

Université de Montréal

**Déterminants génétiques du contrôle de la masse  
cardiaque et/ou de la taille des cardiomycocytes dans des  
croisements expérimentaux de rongeurs**

par

Bastien Llamas

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Biologie Moléculaire

Avril 2007

© Bastien Llamas, 2007



QH  
506  
U54  
2007  
V.018

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Déterminants génétiques du contrôle de la masse cardiaque et/ou de la taille des  
cardiomyocytes dans des croisements expérimentaux de rongeurs

présentée par :

Bastien Llamas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Timothy L Reudelhuber, président-rapporteur

Dr Christian F Deschepper, directeur de recherche

Dr Gregor Andelfinger, membre du jury

Dr Silvia Vidal, examinatrice externe

Dr Thérèse Cabana, représentante du doyen de la FES

## Résumé

L'hypertrophie du ventricule cardiaque gauche, un trouble fréquent dans la population générale, est un des principaux facteurs de risque de mortalité et de morbidité cardiovasculaires. La masse du ventricule gauche (MVG) est un caractère complexe, partiellement influencé par la pression artérielle, et sous le contrôle prépondérant de facteurs génétiques. Afin de détecter ces loci, plusieurs études ont été menées dans des croisements génétiques d'animaux. L'analyse d'un croisement F2 entre les rats consanguins normotendus WKY et WKHA (divergents pour la MVG) a mené à l'identification de 6 loci autosomaux liés à la MVG, chacun spécifique d'un sexe. Une deuxième étude dans une population mâle issue d'un croisement F2 entre les rats consanguins WKY et BN (différents pour la pression artérielle bien que normotendus) a permis d'identifier, entre autres, le locus *Pp2* lié à la pression pulsatile indépendamment de la pression artérielle. La pression pulsatile étant altérée par la rigidité artérielle, *Pp2* pourrait contribuer de façon indépendante au contrôle de la MVG. Finalement, comme les souris consanguines normotendues C57BL/6J et A/J contrastent à la fois pour la MVG et pour la taille des cardiomyocytes isolés, 24 lignées recombinantes consanguines AXB/BXA dérivées de ces deux souches ont été analysées. Deux loci autosomaux, communs aux deux sexes, ont été liés à la MVG, et 7 loci autosomaux, dont 6 spécifiques des mâles ou des femelles, ont été liés aux dimensions des cardiomyocytes. Les déterminants génétiques de la MVG et de la taille des cellules étaient indépendants, suggérant que des modifications génétiques réalisées dans le fonds C57BL/6J pourraient ne pas mener nécessairement à des variations conjointes de la MVG et de la taille des cardiomyocytes. D'autre part, le chr Y a été lié aux dimensions des cardiomyocytes. C'est la première fois que ce chromosome est considéré dans une cartographie génétique. Des expériences complémentaires avec des souris consomiques ont montré que le chr Y contrôle la réponse hypertrophique des cardiomyocytes aux androgènes. En conclusion, ces études ont révélé une complexité insoupçonnée du déterminisme génétique de la MVG et de la taille des cardiomyocytes en fonction du sexe, indépendamment de la tension artérielle.

**Mots-clés :** génétique, QTL, rat, souris, maladie complexe, hypertrophie cardiaque, ventricule cardiaque gauche, cardiomyocyte, pression artérielle, pression diastolique, pression systolique, pression pulsatile, sexe, chromosome Y, testostérone, androgènes, hormones sexuelles.

## Abstract

Cardiac left ventricular hypertrophy, a condition found frequently in the general population, is one of the most important independent risk factors for cardiovascular morbidity and mortality. Left ventricular mass (LVM) is a trait influenced for a minor part by arterial blood pressure and for a greater part by genetic factors. To detect such loci, we conducted several studies in animal genetic crosses. The analysis of the progeny of a F2 intercross between the normotensive inbred WKY and WKHA rats (which differ for LVM) allowed the detection of 6 autosomal loci, each linked to LVM in a sex-dependent fashion. A second study in males from an F2 intercross between WKY and BN inbred rats, which contrast for blood pressure despite being both normotensive, led to the detection (among other findings) of the locus *Pp2*, linked to pulse pressure independently from blood pressure. Pulse pressure is altered by arterial stiffness, so *Pp2* might contribute to MVG in a blood-pressure independent manner. Finally, since the inbred normotensive C57BL/6J and A/J mice exhibit differences in both LVM and the size of isolated cardiomyocytes, 24 AXB/BXA recombinant inbred lines derived from the two strains were analyzed. Two autosomal loci, linked to LVM in both sexes, were detected, as well as 7 autosomal loci linked to the dimensions of isolated cardiomyocytes, 6 of them being male- or female-specific. Genetic determinants of LVM and cardiomyocyte size were independent, suggesting that targeted genetic modifications performed into the C57BL/6J background may not necessarily lead to joint changes in LVM and cardiomyocyte size. Finally, Y chromosome was linked to cardiomyocyte dimensions. This chromosome was included in a whole genome scan for the first time. Additional experiments with consomic mice revealed that the Y chromosome influences the hypertrophic response of cardiomyocytes to androgens. Altogether, results unveiled an unsuspected sex-dependent complexity in the genetic control of LVM and cardiomyocyte size, independently of blood pressure.

**Keywords:** genetics, QTL, rat, mouse, complex trait, cardiac hypertrophy, cardiac left ventricle, cardiomyocyte, blood pressure, diastolic blood pressure, systolic blood pressure, pulse pressure, sex, Y chromosome, testosterone, androgens, sex steroids.

## Table des matières

L'hypertrophie cardiaque.....	27
Définition(s) de l'hypertrophie cardiaque.....	28
Relations entre la structure et la fonction cardiaques .....	28
Relations entre la morphologie des cardiomyocytes et la géométrie cardiaque .....	30
Épidémiologie de l'hypertrophie cardiaque.....	31
L'hypertrophie cardiaque dans la population générale.....	31
Relations avec les maladies cardiovasculaires.....	32
Variations en fonction de l'origine ethnique .....	34
Caractéristiques épidémiologiques de l'hypertrophie cardiaque .....	35
Étiologie de l'hypertrophie cardiaque.....	35
Les facteurs environnementaux .....	35
Âge.....	35
Poids et obésité .....	36
Autres maladies.....	37
Le sexe : un facteur environnemental à part.....	37
Différences de remodelage en fonction du sexe .....	37
Rôle des hormones sexuelles .....	38
Les chromosomes sexuels.....	41
Génétique de l'hypertrophie cardiaque.....	42
La génétique mendélienne de l'hypertrophie cardiaque .....	42
La cardiomyopathie hypertrophique familiale.....	42
La cardiomyopathie dilatée familiale .....	44
Mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie cardiaque .....	45
Réponses moléculaires caractéristiques.....	45
Les récepteurs couplés aux protéines G.....	46
Les intégrines .....	47
La signalisation des MAP kinases .....	47
Le système calcineurine-NFAT .....	48

La voie PI3K-AKT .....	48
La masse cardiaque est un caractère complexe .....	49
Des modèles animaux pour isoler les facteurs génétiques de l'hypertrophie cardiaque ..	51
Induction expérimentale de l'hypertrophie cardiaque .....	54
Modèles génétiques de l'hypertrophie cardiaque .....	55
Modèles issus de l'ingénierie génétique .....	56
Modèles dérivés par sélection.....	56
Identification de loci génomiques impliqués dans l'hypertrophie cardiaque .....	58
Bases théoriques de la génétique des caractères complexes.....	59
Les croisements expérimentaux de rongeurs .....	60
Les souches parentales .....	60
L'hérédité des caractères : étude de la génération F1 .....	60
Exploiter la recombinaison génétique : les croisements expérimentaux .....	61
Cartographie génétique de QTL .....	66
Méthode de régression par marqueur.....	66
Méthode de cartographie par intervalle .....	67
Significativité de la liaison et intervalle de confiance .....	69
Cartographie sommaire.....	71
Confirmation de la liaison.....	73
Cartographie fine .....	74
Validation de gènes candidats.....	75
Hypothèses et projet de doctorat.....	80
Chapitre 2 : Cartographie génétique de QTL liés à la masse cardiaque dans un croisement expérimental de rats consanguins normotendus .....	83
Contribution des auteurs à la préparation de l'article 1 .....	84
Article 1 : Distinct QTLs are linked to cardiac left ventricular mass in a sex-specific manner in a normotensive inbred rat intercross .....	85
Abstract .....	86
Introduction.....	87

Material and methods.....	90
Results.....	95
Discussion.....	99
Acknowledgements.....	103
References.....	104
Tables.....	111
Figures .....	115
Chapitre 3 : Cartographie génétique de QTLs liés à la pression sanguine dans un croisement expérimental de rats consanguins normotendus. ....	120
Contribution des auteurs à la préparation de l'article 2 .....	121
Article 2 : Genetic determinants of systolic and pulse pressure in an intercross between normotensive inbred rats.....	122
Abstract.....	123
Introduction.....	124
Material and methods.....	125
Results.....	129
Discussion.....	131
Perspectives .....	133
Acknowledgements.....	133
References.....	134
Tables.....	138
Figures .....	140
Chapitre 4 : Cartographie génétique de QTLs liés à la masse cardiaque et à la morphologie des cardiomyocytes dans une population de souris recombinantes consanguines. ....	144
Contribution des auteurs à la préparation de l'article 3 .....	145
Article 3 : Cardiac mass and cardiomyocyte size are governed by different genetic loci on either autosomes or chromosome Y in recombinant inbred mice .....	146
Abstract.....	147
Introduction.....	148

