croissance des organes qui y sont adjacents. Dans le contextes des études présentées ici, c'est un facteur important puisque la sonde est près du rein, et que le poids des reins est pris en considération dans nos résultats. Troisièmement, c'est une technique qui est dispendieuse. Malgré ces désavantages, c'est la technique idéale pour nos fins : c'est une technique précise, elle ne constitue donc probablement pas une source d'erreur dans l'étude présente.

Une source d'erreur potentielle est le faible nombre d'échantillons de rats en télémétrie pour chaque lignée. Afin de minimiser l'erreur possible liée à la portée, c'est-à-dire que chaque portée va subir les effets de la manipulation de façon différente (Denenberg, 1999), nous regroupons plusieurs rats de différentes portées mais de la même lignée. Toute portée va comporter certains éléments variables, malgré tout les efforts possibles pour uniformiser leurs conditions. Des variations peuvent être dues au nombre de rats dans la portée, au niveau de soins accordés aux rats par la mère, ou à l'étage sur laquelle leur cage est placée, par exemple. Ces effets devraient être minimes car nous tentons d'uniformiser les conditions. Malgré tout il est important de grouper les portées car le groupage contrôle pour ces minimes variations. Quatre rats constitue un minimum de taille d'échantillon afin d'obtenir des résultats valables statistiquement. Puisque nous prenons des rats de portées

différentes, plusieurs rats doivent être élevés pour obtenir l'échantillon minimal. De plus, une fois sur la diète enrichie en sel, certains rats très hypertendus succombent à la maladie, diminuant encore la taille de l'échantillon par rapport à celle prévue au départ.

Un autre source d'erreur potentielle est le génotype des rats eux-mêmes. Les rats choisis pour aller en télémétrie sont entièrement génotypés à l'endroit de leur région d'intérêt, et un criblage complet de leur génome est aussi fait afin d'assurer que le reste de leurs chromosomes sont de génotype S. Ce criblage est performé avec une série de marqueurs microsatellites dispersés à travers le génome, à distances égales les uns des autres. Pourtant, il se peut qu'une toute petite région, entre deux marqueurs utilisés pour le criblage, se soit recombinié avec le génotype d'un rat LEW au cours d'une méiose. Cette région pourrait potentiellement affecter le contrôle de la PA chez le rat. Quoi que de tels évènements soient rares à cause que les marqueurs de criblage sont à des distances relativement proches les unes des autres (en moyenne une distance d'approximativement 18 cM), et qu'une telle situation se produit après une double recombinaison, il reste tout de même à peu près 2,25% de chances de recombinaison entre deux de ces marqueurs (18 cM = 18%, mais il faut que la recombinaison se fasse à l'intérieur des deux marqueurs pour ne pas être détectée, donc ≈ 15 cM = 15%; ensuite il faut une double recombinaison : $15\% \times 15\% = 2,25\%$). Théoriquement, on devrait avoir des marqueurs polymorphiques, servant au criblage du génome au complet, à chaque 10 cM (Markel *et al.*, 1997).

Un autre facteur pour lequel il n'y a pas de vérification directe est la quantité de nourriture ingérée par chaque rat. Le poids des rats est mesuré lors du sacrifice, et il est probable que leur poids soit proportionnel à la nourriture qu'ils ingèrent. Malgré cela, il est possible que certains rats soient plus aptes à prendre du poids avec peu de nourriture, surtout si leurs génotypes sont différents (entre S et un congénique, par exemple). Effectivement, il est possible que le trait qui contrôle la PA affecte aussi la prise de poids de l'animal. D'ailleurs, il existe des cas dans lesquels l'hypertension et le contrôle du poids sont associés par un facteur physiologique indépendant, comme

chez les rats génétiquement hypertendus SHR (Wallen *et al.*, 2002). Ainsi, le poids d'un rat S et d'un rat congénique pourrait être le même, malgré une consommation inégale de nourriture. Le problème survient au niveau de la consommation de sel. L'accumulation de sel dans le corps du rat est directement proportionnel à la quantité de nourriture qu'il ingère car les rats sont nourris d'une moulée hypersalée. L'ingestion de sel est directement proportionnelle à l'effet sur la pression artérielle, comme le démontrent les graphiques de MAP, SAP et DAP qui croissent continuellement avec le temps (figures 5.2 et 5.4), probablement sous l'effet de l'augmentation de sel dans le corps des rats avec le temps. D'ailleurs, les rats LEW, insensibles au sel, ont une MAP, SAP et DAP stable sur toute la durée de la télémétrie (figures 5.2 et 5.4), malgré une accumulation de sel dans leur organisme. Il serait avantageux de surveiller la quantité de nourriture consommée.