Materials and methods .....	150
Results.....	154
Discussion.....	157
Acknowledgements.....	160
References.....	161
Tables.....	166
Figures .....	169
Supplemental data.....	174
Chapitre 5 : Le chromosome Y influence la réponse des cardiomyocytes aux androgènes chez la souris.....	178
Introduction.....	179
Matériel et méthodes.....	183
Résultats.....	191
Tableaux.....	195
Figures .....	200
Chapitre 6 : Discussion.....	208
Mieux comprendre les bases génétiques d'un caractère complexe .....	209
Cartographie de QTL liés à la masse cardiaque .....	212
Étude chez le rat.....	212
Étude chez la souris .....	217
De l'importance d'une mesure phénotypique fiable et robuste .....	220
Cartographie de QTL liés à la morphologie des cardiomyocytes.....	222
Cartographie de QTL liés à la pression artérielle .....	226
Étude chez le rat.....	226
Étude chez la souris .....	229
Du QTL au gène causal .....	230
Cumuler les évidences expérimentales pour prouver la causalité .....	230
Affiner et confirmer la localisation d'un QTL.....	233
Analyses bioinformatiques .....	233

Cartographie physique .....	235
Les différences génétiques entre les sexes.....	236
Des loci autosomaux différents entre les sexes .....	236
Différences dues aux chromosomes sexuels.....	239
Le chromosome Y et les androgènes .....	241
Conclusion .....	247
Annexe 1: Hypertensive cardiac remodeling in males and females: from the bench to the bedside .....	I-288
Annexe 2: Identification and validation of loci and candidate genes linked to cardiac hypertrophy .....	II-296
Annexe 3: Page de couverture du journal <i>Physiological Genomics</i> , d'après l'article 3III-314	
Annexe 4: Revue éditoriale de l'article 3 écrite par Gary Churchill .....	IV-316

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Dimorphismes sexuels pour l'HVG dans des modèles génétiques de souris ...	39
<b>Tableau 2 :</b> Gènes associés à la régulation de la MVG chez l'humain .....	52
<b>Tableau 3 :</b> Oligonucléotides pour les amplifications génomiques des gènes du chr Y ...	195
<b>Tableau 4 :</b> Oligonucléotides pour amplifier partiellement le gène <i>Ddx3y</i> à des fins de séquençage .....	196
<b>Tableau 5 :</b> Oligonucléotides pour amplifier partiellement le gène <i>Eif2s3y</i> à des fins de séquençage .....	197
<b>Tableau 6 :</b> Oligonucléotides pour amplifier les messagers des gènes du chr Y .....	198
<b>Tableau 7 :</b> Expression des gènes du chr Y dans les cœurs de souris C57BL/6J adultes .	199
<b>Tableau 8 :</b> Mise à jour du tableau 1, article 1, chapitre 2 .....	214

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Pourcentage de l'ensemble des décès attribuable aux maladies cardiovasculaires, par groupe d'âge et par sexe, Canada, 1999 .....	26
<b>Figure 2 :</b> Morphologie du ventricule cardiaque gauche; différences entre les cœurs normal et hypertrophiques.....	29
<b>Figure 3 :</b> Survie cumulée en présence d'une MVG basse, appropriée ou élevée.....	33
<b>Figure 4 :</b> Survie cumulée par quintile de MVG .....	33
<b>Figure 5 :</b> Voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie des cardiomyocytes .....	49
<b>Figure 6 :</b> Schéma représentatif de la génération de populations recombinantes.....	64
<b>Figure 7 :</b> Courbe de LOD, seuils statistiques et intervalles de confiance .....	72
<b>Figure 8 :</b> Intégration des données provenant du rat et de la souris pour étudier les maladies humaines .....	78
<b>Figure 9 :</b> Expression ubiquiste des gènes du chr Y exprimés dans le VG .....	200
<b>Figure 10 :</b> Quantification de l'expression des gènes du chr Y dans le VG .....	201
<b>Figure 11 :</b> Effets d'une castration sur la taille des cardiomyocytes isolés .....	202
<b>Figure 12 :</b> Effets de la testostérone sur la taille des cardiomyocytes isolés .....	203
<b>Figure 13 :</b> Effets de la testostérone sur la taille des vésicules séminales .....	204
<b>Figure 14 :</b> Niveaux de testostérone plasmatique chez des mâles adultes.....	205
<b>Figure 15 :</b> Distances ano-génitales mesurées chez des sourceaux âgés de 4 jours .....	206
<b>Figure 16 :</b> Expression des récepteurs aux androgènes dans le VG .....	207
<b>Figure 17 :</b> Comparaison des mesures de la MVG par pesée directe ou par échocardiographie dans l'ensemble de lignées recombinantes AXB/BXA.....	221
<b>Figure 18 :</b> Schéma récapitulatif des QTL cartographiés lors de l'analyse des lignées recombinantes consanguines de souris .....	225

## Liste des sigles et abréviations

3'UTR	Région 3' transcrive non traduite
ACE	<i>Ang II converting enzyme</i>
ACE2	<i>Ang I converting enzyme</i>
ADD1	Adducine $\alpha$
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN copie
AMP	Adénosine mono-phosphate
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANF	<i>Atrial natriuretic factor (= ANP)</i>
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
ApoA1	Apolipoprotéine A1
ApoB	Apolipoprotéine B
AR	<i>Androgen receptor</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
AS	<i>Aldosterone synthase</i>
AT2	Récepteur à l'Ang II de type 2
$\beta$ 2BKR	Récepteur $\beta$ 2 à la bradykinine
BN	<i>Brown-Norway</i>
BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i>
$\text{Ca}^{2+}$	Ion Calcium
CaMK	<i>Calmodulin-dependent kinase</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
Chr	Chromosome

cM	centimorgan
CMD	Cardiomyopathie dilatée familiale
CMH	Cardiomyopathie hypertrophique familiale
CWS	<i>Circumferential wall stress</i>
DAG	Diacylglycérol
dATP	Désoxyadénosine-5'-triphosphate
Dahl-S	<i>Dahl salt-sensitive</i>
dCTP	Désoxycytidine-5'-triphosphate
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
dGTP	Désoxyguanosine-5'-triphosphate
dNTP	Désoxynucléoside-5'-triphosphate
dTTP	Désoxythymidine-5'-triphosphate
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
ET-1	Endothéline-1
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
F344	<i>Fisher 344</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>FGF receptor</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
GC-A	<i>Guanylate cyclase-A</i>
GHSR	Récepteur à la ghréline
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase-3<math>\beta</math></i>
HDAC	<i>Histone deacetylases</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>

HHR	<i>Hypertrophic heart rat</i>
HVG	Hypertrophie du ventricule cardiaque gauche
IκB	Inhibiteur de NF-κB
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i>
IKK	<i>Inhibitor of NF-κB kinase</i>
Indel	Polymorphisme d'insertion / délétion
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphate
IRCM	Institut de Recherches Cliniques de Montréal
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	kilo paires de bases
LAMP2	<i>X-linked lysosome-associated membrane protein</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LH	<i>Lyon hypertensive</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>MAP kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPKK kinase</i>
MAPKKKK	<i>MAPKKK kinase</i>
Mb	Méga paires de bases
MEF	<i>Myocyte enhancer factor</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MVG	Masse du ventricule cardiaque gauche
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NPPA	<i>Natriuretic peptide precursor type A</i>

NPR1	<i>Natriuretic peptide receptor I</i>
PA	Pression artérielle
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD	Pression diastolique
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PKD	Protéine kinase D
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
Pol II	ARN polymerase II
PP	Pression pulsatile
PS	Pression systolique
QTL	<i>Quantitative trait locus</i>
QTN	<i>Quantitative trait nucleotide</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
RT-PCR	<i>Reverse transcription followed by PCR</i>
SHHF	<i>Spontaneously hypertensive heart failure</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SHR-SP	<i>Spontaneously hypertensive rat-stroke prone</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPF	<i>Specific Pathogen-Free</i>
SSLP	<i>Simple sequence length polymorphism</i>
Sts	<i>Steroid sulfatase</i>
TAK	<i>TGF<math>\beta</math>-activated kinase</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>

TGFR	<i>TGFβ receptor</i>
TH	<i>Tyrosine hydroxylase</i>
TNFα	<i>Tumour necrosis factor-α</i>
TNFR	<i>TNFα receptor</i>
UCSC	Université de Californie à San Diego
UV	Ultra-violet
VG	Ventricule cardiaque gauche
VD	Ventricule cardiaque droit
WKHA	<i>Wistar Kyoto hyperactive</i>
WKY	Wistar Kyoto
Yp	Bras court du chr Y
Yq	Bras long du chr Y

*The same thing that makes you live  
Can kill you in the end*

Neil Young (From Hank to Hendrix)

## Remerciements

Cinq ans c'est long. Cinq ans c'est court. Toutes les aventures qui marquent une vie sont probablement sujettes à cet affranchissement temporel, parce qu'elles procurent le mélange d'excitation et d'incertitude qui donne la force d'avancer. Et puis un étudiant, il faut que ça grandisse, que ça gagne en maturité, doucement, tout doucement... Que de temps passé en questionnements, tâtonnements, incertitudes, tergiversations, essais... et erreurs! Mais voilà, ce temps qu'on croit perdu se regagne au centuple quand, enfin, le point final vient conclure la thèse, comme ça, en passant, presqu'en s'excusant... Il y aura d'autres projets? Plus longs? Plus ardu? Plus grandioses? Qu'à cela ne tienne, laissez-moi au moins apprécier ce que je viens d'achever, la plus longue entreprise de ma courte vie...

Ils sont nombreux ceux qui m'ont accompagné sur le chemin cahoteux de mon doctorat, qui ont partagé mes doutes ou mon émerveillement au gré de mes humeurs.

C'est incroyable comme les mots peuvent manquer quand il s'agit d'exprimer de la gratitude à quelqu'un qu'on respecte... Et pourtant... Je ne remercierai jamais assez mon directeur de recherche, le Dr Christian F. Deschepper, pour sa supervision sans relâche, jour après jour, tout en me laissant évoluer à mon rythme dans mes expériences, au travail et dans la vie. Si son enthousiasme devant un résultat positif m'a souvent laissé perplexe au début de mon doctorat, je dois bien admettre que sa faculté à s'adapter aux résultats inattendus m'a encore plus désarçonné. Grâce à lui, j'ai appris que la force d'un chercheur réside dans sa faculté à admettre la faillibilité de son raisonnement et à rejeter les certitudes. Je tiens à souligner qu'il m'a toujours autorisé, voire encouragé, à me livrer à une variété d'activités associatives, sociales ou de communication, sans jamais m'adresser ne serait-ce qu'un semblant de reproche. Pour cette patience, ce dévouement, cette passion, merci infiniment. Ce que je retiendrai de toi, Christian, c'est que tous les résultats sont bons. Seules les hypothèses sont parfois mauvaises.

Une autre personne mérite au moins autant de reconnaissance. Sylvie Picard, c'est la dixième muse, celle des sciences expérimentales, car c'est bien au rang d'art qu'elle a

élevé son savoir-faire. Sans elle, mon associée de recherche préférée qui sait tout sur tout, je ne peux même pas imaginer à quoi ressemblerait la présente thèse. Son scepticisme, sa compétence et son intuition m'ont toujours impressionné, et je ne compte pas les fois où elle m'a donné un coup de main salvateur ou un conseil éclairé. Il y a aussi ses histoires et anecdotes en quantité infinie, qui font que les journées sont moins longues. Pour cette efficacité, cette bonne humeur, cette empathie, merci. Ce que je retiendrai de toi, Sylvie, c'est que tous les résultats sont bons. Seuls les protocoles sont parfois mauvais.

J'ai marché dans les pas de ceux qui m'ont accueilli au laboratoire, avant de souhaiter la bienvenue moi-même aux petits nouveaux. Je remercie donc ceux qui m'ont supporté au quotidien au cours de ce doctorat, et qui souvent m'ont accompagné dans mes virées à la sortie du travail. Je pense aux techniciennes qui m'ont tellement aidé et appris : Nadia, Sonia et Marie-Line. Et tous ces étudiants qui vont, qui viennent, qui restent : Isabelle, Ahmad, Zhibin, Jennifer, Véronique, Guillaume, Raphaël, Baoying, Catherine, Fatima, Marie-Thérèse, Danielle, Ying... Combien de fous rires et de frustrations partagés...

Entre le laboratoire et la rue, il y a l'IRCM. Et que de gens à remercier... Pour ne pas oublier quelqu'un, je préfère ne citer personne, car cinq années à parcourir les étages de l'institut m'ont permis de tisser des liens, professionnels ou amicaux, avec beaucoup de monde. Je tiens à rendre hommage à tous les employés, chercheurs et étudiants qui par leur travail, par leurs discussions, par leur présence, m'ont permis d'œuvrer dans les meilleures conditions possibles. Il y en a beaucoup avec qui j'ai partagé des moments mémorables en-dehors du travail. À ceux-là, qui se reconnaîtront, je souhaite simplement vous recroiser un jour, ici ou ailleurs.

Il y a une personne qui ne doit pas recevoir souvent de remerciements, et qui pourtant en mérite plus d'un. Merci Vivianne Jodoin, la bonne fée du programme de Biologie Moléculaire, toujours prête à distribuer conseils, informations et sourires sans compter.

Ma vie ne s'est pas limitée au laboratoire pendant cinq ans. L'expatriation était un défi personnel, que j'ai savouré chaque jour un peu plus. Sans cette grande famille d'accueil que j'ai choisie et qui m'a choisi, je n'aurais eu ni l'envie, ni la force de poursuivre mon doctorat. Cet équilibre entre mes études et ma vie sociale n'a pas de prix. Christelle, ma Cricri, mon amie, ma sœur d'armes qui vit tout ce que je vis depuis le début de cette aventure, merci d'être présente, toujours et encore. Jo, Geneviève, Sylvain, Marie-Elaine, la famille Souzeau, grâce à vous je ne regrette pas d'avoir fait le saut transatlantique. Les 3M, je ne vous vois jamais assez mais je me sens bien de vous savoir là, la porte et les bras toujours grands ouverts, le rhum et la bonne bouffe toujours disponibles, et mon petit Jonah qui grandit trop vite. Pour finir, il y a le sport pour relâcher la pression, en particulier le soccer avec MU, mes boys, mon exutoire, mon remède contre l'angoisse du doctorat. Martin, compagnon de galère dans les études et coéquipier dans le sport, je te dois ma santé mentale.

J'ai trouvé des amis ici, qui ont succédé à ceux que j'ai laissés là-bas. Pourtant il y en a une poignée qui a joué un rôle significatif dans le commencement, le déroulement ou l'achèvement de ce doctorat. Marie-Pierre, merci de m'avoir encouragé même quand plus personne n'y croyait, moi le premier. Thomas, mon frère, je suis tellement heureux que tu m'aises suivi et que tu sois près de moi pour la conclusion de cette aventure. Papa, Maman, ça y est, je mets un point final à mes études. Vous ai-je jamais remerciés? C'est pourtant grâce à vous que j'y suis arrivé, alors merci...

Manue... ma plus belle expérience... merci d'être là depuis le début, merci d'être encore là... après!

## Chapitre 1 : Introduction

*All scientific work is incomplete – whether it be observational or experimental. All scientific work is liable to be upset or modified by advancing knowledge.*

Hill AB (1965) The environment and disease: association or causation? *Proc R Soc Med.* **58**:295-300

Selon la fondation des maladies du cœur du Canada (Heart and Stroke Foundation of Canada, 2003), les maladies cardiovasculaires représentent un important fardeau qui pèse à la fois sur la qualité de vie des citoyens et sur l'économie du pays. Prises dans leur ensemble, les maladies cardiovasculaires représentaient en 1999 la première cause de décès au Canada (36%). On retrouve la même tendance aux États-Unis où 39% des décès en 2000 étaient dus aux maladies cardiovasculaires (Nabel, 2003).

La vaste étude mondiale *Interheart*, effectuée sur 30 000 cas-témoins dans 52 pays disséminés sur tous les continents habités, a visé à déterminer l'importance des facteurs de risque de maladie coronarienne à l'échelle mondiale (Yusuf et al, 2004; Rosengren et al, 2004; Yusuf et al, 2005; Steyn et al, 2005; Teo et al, 2006; Lanas et al, 2007). Les résultats montrent que le risque de développer un infarctus aigu du myocarde est corrélé positivement avec 6 facteurs de risque (dyslipidémie, tabagisme élevé, hypertension artérielle, un diabète de type 2, obésité abdominale et stress chronique) et corrélé négativement avec 3 facteurs protecteurs (alimentation riche en fruits et légumes, consommation régulière et modérée d'alcool et pratique régulière d'exercice physique). De façon intéressante, le stress psychosocial (stress professionnel, domestique et financier, événements pénibles récents) joue un rôle plus important qu'escompté dans la survenue d'un infarctus aigu du myocarde quelque soit la région, le groupe ethnique ou le sexe (Rosengren et al, 2004). Globalement, ces 9 facteurs traditionnels, considérés par l'Organisation Mondiale comme modifiables (Heart and Stroke Foundation of Canada, 2003), permettent de prédire 90% des infarctus aigus du myocarde chez les hommes et 94% chez les femmes.