7.5 PROFILAGE D'EXPRESSION GÉNÉRIQUE

Les études de profilage d'expression génique servent de complément aux résultats fournis par les lignées congéniques. En effet, quoique les résultats d'une étude de profilage d'expression génique soient éloquentes, ils sont souvent trop vastes et manquent de spécificité. En appliquant ces résultats en conjonction avec ceux des congéniques, il est possible d'obtenir une plus grande spécificité. De plus, l'utilisation de l'ARN de nos lignées congéniques augmente la puissance des résultats. Le fait de trouver des séquences exprimées différemment n'est pourtant pas une finalité. À ce point, il est essentiel de vérifier la différence d'expression par Northern Blot et/ou par amplification en chaîne par polymérase en temps réel (ACP-TR), d'identifier la nature des gènes, de les cloner et vérifier si la cause d'une différence d'expression est une mutation. Ensuite, pour prouver que le gène identifié est effectivement la source de l'hypertension chez le rat S, il faut produire un rat transgénique pour ce gène et en étudier les paramètres physiologiques. En somme, le profilage d'expression génique constitue une source importante d'information, mais doit être vérifié par d'autres méthodes.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Depuis le début des années 1990, le chromosome 10 du rat fait l'objet d'intenses études dans la recherche de QTL pour la pression artérielle. Cette étude a permis de confirmer la présence de deux QTL indépendants pour la pression artérielle sur le chromosome 10. Ces QTL couvrent des régions plus restreintes que dans n'importe quelle étude menée jusqu'à ce jour. Le QTL 1 est d'une longueur de 1,4 cM, et le QTL2 est d'une longueur de moins de 8,5 cM.

La région du QTL 2 devrait être réduite de nouveau afin de débiter son analyse moléculaire. Pour ce faire, une série de nouvelles lignées congéniques devront être construites à partir des lignées congéniques existantes dans la région de ce QTL. Il sera alors nécessaire de répéter les mesures de pression artérielle (PA) et des autres paramètres physiologiques, pour cerner une région de 1 à 2 cM.

Puisque la région du QTL 1 est entre 1 et 2 cM, son analyse moléculaire a débuté. Ainsi, la carte physique de YAC et de BAC de la région est achevée. Ceci a permis le développement de la carte de transcription. Par la carte de transcription, on peut voir que plusieurs gènes et séquences exprimées (EST) se trouvent dans la région du QTL 1. Un premier gène candidat de la région, *Vezfl*, a déjà été cloné chez le rat S, mais il reste à faire une étude comparative entre les deux souches S et LEW. De plus, tous les gènes et EST de la région du QTL 1 devront être clonés un à un, afin de vérifier s'il existe des mutations dans la séquence des gènes entre le rat S et le rat LEW. Ceci permettra d'identifier le QTL, le gène. Une fois identifié, il faudra caractériser son produit protéique, et mener des essais biochimiques pour attribuer une altération fonctionnelle à la molécule. Par la suite, il faudra créer un rat S transgénique de génotype LEW pour le gène en question afin d'assurer que le gène suffit pour causer une baisse de la PA. Il demeure important de considérer les mutations qui entraîneraient des changements dans les niveaux d'expression de ces gènes, car ces types de mutations pourraient ne pas apparaître lors de l'analyse de séquences génétiques.

Puisque le but de toutes ces études est le traitement de l'hypertension artérielle humaine par la thérapie génique, il faudra identifier ce même facteur chez l'humain, s'assurer qu'il a toujours le même impact et la même fonction que chez le rat.

Dans le cas du chromosome 10, une importante région d'homologie existe avec le chromosome (CHR) 17 humain. Ce chromosome est d'un intérêt particulier puisque trois études de liaison indépendantes dans des populations humaines ont conclu que des QTL existaient pour la PA sur le CHR 17 humain (Julier *et al.*, 1997; Baima *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2000). Après avoir comparé les régions d'homologie entre le rat et l'humain, les zones d'intérêt sont encore situés dans les régions correspondantes. Il est donc probable que le QTL du rat soit le même chez l'humain. Après l'identification du QTL chez le rat, il sera essentiel de séquencer ce gène chez deux populations humaines également.