Bien que certains avancent que l'étude *Interheart*, par son universalité, pourrait contribuer à trouver un dénominateur commun pour le risque coronarien à travers le monde (Ezzati, 2004), on peut noter des limitations importantes (Yusuf et al, 2004). En effet, les investigateurs ont focalisé leur attention sur un nombre restreint de facteurs de risque. L'effet global des 9 facteurs est donc probablement surestimé, d'autant plus que peu d'individus cumulaient la totalité des facteurs de risque. D'autre part, les données sont

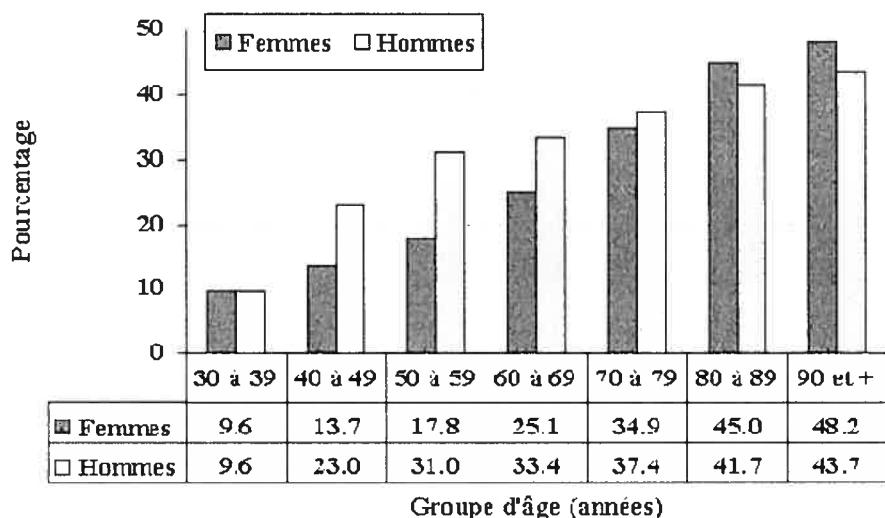
basées sur le recrutement de patients hospitalisés et d'individus contrôles dans des zones urbaines. Cette contrainte, inhérente à une étude cas-témoin dans laquelle on cherche à respecter une homogénéité des populations malades et contrôles, ne permet pas de refléter la prévalence des facteurs de risque dans la population générale. Enfin, même si l'étude *Interheart* apporte des renseignements précieux sur la morbidité et la mortalité liées à l'infarctus du myocarde, cette pathologie n'a été responsable que du quart des décès attribuables aux maladies cardiovasculaires au Canada en 1999 (Heart and Stroke Foundation of Canada, 2003).

Dans la grande majorité des cas, la prévention des maladies cardiovasculaires est théoriquement possible même si l'entreprise est complexe. On distingue trois niveaux de prévention : la prévention primaire cible le contrôle des facteurs de risque modifiables qui relèvent de l'environnement physique, social et économique dans lequel l'individu évolue; la prévention secondaire porte sur le diagnostic et les traitements précoce; enfin la prévention tertiaire vise la limitation de la progression ou des complications de la maladie. Ainsi la mortalité par cardiomyopathie ischémique n'a cessé de diminuer au Canada depuis la fin des années 70 grâce aux connaissances scientifiques mises à la disposition de la population (Heart and Stroke Foundation of Canada, 2003).

Il existe cependant des facteurs de risque non modifiables. Le vieillissement est le facteur dominant pour les maladies cardiovasculaires et on observe une progression du pourcentage de mortalité avec l'âge (Figure 1, page 26). Les projections démographiques montrent que la population vieillit et que les "baby-boomers" entrent dans les tranches d'âge à risque. On s'attend donc à une augmentation du nombre de personnes atteintes de maladies cardiovasculaires dans les années à venir, même si les prévisions demeurent incertaines (Redfield, 2002). D'autre part, le sexe est un facteur qui influence le risque cardiovasculaire conjointement avec l'âge. Ainsi les hommes jeunes ont un risque plus élevé que les femmes du même âge alors que la tendance s'inverse en vieillissant (Figure 1, page 26). Enfin, les facteurs génétiques jouent un rôle non négligeable dans l'apparition et l'évolution des maladies cardiovasculaires. En effet, les prédispositions héréditaires ou les

polymorphismes ethniques peuvent avoir un impact sur la physiologie cardiovasculaire (Nabel, 2003). En particulier, les études familiales dans la population générale (incluant *The Framingham Study*) ont montré que les antécédents familiaux jouent un rôle majeur dans l'incidence des maladies cardiovasculaires (Mansour-Chemaly et al, 2002).

**Figure 4-5 Pourcentage de l'ensemble des décès attribuable aux maladies cardiovasculaires, par groupe d'âge et par sexe, Canada, 1999**



Source : Santé Canada, à l'aide des données du Fichier sur la mortalité, Statistique Canada  
Le fardeau croissant des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada, 2003

**Figure 1** : Pourcentage de l'ensemble des décès attribuable aux maladies cardiovasculaires, par groupe d'âge et par sexe, Canada, 1999.

Toutefois, l'ensemble de ces facteurs de risque (modifiables et non modifiables) ne suffit pas à prédire entièrement la morbidité et la mortalité associées aux maladies cardiovasculaires. Dans ce contexte, l'hypertrophie du ventricule cardiaque gauche (HVG) émerge comme un facteur de risque important dans le pronostic des maladies cardiovasculaires.

## L'hypertrophie cardiaque

Le cœur se compose de quatre cavités, deux oreillettes (chambres supérieures) et deux ventricules (chambres inférieures). Les parties droite et gauche du cœur sont séparées par une paroi appelée septum. Le cœur est en fait une pompe composée de muscle (le myocarde) dont le rôle est de faire circuler le sang dans tout l'organisme via le système vasculaire (artères, veines et capillaires). Le sang ne peut circuler que dans un sens grâce à la présence de valves qui contrôlent la communication entre oreillettes et ventricules, ou entre ventricules et artères.

De façon schématique, l'oreillette droite reçoit le sang désoxygéné de la circulation périphérique via les veines caves inférieures et supérieures. L'ouverture de la valve tricuspidé permet de transférer le sang dans le ventricule droit, d'où il sera pompé aux poumons via l'artère pulmonaire après ouverture de la valve pulmonaire. Une fois oxygéné, le sang revient au cœur par la veine pulmonaire dans l'oreillette gauche. L'ouverture de la valve mitrale permet le transfert du sang dans le ventricule gauche (VG) qui éjecte le sang dans la circulation périphérique via l'aorte, après ouverture de la valve aortique.

Le système vasculaire systémique qui distribue le sang oxygéné aux différents organes du corps est plus long que le système pulmonaire chargé d'oxygener le sang. Le travail que doit fournir le VG est donc nécessairement plus important que pour le ventricule droit (VD). D'un point de vue anatomique, on peut en effet observer que le myocarde du VG est nettement plus épais que celui du VD. Ainsi les variations dans la masse du VG (MVG) déterminent principalement les variations dans la masse totale du cœur.

Une augmentation de la MVG peut s'observer chez les sportifs ou les animaux qui suivent un entraînement soutenu et chronique (Penpargkul & Scheuer, 1970; Morganroth et al, 1975; Scheuer & Tipton, 1977). Ce remodelage hypertrophique, souvent qualifié de physiologique, est réversible. C'est une adaptation du cœur à la surcharge hémodynamique

durant l'effort afin d'oxygener l'organisme de façon optimale. Cependant, une HVG semble être associée avec quasiment toutes les maladies cardiovasculaires (l'hypertension artérielle chronique, les dysfonctions valvulaires, l'athérosclérose, les arythmies) ou certaines maladies systémiques (insuffisance rénale, certains troubles neuro-humoraux). On parle dans ce cas d'HVG pathologique, car la nature chronique du remodelage hypertrophique mènera inéluctablement à une dilatation cardiomypathique, une défaillance cardiaque, un infarctus du myocarde ou une mort soudaine (Morisco et al, 2003).

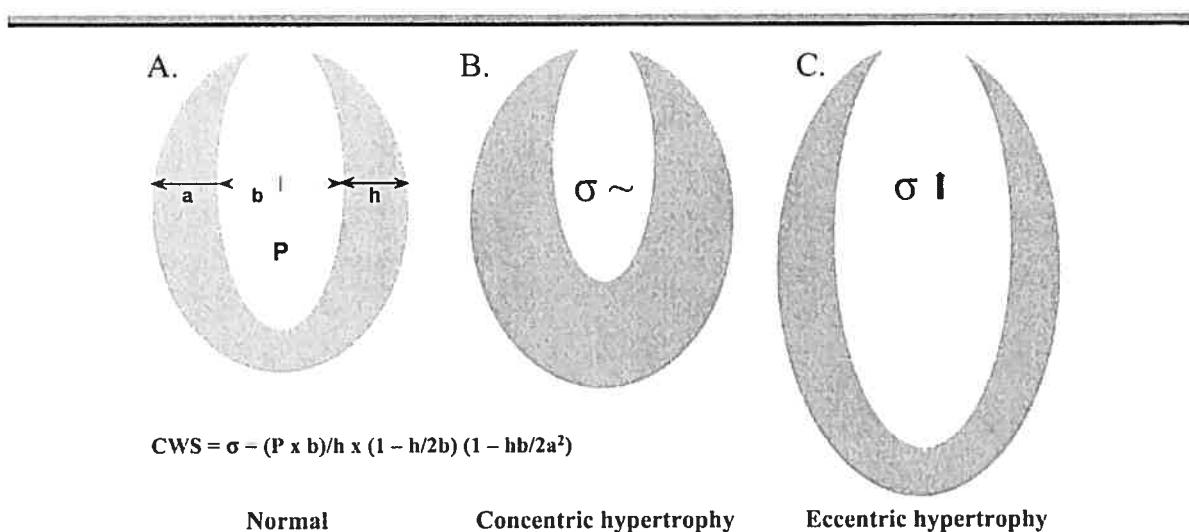
L'hypertrophie cardiaque, telle que considérée dans la présente thèse, réfère essentiellement à l'HVG dite pathologique.

## Définition(s) de l'hypertrophie cardiaque

### Relations entre la structure et la fonction cardiaques

Le cœur peut être l'objet de deux types de remodelage hypertrophique. Une surcharge de travail pendant la systole, telle qu'observée lors d'une augmentation de la pression systolique (surcharge de pression), sera balancée par un épaississement du myocarde afin de normaliser le stress sur la paroi selon la loi de Laplace (Figure 2A, page 29). La fonction cardiaque est ainsi préservée (Linzbach, 1960; Carabello, 2002). Ceci correspond à une hypertrophie concentrique, observée chez les individus ayant une sténose aortique ou souffrant d'hypertension (James et al, 2000) (Figure 2B, page 29). Une surcharge de travail pendant la diastole est caractérisée par une augmentation de la pression diastolique (surcharge de volume). Elle provoquera une dilatation de la chambre ventriculaire, éventuellement accompagnée d'un amincissement du myocarde. Selon la loi du cœur de Frank-Starling, cette dilatation permet d'augmenter la contraction (Ford, 1976) et s'observe chez les sujets avec une régurgitation valvulaire ou souffrant d'anémie (Katz, 2002). La dilatation aiguë induite par les facteurs hémodynamiques mérite d'être clairement

distinguée du remodelage architectural qui s'opère lorsque l'HVG concentrique devient chronique et progresse vers une dilatation. Cette HVG, qualifiée alors d'hypertrophie excentrique, augmente le stress sur la paroi, décroît la performance ventriculaire et établit un cercle vicieux qui aboutit à une défaillance cardiaque (Katz, 2002) (Figure 2C, ci-dessous).



**Figure 2 :** Morphologie du ventricule cardiaque gauche; différences entre les cœurs normal et hypertrophiques. La représentation schématique des hypertrophies concentrique et excentrique montre clairement les caractéristiques morphologiques. (A) Cœur normal dans lequel figurent les éléments qui déterminent le stress sur la circonférence de la paroi ventriculaire (CWS, *circumferential wall stress* =  $\sigma$ ), la force la plus puissante générée à l'intérieur du myocarde. P indique la pression intraventriculaire, a et b sont les demi-axes majeur et mineur et h est l'épaisseur de la paroi. La loi de Laplace ne s'applique que lorsque la fonction ventriculaire est relativement uniforme. (B) Le stress sur la paroi ( $\sigma$ ) augmente lorsque la pression post-charge s'élève, mais l'épaississement du myocarde compense le stress. (C) En cas de remodelage excentrique, l'élargissement du diamètre ventriculaire aboutit à une augmentation du stress sur la paroi. (Lips et al, 2003).

L'hypertrophie concentrique serait un mécanisme compensatoire primaire pour protéger le cœur contre une augmentation de la charge de travail, mais la transition entre les deux types concentrique et excentrique d'HVG n'est toujours pas clairement définie. En fait l'hypertrophie concentrique physiologique qui s'observe chez les nouveaux-nés, les femmes enceintes et les athlètes semble tout à fait bénéfique (Lips et al, 2003; Heineke & Molkentin, 2006). Aussi plusieurs considèrent maintenant que l'HVG peut être soit un mécanisme compensatoire bénéfique, soit une pathologie délétère inadaptée, les différences se situant au niveau des programmes moléculaires mis en jeu dans les cellules musculaires cardiaques (Katz, 2002; Morisco et al, 2003; Frey & Olson, 2003; Lips et al, 2003; Selvetella et al, 2004; Heineke & Molkentin, 2006).

### **Relations entre la morphologie des cardiomyocytes et la géométrie cardiaque**

Les cardiomyocytes sont les cellules musculaires cardiaques et se différencient de façon terminale peu de temps après la naissance. En conséquence, l'homéostasie cardiaque est très statique puisque le myocarde ne peut se régénérer par renouvellement de ses cellules. Certains travaux suggèrent l'existence de populations de cellules myocardiques qui ont des propriétés de cellules souches, d'où la possibilité controversée d'une hyperplasie cellulaire au cours de l'HVG (Katz, 2002; Nadal-Ginard et al, 2003). Cependant, le paradigme établi est que les caractéristiques-clés de l'hypertrophie cardiaque sont une augmentation de la taille des cellules, une augmentation de la synthèse protéique (Hannan et al, 2003) et un plus haut degré d'organisation du sarcomère.

Les cardiomyocytes sont des cellules avec une structure cylindrique à base elliptique caractéristique (Gerdes et al, 1994), assemblées en fibres dans le myocarde. L'arrangement spatial de ces cellules dans la paroi ventriculaire est tel que la longueur des cardiomyocytes contribue à la circonférence (ou au diamètre) du ventricule, alors que leur

diamètre participe à l'épaisseur de la paroi (Gerdes, 2002). En conséquence, les changements dans les dimensions des cardiomyocytes reproduisent en partie, au niveau cellulaire, les modifications de géométrie ventriculaire (Grossman et al, 1975; Carabello, 2002). Un remodelage concentrique (compensé) est caractérisé au niveau cellulaire par un élargissement des cardiomyocytes (Zierhut et al, 1991; Boutin-Ganache et al, 2002), résultat de l'ajout d'unités sarcomériques en parallèle (Grossman et al, 1975). Un remodelage excentrique (décompensé) est dû à un allongement des cardiomyocytes (Bai et al, 1990; Gerdes et al, 1992; Tamura et al, 1998; Souzeau et al, 2006) suite à une sarcomogénèse en série (Grossman et al, 1975). Le ratio de la longueur sur la largeur des cardiomyocytes semble très stable d'une espèce à l'autre (Gerdes & Capasso, 1995) ou en fonction de l'âge (Bai et al, 1990). Mais dans le cas d'une défaillance cardiaque, on peut observer un allongement disproportionné des cardiomyocytes qui suffit à lui seul à expliquer la dilatation inadaptée du ventricule (Gerdes et al, 1992; Tamura et al, 1998).

Les cardiomyocytes sont les principaux acteurs de la contraction ventriculaire et contribuent de façon majoritaire à la masse cardiaque. Ces cellules sont donc les cibles privilégiées des études sur le remodelage et la défaillance cardiaques. Pourtant le cœur est aussi constitué d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules du muscle lisse, les cellules endothéliales et les mastocytes. Toutes ces cellules pourraient répondre de façon coordonnée au remodelage, mais leurs modifications ont reçu moins d'attention que celles subies par les cardiomyocytes (Fedak et al, 2005).

## Épidémiologie de l'hypertrophie cardiaque

### L'hypertrophie cardiaque dans la population générale

Deux études ont posé les jalons de l'épidémiologie de l'HVG dans la population générale : la *Framingham Heart Study* débutée à la fin des années 40 (Dawber et al, 1951)

et la *Framingham Offspring Study* qui a enrôlé les enfants (et leurs conjoint(e)s) des sujets de la cohorte initiale (Levy et al, 1988).

Chez les sujets âgés de 40 ans et plus, 16% des hommes et 19% des femmes ont été diagnostiqués avec une HVG. L'HVG est donc un trouble fréquent dans la population générale. Dans les deux sexes, les résultats de l'étude montrent qu'une augmentation de la MVG est le seul facteur de risque (l'âge excepté) systématiquement associé avec l'incidence de maladies cardiovasculaires, la mortalité cardiovasculaire et la mortalité due à d'autres causes naturelles (Levy et al, 1990). Aucun des autres facteurs de risque classiques (sexe, taille, poids, pression artérielle (PA), traitements anti-hypertensifs, cholestérol total et HDL, diabète de type 2, tabagisme) n'a de valeur pronostique significative pour l'ensemble des trois conséquences cliniques. Une deuxième étude sur la même cohorte montre que l'HVG est associée à la mort soudaine indépendamment des autres facteurs de risque (Haider et al, 1998).

D'une façon similaire, l'HVG compromet la survie dans d'autres populations caucasiennes (Sandvik et al, 1993; Thrainsdottir et al, 2003) ou dans la population japonaise (Matsumori et al, 2002; Miura et al, 2002) indépendamment des facteurs de risque classiques.

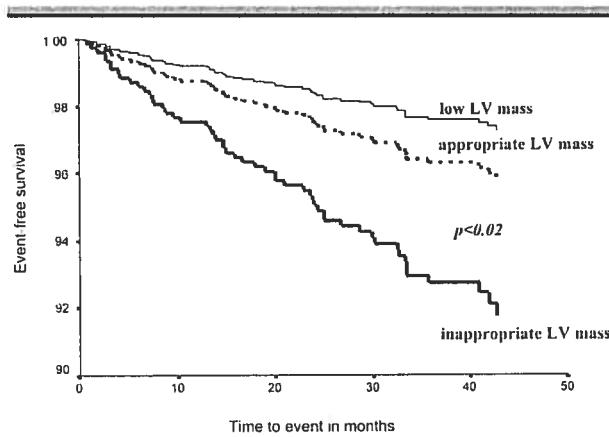
Ainsi l'HVG est un trouble fréquent dans la population générale et c'est un facteur de risque important dans l'incidence des maladies cardiovasculaires. De plus, la valeur prédictive de l'HVG est indépendante d'autres facteurs de risque traditionnels dont la PA, le taux de cholestérol sanguin ou le diabète mellitus.