Deux gènes qui ont longtemps été considérés comme des candidats pour le contrôle de la pression artérielle, *Ace* et *Nos2*, ne sont pas soutenus comme candidats dans cette étude. Tel que discuté précédemment, il est possible que ce soit une caractéristique de ce croisement de rats en particulier, et il serait utile de confirmer les résultats en menant des études sur d'autres croisements de rats.

Nous avons aussi mené des études de profilage d'expression génique. À ce stade, les séquences différentiellement exprimées ont été localisés dans le génome du rat. Malgré la présence de plusieurs candidats sur le chromosome 10, aucun ne se situe dans les régions des QTL. Il se peut que ces candidats aient une influence tout de même, par exemple à cause de l'effet de la position. Avant d'aborder le sujet plus profondément, il sera essentiel de vérifier les résultats de profilage d'expression par des Northern Blot et/ou par amplification en chaîne par polymérase en temps réel (ACP-TR, ou RT-PCR). Ces méthodes permettront d'assurer que les séquences sont réellement exprimées à des niveaux différents dans les deux souches parentales et dans les souches congéniques. Il sera ensuite utile de mener des études biochimiques afin d'élucider l'impact d'une variabilité dans l'expression de la séquence au niveau physiologique.

Par cette étude, la région du QTL 1 est au dernier stade de son identification et celle du QTL 2 est considérablement raccourcie. De plus, la carte génétique et la carte

physique de la région ont largement été développés. C'est la première fois que l'identification d'un QTL pour la pression artérielle sur le chr.10 du rat est si proche de son but. Malgré toute l'information à laquelle nous avons accès à ce stade, il est reste tout de même du travail considérable à mener.

RÉFÉRENCES

- Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell.*, Third Edition edition. Garland Publishing, Inc., New York.
- Animal Health Center. Mice and Rats- General care. <http://www.caringtogether.com/exotics/micerats2.html#e> . 2002.
- Baima, J., M. Nicolaou, F. Schwartz, A. L. DeStefano, A. Manolis, I. Gavras, C. Laffer, F. Eljovich, L. Farrer, C. T. Baldwin, and H. Gavras. 1999. Evidence for Linkage Between Essential Hypertension and a Putative Locus on Human Chromosome 17. *Hypertension* **34**:4-7.
- Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center. Rat Genome Project. <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/> . 2002.
- Ben-Ishay, D., R. Saliternik, and A. Welner. 1972. Separation of Two Strains of Rats with Inbred Dissimilar Sensitivity to DOCS-salt Hypertension. *Experientia* **28**:1321-1322.
- Bianchi, G., and U. Fox. 1974. Impasciati E: The Development of a New Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Life Sciences* **14**:339-347.
- Bihoreau, M.-T., L. Sebag-Montefiore, R. F. Godfrey, R. H. Wallis, J. H. Brown, P. A. Danoy, S. C. Collins, M. Rouard, P. J. Kaisaki, G. M. Lathrop, and D. Gauguier. 2001. A High-Resolution Consensus Linkage Map of the Rat, Integrating Radiation Hybrid and Genetic Maps. *Genomics* **74**:57-69.
- Cai, L., L. C. Schalkwyk, A. Schoeberlein-Stehli, R. Y. L. Zee, A. Smith, T. Haaf, M. Goerges, H. Lehrach, and K. Lindpaintner. 1997. Construction and Characterisation of a 10-Genome Equivalent Yeast Artificial Chromosome Library for the Laboratory Rat, *Rattus norvegicus*. *Genomics* **39**:385-392.
- Chalhoub, N., N. Benachenhou, and J. Vacher. 2001. Physical and transcriptional map of mouse Chromosome 10 proximal region syntenic to human 6q16-q21. *Mammalian Genome* **12**:887-892.
- Clark, J. S., B. Jeffs, A. O. Davidson, W. K. Lee, N. H. Anderson, M.-T. Bihoreau, J. M. Brosnan, A. M. Devlin, A. W. Kelman, K. Lindpaintner, and A. F. Dominiczak. 1996. Quantitative Trait Loci in Genetically Hypertensive Rats. *Hypertension* **28**:898-906.
- Cowley, A. W. Jr., R. J. Roman, M. L. Kaldunski, P. Dumas, J. G. Dickhout, A. S. Greene, and H. J. Jacob. 2001. Brown Norway Chromosome 13 Confers Protection from High Salt to Consomic Dahl S Rats. *Hypertension* **37**:456-461.
- Dahl, L. K., M. Heine, and L. Tassinari. 1962. Effects of Chronic Excess Salt Ingestion. *Journal of Experimental Medicine* **115**:1173-1190.