### **Relations avec les maladies cardiovasculaires**

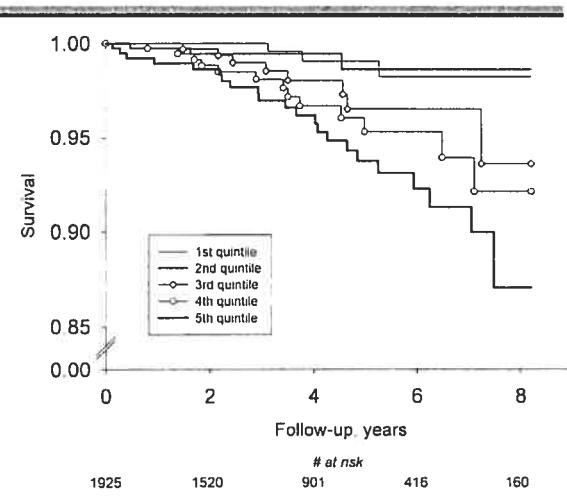
L'étude épidémiologique prospective MAVI (Verdecchia et al, 2001; De Simone et al, 2002) est basée sur le recrutement de sujets hypertendus sans complications. Dans leur premier rapport, les investigateurs montrent que 47% des sujets ont une HVG. D'autre part

l'augmentation de la MVG et la morbidité cardiovasculaire sont reliées de façon robuste et continue (Verdecchia et al, 2001). Dans une autre étude, les mêmes investigateurs ont prédit les valeurs de MVG des sujets MAVI à partir des valeurs de MVG d'un groupe de référence (323 sujets de poids normal, normotendus et âgés de 18 à 85 ans). En comparant les valeurs observées et prédites, ils peuvent ainsi définir trois groupes de sujets qui présentent une MVG appropriée, basse ou élevée. Ils observent que le risque cardiovasculaire augmente de façon linéaire même lorsque la MVG est dans une fenêtre de valeurs traditionnelles (Figure 3, ci-dessous) (De Simone et al, 2002).

Une étude épidémiologique prospective similaire (PIUMA) a permis de confirmer la forte prévalence de l'HVG chez les sujets hypertendus (40%) (Schillaci et al, 2000). De plus, les résultats montrent de nouveau une forte relation linéaire entre la MVG et la morbidité cardiovasculaire, de même qu'entre l'HVG et la mortalité (cardiovasculaire ou non) chez des sujets hypertendus non traités (Figure 4, ci-dessous). Cette relation est indépendante des autres facteurs de risque.



**Figure 3 :** Survie cumulée en présence d'une MVG basse, appropriée ou élevée (De Simone et al, 2002).



**Figure 4 :** Survie cumulée par quintile de MVG (Schillaci et al, 2000).

En ce qui concerne les autres maladies cardiovasculaires, plusieurs études montrent que la MVG prédit la morbidité et la mortalité indépendamment d'autres facteurs de risque chez des sujets atteints d'insuffisance rénale (Silberberg et al, 1989), d'insuffisance cardiaque congestive (Cooper et al, 1990; Vasan et al, 1997; Quinones et al, 2000) ou de problèmes coronaires (Cooper et al, 1990; Ghali et al, 1992; Bolognese et al, 1994).

### Variations en fonction de l'origine ethnique

L'étude épidémiologique prospective CARDIA a permis l'étude comparative de sujets afro-américains et caucasiens aux États-Unis. Après ajustement pour différentes variables anthropométriques, la PA et d'autres covariants, les résultats de l'étude montrent que la MVG est plus élevée chez les hommes que chez les femmes, et elle est plus élevée chez les noirs que chez les blancs (Gardin et al, 1995b).

Une étude similaire en Grande-Bretagne montre les mêmes différences entre sujets caucasiens et afro-caraïbéens. La fréquence de sujets ayant une HVG est plus élevée chez les noirs (53% des hommes et 38% des femmes) que chez les blancs (32% des hommes et 14% des femmes). L'augmentation de la MVG chez les noirs est liée à un risque cardiovasculaire accru (Chaturvedi et al, 1994).

Une récente étude épidémiologique (NOMAS) s'est intéressée à la communauté hispanique de la ville de New-York aux États-Unis. La prévalence de l'HVG est de 36% chez les hispano-américains. De façon comparable aux études faites sur les afro-américains, les investigateurs rapportent que l'augmentation de la MVG chez les hispaniques est fortement liée à la morbidité et à la mortalité cardiovasculaires (Rodriguez et al, 2006).

## Caractéristiques épidémiologiques de l'hypertrophie cardiaque

Les différentes études épidémiologiques ont permis de démontrer la fréquence élevée de l'hypertrophie cardiaque dans la population générale, avec toutefois des variations en fonction de l'origine ethnique.

Plusieurs maladies cardiovasculaires sont associées à l'hypertrophie cardiaque. En particulier, les individus souffrant d'hypertension essentielle montrent une forte prévalence de l'HVG.

L'augmentation de la MVG s'accompagne d'un accroissement du risque cardiovasculaire. La MVG est donc un facteur de risque important de morbidité et de mortalité cardiovasculaires.

## Étiologie de l'hypertrophie cardiaque

### Les facteurs environnementaux

#### Âge

Le vieillissement est le facteur ayant le plus fort impact sur l'incidence de l'HVG dans les deux sexes. Ainsi une HVG a été diagnostiquée chez 6% des individus de la *Framingham Heart Study* en dessous de 30 ans et chez 43% des sujets âgés de plus de 70 ans (Levy et al, 1988).

De façon intéressante, les effets de l'âge, du poids ou du diabète sur la MVG sont atténués chez les individus âgés de plus de 65 ans. Par contre les maladies coronaires et l'hypertension restent des facteurs de risque importants pour développer une HVG dans ce groupe (Gardin et al, 1995a).

### Poids et obésité

L'étude Muscatine a montré que la MVG corrèle à plus de 80% avec la masse corporelle chez des enfants et adolescents âgés de 6 à 16 ans, sans différence entre les sexes (Malcolm et al, 1993). D'un autre côté, une étude familiale suggère un effet du sexe puisque la MVG et la masse corporelle sont corrélées à 70% chez les garçons et à 34% chez les filles, l'âge moyen étant de 15 ans. Le résultat de cette dernière étude doit cependant être modéré par le fait que les investigateurs ont défini les enfants dans les familles étudiées comme étant des descendants directs âgés de 8 à 30 ans, ces derniers étant largement pubères (Garner et al, 2000). Enfin une étude génétique sur des jumeaux âgés de 11 ans montre que 90% de la corrélation entre la MVG et le poids corporel est expliquée par les gènes (Verhaaren et al, 1991).

Chez les adultes, on retrouve une forte corrélation entre les deux variables. Les résultats de la *Framingham Heart Study* montrent que la masse corporelle prédit le risque de développer une HVG, avec une augmentation de 47% chez les hommes et 51% chez les femmes pour chaque  $2 \text{ kg/m}^2$  supplémentaire (Levy et al, 1988).

La tendance est accentuée chez les individus obèses. En particulier, une étude récente montre que 78% des sujets présentant une obésité sévère développent une hypertrophie cardiaque (Avelar et al, 2007). De façon similaire, l'analyse des données de la *Framingham Heart Study* montrent que la prévalence d'HVG est très élevée chez les individus dont l'indice de masse corporelle est supérieur à  $30 \text{ kg/m}^2$  (Lauer et al, 1991).

Il existe cependant des limitations dans l'estimation de la MVG chez les sujets obèses. Par exemple, il y a une tendance à sous-estimer la MVG chez des individus obèses diagnostiqués avec des troubles coronaires (Gardin et al, 1995a). D'autre part, la contribution relative de la masse sèche et de la masse grasse dans la détermination de la MVG n'est pas bien définie (Lauer et al, 1991). Ceci est particulièrement vrai chez les enfants et les adolescents, chez qui on constate que la masse sèche explique 75% de la

variance de la MVG, alors que la masse grasse explique seulement 1.5% de cette variance (Daniels et al, 1995).

### *Autres maladies*

Enfin, plusieurs facteurs de maladies, voire les maladies elles-mêmes, augmentent le risque de développer une HVG, soit indirectement en augmentant la PA, soit directement par des effets trophiques sur le myocarde : résistance à l'insuline, diabète, consommation de sel, troubles neuro-humoraux, maladies coronaires, infarctus du myocarde, troubles valvulaires, angine de poitrine (chez les hommes) et hypertension (Levy et al, 1988; Galderisi et al, 1991; Lind et al, 1995; Gardin et al, 1995a; Schroeder et al, 1996; Schmieder et al, 1996; Coca & De La Sierra, 1997).

### **Le sexe : un facteur environnemental à part**

Cette section est basée en partie sur la revue co-rédigée avec mon superviseur (Deschepper & Llamas, 2007) et présentée en annexe 1.

### *Differences de remodelage en fonction du sexe*

Le sexe est un facteur important qui mérite une attention particulière lorsqu'on aborde les maladies cardiovasculaires (Czubryt et al, 2006). Plusieurs évidences montrent que le remodelage du LV est différent entre les hommes et les femmes. Par exemple, les femmes avec une sténose aortique manifestent une HVG concentrique plus marquée, un meilleur maintien de la fonction systolique et moins de fibrose que les hommes (Aurigemma & Gaasch, 1995; Villari et al, 1995). D'autre part, l'hypertension induit un remodelage concentrique chez les femmes alors qu'on observe une HVG excentrique

dilatée chez les hommes (Krumholz et al, 1993). Il a aussi été montré que la MVG décroît avec l'âge chez les hommes mais pas chez les femmes (Hayward et al, 2001). L'effet de l'âge est aussi détectable au niveau cellulaire car le nombre de cardiomyocytes décroît en même temps que leur volume augmente chez les hommes uniquement (Olivetti et al, 1995). D'autres évidences chez les animaux de laboratoire sont décrites dans la revue en annexe 1 (Deschepper & Llamas, 2007). En particulier, l'inactivation ou la surexpression de certains gènes de structure ou de signalisation a permis de mettre en évidence un dimorphisme sexuel important chez la souris (Tableau 1, page 39). D'une manière générale, il semble que les mâles soient plus sensibles que les femelles aux modifications génétiques qui induisent une HVG (Leinwand, 2003; Du, 2004; Du et al, 2006).

### *Rôle des hormones sexuelles*

Avant la ménopause, les femmes semblent protégées contre les maladies cardiovasculaires. Pourtant, lorsque les complications cardiaques se développent, leurs conséquences sont plus délétères chez les femmes que chez les hommes (Regitz-Zagrosek, 2006). De plus, les femmes sont plus vulnérables que les hommes à certaines pathologies spécifiques telles que la cardiomyopathie dilatée idiopathique et les maladies cardiaques induites par l'alcool (Leinwand, 2003).

Plusieurs évidences suggèrent que l'environnement stéroïdien pourrait être responsable, au moins en partie, des différences entre les sexes. Notamment, la présence de récepteurs aux œstrogènes fonctionnels dans les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques (Grohe et al, 1997) ainsi que de récepteurs aux androgènes fonctionnels dans les cardiomyocytes de plusieurs espèces (Brandenburger et al, 2001) sont compatibles avec un effet direct des stéroïdes sexuels dans le cœur. Il n'existe aucune différence de MVG entre les garçons et les filles avant la puberté (Malcolm et al, 1993). D'autre part, un défaut ovarien de production d'œstrogènes chez les femmes jeunes augmente considérablement le risque cardiovasculaire (Punnonen et al, 1997).

**Tableau 1 :** Dimorphismes sexuels pour l'HVG dans des modèles génétiques de souris.

Modèle	HVG	Survie	Référence
<b><i>Inactivation génique</i></b>			
NPR-A	M > F	M < F	(Oliver et al, 1997; Li et al, 2004b)
FKBP12.6	M > F	n.d.	(Xin et al, 2002)
eNOS	M > F	M < F	(Li et al, 2004a)
CD38	M > F	n.d.	(Takahashi et al, 2003)
<b><i>Surexpression</i></b>			
$\beta$ -AR	M > F	M < F	(Gao et al, 2003)
TNF $\alpha$	M > F	M < F	(Kadokami et al, 2000; Funakoshi et al, 2002)
Mutant $\alpha$ MHC	M > F	M < F	(Geisterfer-Lowrance et al, 1996; Vikstrom et al, 1996; Olsson et al, 2001)
PDGF-C	M < F	M > F	(Ponten et al, 2003)
Phospholamban	M > F	M < F	(Dash et al, 2003)
Mutant phospholamban	M = F	M < F	(Haghghi et al, 2001)

n.d. : non déterminé.

Malgré le risque cardiovasculaire réduit chez les femmes pré-ménopausées, il n'est pas certain que les estrogènes soient seuls responsables de cet état protecteur. En effet, il n'existe pas de moment clairement défini où le risque augmente chez les femmes après la ménopause, et il semblerait que l'âge seul ait un effet indépendamment des changements hormonaux (Rossouw, 2002; Liu et al, 2003). Certaines études montrent que les thérapies de remplacement d'hormones peuvent diminuer la MVG (Lim et al, 1999) et réduire le risque cardiovasculaire (Stampfer et al, 1991). Toutefois, le récent essai clinique prospectif HERS a montré que ces mêmes thérapies de remplacement d'hormones augmentent le risque chez les femmes ménopausées en santé (Rossouw et al, 2002). En fait, les androgènes pourraient être, au moins en partie, responsables de certaines différences du système cardiovasculaire entre les hommes et les femmes. Par exemple, la plus grande concentration de HDL cardioprotectrice chez les femmes est due au fait que les androgènes réduisent le cholestérol HDL chez les hommes après la puberté, et pas au fait que les œstrogènes l'augmentent (Rossouw, 2002). *In vitro*, les androgènes induisent une hypertrophie et une apoptose des cardiomyocytes (Marsh et al, 1998; Zaugg et al, 2001). Les effets possibles des androgènes sur le remodelage cardiaque sont compatibles avec le fait que les cardiomyocytes contiennent des récepteurs aux androgènes fonctionnels (Marsh et al, 1998) et que l'expression de ces derniers augmente dans le cœur humain en cas d'HVG (Thum & Borlak, 2002).

Malgré tout, il n'y a pas d'évidence tranchée pour dire que les androgènes sont délétères d'un point de vue cardiovasculaire. Par exemple, les niveaux physiologiques de testostérone participent, grâce à la conversion en estrogène par l'aromatase dans des tissus cibles, au maintien d'une tonicité vasculaire normale chez les mâles (Mendelsohn & Rosano, 2003). D'autre part, les niveaux de testostérone sont corrélés négativement avec l'incidence de maladies coronaires (Mendelsohn & Rosano, 2003). Enfin, l'administration de testostérone à des niveaux physiologiques ne semble pas affecter le risque cardiovasculaire (Rhoden & Morgentaler, 2004). Toutefois, les androgènes peuvent avoir des effets indésirables dans certaines conditions. Une récente étude montre que des femmes

ménopausées avec un diabète de type 2 ont un excès d'androgènes, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation du risque cardiovasculaire (Korytkowski et al, 2005).

### *Les chromosomes sexuels*

Les mécanismes moléculaires responsables des différences de remodelage ventriculaire entre les sexes ne sont pas encore clairement identifiés. Cependant, les chromosomes sexuels constituent une différence indiscutable entre mâles et femelles.

Le chr Y est caractéristique des mâles, tant chez les humains que chez les rongeurs de laboratoire. Cependant, seules 4 études chez l'humain ont montré que des polymorphismes du chr Y pouvaient être liés à la PA dans des populations australienne, écossaise et polonaise (Ellis et al, 2000; Charchar et al, 2002), aux niveaux de cholestérol HDL dans une population japonaise (Shoji et al, 2002) et aux niveaux de cholestérol LDL dans une population polonaise (Charchar et al, 2004). Une récente étude montre aussi que des polymorphismes du chr Y semblent affecter la PA chez les jeunes garçons, même avant la puberté (Shankar et al, 2007). Les rongeurs de laboratoire offrent la possibilité de substituer le chr Y d'une lignée donneuse à celui d'une lignée receveuse. Chez le rat par exemple, des expériences de substitution du chr Y entre des souches hypertendues (SHR, SHRSP) et normotendues (WKY, BN) ont permis de montrer que le chr Y était clairement lié à la PA (Ely et al, 1997; Negrin et al, 2001; Kren et al, 2001). Toutefois, ce résultat ne peut être généralisé car certaines lignées hypertendues ne montrent pas d'association entre le chr Y et la PA (Charchar et al, 2003; Yagil et al, 2003). L'effet du chr Y sur la masse cardiaque n'a pas été testé directement, mais des variants alléliques de ce chromosome ont été associés avec l'activité du système nerveux sympathique, la sensibilité au sel et des phénotypes lipidiques (Ely et al, 2000; Charchar et al, 2003). Toutes ces variables peuvent, en plus de la PA, avoir un impact sur le remodelage ventriculaire.

Le chr X est présent en deux copies chez les femelles et en une seule copie chez les mâles. Même si un des deux chr X est inactivé dans les cellules somatiques femelles, environ 15% des gènes échappent à cette inactivation et un autre 10% est seulement partiellement inactivé (Federman, 2006). Il est donc possible que le dosage de certains gènes du chr X diffère entre les sexes et soit responsable des dissemblances cardiovasculaires entre mâles et femelles. À ce jour, seules deux études chez l'humain ont montré une association du chr X avec la PA dans des populations finlandaise et australienne (Perola et al, 2000; Harrap et al, 2002b). Chez le rat aussi, le chr X a été lié à la PA dans quelques rares cas (Hilbert et al, 1991; Yagil et al, 1999). De plus, une étude dans ce modèle animal a montré que le chr X participe à la régulation de la masse cardiaque indépendamment de la PA (Vincent et al, 1996).

## Génétique de l'hypertrophie cardiaque

Nous avons vu jusqu'ici que l'HVG peut être décrite soit comme une adaptation du cœur à des stimuli exogènes, soit comme la limite supérieure des variations normales de la MVG dans la population générale. Pourtant, l'étiologie de l'hypertrophie cardiaque ne peut se résumer aux seuls facteurs environnementaux. Certaines maladies mendéliennes et l'héritabilité de la masse cardiaque mettent en lumière l'importance des facteurs génétiques dans la régulation de la masse cardiaque.