- De Jong, Wybren. 1984. Experimental and Genetic Models of Hypertension, Elsevier Science, Handbook of Hypertension collection.
- Denenberg, V. H. 1999. Commentary: Is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy? *Developmental Psychobiology* **34**:1-3.
- Deng, A. Y. 1992a. Determining Quantitative Trait Loci for Blood Pressure in the Rat - Implication for Human Genetic Hypertension. Pages 81-111 in T. A. Dragani editor. *Human Polygenic Diseases: Animal Models*. Harwood Academic Publishers, Milan.
- Deng, A. Y., and J. P. Rapp. 1992b. Cosegregation of Blood Pressure with Angiotensin Converting Enzyme and Atrial Natriuretic Peptide Receptor Genes Using Dahl Salt-Sensitive Rats. *Nature Genetics* **1**:267-272.
- Deng, A. Y., and J. P. Rapp. 1995. Locus for the Inducible, but Not a Constitutive, Nitric Oxide Synthase Cosegregates with Blood Pressure in the Dahl Salt-Sensitive Rat. *Journal of Clinical Investigation* **95**:2170-2177.
- Deng, A. Y. 1998. In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats. *Journal of Hypertension* **16**:1707-1717.
- Deng, A. Y. 1998. Is the nitric oxide system involved in genetic hypertension in Dahl rats? *Kidney International* **53**:1501-1511.
- Deng, A. Y., J. Dutil, and Z. Sivo. 2001. Utilization of marker assisted congenics to map two blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats. *Mammalian Genome* **12**:612-616.
- Dracheva, S. V., E. F. Remmers, S. Chen, L. Chang, P. S. Gulko, Y. Kawahito, R. E. Longman, J. Wang, Y. Du, J. Shepard, L. Ge, B. Joe, S. Kotake, J. L. Salstrom, T. Furuya, J. Hoffman, G. W. Cannon, M. M. Griffiths, and R. L. Wilder. 2000. An Integrated Genetic Linkage Map with 1137 Markers Constructed from five F2 Crosses of Autoimmune Disease-Prone and -Resistant Inbred Rat Strains. *Genomics* **63**:202-226.
- Dukhanina, O. I., H. Dene, A. Y. Deng, C. R. Choi, B. Hoebee, and J. P. Rapp. 1997. Linkage map and congenic strains to localize blood pressure QTL on rat chromosome 10. *Mammalian Genome* **8**:229-235.
- Dupont, J., J. C. Dupont, A. Fromen, H. Milon, and M. Vincent. 1973. Selection of Three Strains with Spontaneously Different Levels of Blood Pressure. *Biomedicine* **19**:36-41.
- Dutil, J., M. Moujahidine, C. Lemieux, M. Jankowski, J. Gutkowska, and A. Y. Deng. 2001. Chromosomal and comparative mapping of rat oxytocin, oxytocin receptor and vasopressin genes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **93**:57-59.

- Froenicke, L., L. K. Anderson, J. Weinberg, and T. Ashley. 2002. Male Mouse Recombination Maps for Each Autosome Identified by Chromosome Painting. *American Journal of Human Genetics* **71**.
- Garrett, M. R., H. Dene, R. Walder, Q.-Y. Zhang, G. T. Cicila, S. Assadnia, A. Y. Deng, and J. P. Rapp. 1998. Genome Scan and Congenic Strains for Blood Pressure QTL Using Dahl Salt-Sensitive Rats. *Genome Research* **8**:711-723.
- Garrett, M. R., X. Zhang, O. I. Dukhanina, A. Y. Deng, and J. P. Rapp. 2001. Two Linked Blood Pressure Quantitative Trait Loci on Chromosome 10 Defined by Dahl Rat Congenic Strains. *Hypertension* **38**:779-785.
- Ginn, D. I., C. A. C. Baptista, K. Y. Alam, A. Y. Deng, G. T. Cicila, H. S. Margolius, and J. P. Rapp. 1993. Estimate of the Genetic Divergence Between Inbred Dahl Salt-Sensitive and Salt-Resistant Rats. *Journal of Hypertension* **11**:477-481.
- Green, E. D., and M. V. Olson. 1990. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:1213-1217.
- Griffiths A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin, and W. M. Gelbart. 1996. *An introduction to Genetic Analysis.*, sixth edition edition. W.H.Freeman and Company, USA.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges, and R. Snell. 2001. Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine *DGAT1* Gene with Major Effects on Milk Yield and Composition. *Genome Research* **12**:222-231.
- Guidelines Subcommittee. 1999. 1999 World Health Organization - International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *Journal of Hypertension* **17**:151-183.
- Guyton A. C. 1980. *Circulatory Physiology III: Arterial Pressure and Hypertension.* W.B. Saunders Company.
- Hadley, M. E. 1996. Adrenal Steroid Hormones. Pages 338-369 in J. Loftus editor. *Endocrinology.* Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ.
- Hamet, P., M. A. Kaiser, Y. Sun, V. Pagé, M. Vincent, and V. Kren. 1996. *HSP27* locus cosegregates with left ventricular mass independantly of blood pressure. *Hypertension* **28**:1112-1117.

- Hilbert, P., K. Lindpaintner, J. S. Beckmann, T. Serikawa, F. Soubrier, C. Dubay, P. Cartwright, B. De Gouyon, S. Takahasi, M. Vincent, D. Ganten, M. Georges, and G. M. Lathrop. 1991. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* **353**:521-529.
- Institut de Génétique Humaine. GENESTREAM Bioinformatics Resource server. <http://xylian.igh.cnrs.fr/> . 2001.
- Jacob, H. J., K. Lindpaintner, S. E. Lincoln, K. Kusumi, R. K. Bunker, Y.-P. Mao, D. Ganten, V. J. Dzau, and E. S. Lander. 1991. Genetic Mapping of a Gene Causing Hypertension in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat. *Cell* **67**:213-224.
- Julier, C., M. Delépine, B. Keavney, J. Terwilliger, S. Davis, D. E. Weeks, T. Bui, X. Jeunemaître, G. Velho, P. Froguel, P. Ratcliffe, P. Corvol, F. Soubrier, and G. M. Lathrop. 1997. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Human Molecular Genetics* **6**:2077-2085.
- Koike, G., J. E. Krieger, H. J. Jacob, M. Mukoyama, R. E. Pratt, and V. J. Dzau. 1994. Angiotensin Converting Enzyme and Genetic Hypertension: Cloning of Rat cDNAs and Characterization of the Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **198**:380-386.
- Kreutz, R., N. Hübner, M. R. James, M.-T. Bihoreau, D. Gauguier, G. M. Lathrop, D. Ganten, and K. Lindpaintner. 1995. Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:8778-8782.
- Kwitek A.E., Tonellato P.J., Chen D., Gullings-Handley J., Twigger S., Scheets T.E., Cassavant T.L., Stoll M., Soares M.B., Sheffield V.C. & Jacob H.J. Virtual Comparative Maps: A Genomic Tool to Compare Cross-species Loci Contributing to Hypertension. *Satellite Symposium on the Genetics of Experimental and Human Hypertension - V: From Mendel to Humans* , 17. 2002.
Type de référence: Abrégé
- Lander, E., and L. Kruglyak. 1995. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics* **11**:241-247.
- Lee, R. M., and CR. Triggle. 1986. Morphometric study of mesenteric arteries from genetically hypertensive Dahl strain rats. *Blood Vessels* **23**:199-224.
- Lee, R. M., K. Berecek, J. Tsoporis, R. McKenzie, and CR. Triggle. 1991. Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. *Hypertension* **17**:141-150.

- Levy, D., A. L. DeStefano, M. G. Larson, C. J. O'Donnell, R. P. Lifton, H. Gavras, A. L. Cupples, and R. H. Myers. 2000. Evidence for a Gene Influencing Blood Pressure on Chromosome 17. *Hypertension* **36**:477-483.
- Markel, P., C. Ebeling, G. A. Carlson, D. L. Nagle, J. S. Smutko, and K. J. Moore. 1997. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genetics* **17**:280-284.
- Masciotra, S., S. Picard, and D. F. Deschepper. 1999. Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circulation Research* **84**:1453-1458.
- McCarthy, L. C., M.-T. Bihoreau, S. L. Kiguwa, J. Browne, T. K. Watanabe, H. Hishigaki, A. Tsuji, S. Kiel, C. Webber, M. E. Davis, C. Knights, A. Smith, R. Critcher, P. Huxtall, J. R. J. Hudson, T. Ono, H. Hayashi, T. Takagi, Y. Nakamura, A. Tanigami, P. N. Goodfellow, G. M. Lathrop, and M. R. James. 2000. A whole-genome radiation hybrid panel and framework map of the rat genome. *Mammalian Genome* **11**:791-795.
- Medical College of Wisconsin from the National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI) of the National Institutes of Health (NIH). Rat Genome Database. <http://rgd.mcw.edu/> . 2002.
- Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1991. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* **43**:109-142.
- Morel, L., K. R. Blenman, B. P. Croker, and E. K. Wakeland. 2001. The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, *Sle1*, is a cluster of functionally related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:1787-1792.
- Moujahidine, M., J. Dutil, P. Hamet, A.Y. Deng. 2002. Congenic mapping of a blood pressure QTL on chromosome 16 of Dahl rats. *Mammalian Genome* **13**: 153-156.
- Mouse Genome Informatics. Inbred Strains of Rats: Lewis. <http://www.informatics.jax.org/external/festing/rat/docs/LEW.shtml> . 1998.
- National Center for Biotechnology Information. NCBI Home Page. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . 2002.
- Okamoto, K., and K. Aoki. 1963. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Japanese Circulation Journal* **27**:282-293.
- Osoegawa, K., P. Y. Woon, B. Zhao, E. Frengen, M. Tateno, J. J. Catanese, and P. de Jong. 1998. An improved Approach for Construction of Bacterial Artificial Chromosome Libraries. *Genomics* **52**:1-8.

- Pinto, Y. M., M. Paul, and D. Ganten. 1998. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research* **39**:77-88.
- Pravenec, M., V. Zidek, A. Musilova, M. Simakova, V. Kostka, P. Mlejnek, V. Kren, D. Krenova, V. Bila, B. Mikova, M. Jachymova, K. Horky, L. Kazdova, E. St Lezin, and T. W. Kurtz. 2002. Genetic Analysis of metabolic defects in the spontaneously hypertensive rat. *Mammalian Genome* **13**:253-258.
- Rapp, J. P., and L. K. Dahl. 1972. Mendelian Inheritance of 18 - and 11 β - steroid hydroxylase Activities in the Adrenals of Rats Genetically Susceptible or Resistant to Hypertension. *Endocrinology* **90**:1435-1446.
- Rapp, J. P., and H. Dene. 1985. Development and Characteristics of Inbred Strains of Dahl Salt-Sensitive and Salt-Resistant Rats. *Hypertension* **7**:340-349.
- Rapp, J. P., S.-M. Wang, and H. Dene. 1989. A genetic Polymorphism in the Renin Gene of Dahl Rats Cosegregates with Blood Pressure. *Science* **243**:542-544.
- Rapp, J. P., S.-M. Wang, and H. Dene. 1990. Effect of Genetic Background on Cosegregation of Renin Alleles and Blood Pressure in Dahl Rats. *American Journal of Hypertension* **3**:391-396.
- Rapp, J. P., and A. Y. Deng. 1995. Detection and Positional Cloning of Blood Pressure Quantitative Trait Loci: Is It Possible? Identifying the Genes for Genetic Hypertension. *Hypertension* **25**:1121-1128.
- Rapp, J. P., M. R. Garrett, and A. Y. Deng. 1998. Construction of a double congenic strain to prove an epistatic interaction on blood pressure between rat chromosomes 2 and 10. *Journal of Clinical Investigation* **101**:1591-1595.
- Research Genetics. ResGen Products.
<http://www.resgen.com/products/HAVRYAC.php3> . 2002.
- Rozen, S., and H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Pages 365-386 *in* Krawetz S., and Misener S editors. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Schmieder, R. E., M. R. W. Langenfeld, A. Friedrich, H. P. Schobel, C. D. Gatzka, and H. Weihprecht. 1996. Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. *Circulation* **94**:1304-1309.
- Schork, N. J., S. P. Nath, K. Lindpaintner, and H. J. Jacob. 1996. Extensions to Quantitative Trait Locus Mapping in Experimental Organisms. *Hypertension* **28**:1104-1111.

- Shizuya, H., B. Birren, U.-J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:8794-8797.
- Sivo, Z., B. Malo, J. Dutil, and A. Y. Deng. 2002. Accelerated congenics for mapping two blood pressure quantitative trait loci on chromosome 10 of Dahl rats. *Journal of Hypertension* **20**:45-53.
- Smirk, F. H., and W. H. Hall. 1958. Inherited Hypertension in Rats. *Nature* **182**:727-728.
- Smoller, J. W., J. S. Jr. Acierno, J. F. Rosenbaum, J. Biederman, M. H. Pollack, S. Meminger, J. A. Pava, L. H. Chadwick, C. White, M. Bulzacchelli, and S. A. Slaugenhaupt. 2001. Targetted Genome Screen of Panic Disorder and Anxiety Disorder Proneness Using Homology to Murine QTL Regions. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* **105**:195-206.
- Snell, G. D. 1948. Methods for the Study of Histocompatibility Genes. *Journal of Genetics* **49**:87-108.
- Société québécoise d'hypertension artérielle. 2002. *Hypertension artérielle 2002: Guide thérapeutique.*, 2e édition edition.
- Stoll, M., A. W. Jr. Cowley, P. J. Tonellato, A. S. Greene, M. L. Kaldunski, R. J. Roman, P. Dumas, N. J. Schork, Z. Wang, and H. J. Jacob. 2001. A Genomic-Systems Biology Map for Cardiovascular Function. *Science* **294**:1723-1726.
- Stouff P. Une histoire de la génétique. <http://pst.chez.tiscali.fr/genetique.htm> . 2002.
- Tanase, H., Y. Yamori, C. T. Hansen, and W. Lovenberg. 1982. Heart size in inbred strains of rats. Part I: Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension* **4**:864-872.
- The Institute for Genomic Research. Rat BAC Ends. http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html. 2002.
- The University of Iowa Coordinated Library for Computational Genomics. University of Iowa Rat EST Project. <http://ratest.eng.uiowa.edu/cgi-bin/database/search>. 2002.
- TIGR institute for genomic research. Rat BAC Ends. http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html . 2002.
- Triggle, CR. 1985. Hypertensive mechanisms: the role of altered smooth muscle and membrane function in the etiology of hypertension. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **63**:353-354.

- Van Vliet, B. N., L. L. Chafe, V. Antic, S. Schnyder-Candrian, and J. P. Montani. 2000. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**:361-373.
- Venter, C. J., and and many others. 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**:1304-1351.
- Wallen, W. J., M. P. Bélanger, and C. Wittnich. 2002. Body Weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats. *Journal of Nutrition* **132**:2246-2250.
- Xiong, J.-W., A. Leahy, H.-H. Lee, and H. Stuhlmann. 1999. *Vezfl*: A Zn Finger Transcription Factor Restricted to Endothelial Cells and Their Precursors. *Developmental Biology* **206**:123-141.
- Yang, H., S. C. Francis, K. Sellers, M. DeBarros, C. Sun, C. Sumners, C. M. Ferrario, M. J. Katovich, A. F. Muro, and M. K. Raizada. 2002. Hypertension-linked decrease in the expression of brain gamma-adducin. *Circulation Research* **91**:633-639.
- Yokoi, N., K. Komeda, H.-Y. Wang, H. Yano, K. Kitada, Y. Saitoh, Y. Seino, K. Yasuda, T. Serikawa, and S. Seino. 2002. *Cblb* is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. *Nature Genetics* **31**:391-394.
- Zha, H., R. L. Wilder, E. A. Goldmantz, J. M. Cash, L. J. Crofford, P. Mathern, and E. F. Remmers. 1993. Linkage map of 10 polymorphic markers on rat chromosome 2. *Cytogenetics and Cell Genetics* **63**:117-122.
- Zhao, X., R. White, J. Van Huysse, and F. H. H. Leenen. 2000. Cardiac hypertrophy and cardiac renin-angiotensin system in Dahl rats on high salt intake. *Journal of Hypertension* **18**:1319-1326.