### La génétique mendélienne de l'hypertrophie cardiaque

#### La cardiomyopathie hypertrophique familiale

La cardiomyopathie hypertrophique familiale (CMH) est une maladie à transmission autosomale dominante avec une prévalence de 1/500 chez les jeunes adultes (Maron et al,

1995; Zou et al, 2004). Elle est caractérisée par une HVG en l'absence d'autres conditions connues pour induire une hypertrophie, telles que l'hypertension. La CMH s'accompagne aussi de nombreux autres phénotypes cliniques hétérogènes tels que l'arrythmie ou une petite taille des artères coronaires (Vikstrom & Leinwand, 1996). C'est une cause fréquente de mort soudaine, particulièrement chez les jeunes adultes et les athlètes (Fatkin & Graham, 2002).

Plusieurs centaines de mutations individuelles ont été identifiées à ce jour dans 11 gènes sarcomériques, incluant la titine, les troponines cardiaques C, I et T, la chaîne légère de myosine cardiaque, la chaîne lourde de myosine  $\beta$  cardiaque, l'actine cardiaque, la tropomyosine  $\alpha$ , la protéine C de liaison à la myosine cardiaque et la protéine LIM musculaire (Bonne et al, 1998; Seidman & Seidman, 2001; Fatkin & Graham, 2002; Bashyam et al, 2003; Ahmad et al, 2005; Ho & Seidman, 2006). Dans certains cas, on peut observer une certaine corrélation entre la localisation de la mutation morbide et la sévérité de la CMH (Vikstrom & Leinwand, 1996).

Une controverse persiste quant à la possibilité que des protéines non structurales puissent être dysfonctionnelles dans la CMH, notamment des protéines qui contrôlent l'homéostasie énergétique dans le myocarde. Par exemple, la protéine kinase AMPK est impliquée dans le métabolisme du glucose. Des mutations dans l'AMPK ont été reliées dans un premier temps à la CMH (Blair et al, 2001), mais d'autres auteurs ont préféré y voir un défaut de stockage métabolique du myocarde plutôt qu'une forme de CMH (Arad et al, 2002; Watkins, 2003; Arad et al, 2005). Le même raisonnement s'applique pour la protéine LAMP2, qui est impliquée dans le stockage du glycogène (Arad et al, 2005). D'autre part, le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chr X alors que la transmission de la CMH est autosomale.

Les mécanismes par lesquels un défaut dans le sarcomère mène à une cardiomyopathie sont encore mal compris (Tsoutsman et al, 2006). De plus, plusieurs gènes modificateurs non structuraux peuvent moduler la sévérité de la CMH induite par des

mutations sarcomériques. On retrouve entre autres les gènes du système rénine-angiotensine-aldostérone, le récepteur B2 à la bradykinine, l'ET-1 et le TNF $\alpha$  (Marian, 2002; Tsoutsman et al, 2006).

### La cardiomyopathie dilatée familiale

La cardiomyopathie dilatée familiale (CMD) causée par des mutations identifiées représente environ 30% des cardiomyopathies dilatées idiopathiques (Mestroni et al, 1996; Towbin & Bowles, 2000). Elle est majoritairement à transmission autosomique dominante, même si des formes récessives, mitochondrielles ou liées au chr X ont été rapportées (Mestroni et al, 1990; Mestroni et al, 1996; Towbin & Bowles, 2000; Villard, 2003). La CMD est caractérisée par une dilatation du VG (voire des deux ventricules) et par une fonction contractile diminuée. Elle aboutit invariablement à une défaillance cardiaque, des arythmies et des accidents thromboemboliques (Seidman & Seidman, 2001), des événements qui sont responsables de 30 à 50% de mortalité dans les 5 années suivant le diagnostic (Villard, 2003). La CMD s'accompagne de nombreux autres phénotypes cliniques cardiaques ou extracardiaques, incluant des troubles de conduction, des problèmes valvulaires, des myopathies squelettiques, voire de la surdité dans certains cas (Schonberger et al, 2000; Seidman & Seidman, 2001; Villard, 2003).

D'un point de vue génétique, on retrouve une grande hétérogénéité des mutations morbides. À ce jour, des mutations ont été identifiées dans des gènes du sarcomère (actine cardiaque, chaîne lourde de myosine  $\beta$  cardiaque, troponine cardiaque T, protéine LIM musculaire, titine, tropomyosine  $\alpha$ ), du cytosquelette et de l'ancre membranaire (desmine, sarcoglycan  $\delta$ , dystrophine, vinculine), de l'enveloppe nucléaire (lamine A/C) ou de régulation du Ca $^{2+}$  sarcoplasmique (phospholamban) (Mestroni et al, 1996; Towbin & Bowles, 2000; Seidman & Seidman, 2001; Fatkin & Graham, 2002; Villard, 2003; Ahmad et al, 2005). Il est à noter qu'une forme liée au chr X a permis d'identifier des mutations dans la tafazzine, une enzyme qui modifie la cardiolipine (phospholipide mitochondrial) et

dont la fonction n'a été caractérisée que récemment (Xu et al, 2006). Les phénotypes annexes peuvent orienter le diagnostic moléculaire en permettant d'effectuer des corrélations génotype-phénotype, mais il semble que de nombreux gènes morbides restent à découvrir (Villard, 2003).

## Mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie cardiaque

De nombreux mécanismes moléculaires impliqués dans l'HVG ont été identifiés à ce jour *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles de souris modifiées génétiquement. Outre les modèles développés pour confirmer les mutations morbides identifiées chez l'humain dans les gènes de structure, nombre d'investigateurs se sont aussi intéressés à la signalisation intracellulaire des cardiomyocytes (Hasenfuss, 1998; Chu et al, 2002). En effet, le pronostic clinique de la CMD ou de la CMH est trop souvent impossible à établir car ces maladies monogéniques semblent être modulées par des polymorphismes dans des gènes modificateurs (Bonne et al, 1998; Bashyam et al, 2003). Les voies de signalisation dont le rôle est bien décrit dans l'HVG sont présentées brièvement dans cette section (voir aussi la Figure 5, page 49).

## Réponses moléculaires caractéristiques

L'expression des gènes de réponse précoce (ou proto-oncogènes) c-fos et c-myc (Izumo et al, 1988; Komuro et al, 1988; Saadane et al, 1999) représente la réponse initiale du cœur à une surcharge de pression. D'autre part, les changements de morphologie des cardiomyocytes sont précédés et accompagnés par la réinduction d'un programme génique fœtal au niveau du VG (Frey & Olson, 2003). On observe notamment une réinduction des peptides natriurétiques ANF et BNP dans le cas des HVG concentrique et excentrique (Lattion et al, 1986; Schwartz et al, 1986; Izumo et al, 1988; Weinberg et al, 1999; Saadane

et al, 1999; Kuhn et al, 2002). Les protéines structurales telles que les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de la chaîne lourde de myosine et l'actine squelettique  $\alpha$  fœtale sont aussi fortement réexprimées (Izumo et al, 1987; Izumo et al, 1988; Weinberg et al, 1999; Saadane et al, 1999; Kuhn et al, 2002). De plus, on observe la réinduction de facteurs de transcription impliqués dans le développement cardiaque embryonnaire tels que GATA4 et Nkx2.5 (Saadane et al, 1999). Les profils de réexpression peuvent être différents en fonction du type de stimulus hémodynamique, comme par exemple dans les surcharges de pression et de volume (Calderone et al, 1995).

### Les récepteurs couplés aux protéines G

L'Ang II, l'ET-1 et les catécholamines (adrénergiques  $\alpha$ ) sont autant de facteurs qui agissent de manière autocrine/paracrine en réponse à un stress biomécanique, via leurs récepteurs couplés aux protéines  $G_{\alpha q/\alpha 11}$  (D'Angelo et al, 1997; Akhter et al, 1998; Wettschureck et al, 2001). L'activation de la PLC par les protéines  $G_{\alpha q/\alpha 11}$  et la production subséquente d'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> mène à la relâche du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Cette mobilisation des stocks de Ca<sup>2+</sup> induit un signal hypertrophique par l'activation de la voie calcineurine-NFAT (Wilkins & Molkentin, 2004) ou l'inactivation du système CaMK-HDAC (Wu et al, 2006).

Les protéines  $G_{\alpha q}$  peuvent aussi activer les PKCs. Les isoformes PKC $\delta$  et PKC $\epsilon$  ont des fonctions similaires, voire redondantes, dans la signalisation hypertrophique du myocarde. Pourtant ces isoformes ont des effets très contrastés sur la réponse cardiaque à un trouble ischémique, PKC $\epsilon$  étant associée à une meilleure adaptation du cœur (Dorn & Hahn, 2004).

## Les intégrines

Les cardiomyocytes peuvent aussi détecter les stress biomécaniques directement grâce à des mécanismes sensitifs internes. Entre autres, les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques (constitués de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ ) qui font la liaison entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette intracellulaire (Ross & Borg, 2001). Alors que les intégrines peuvent activer des effecteurs tels que la FAK et les petites GTPases Ras et Rho (Ross & Borg, 2001), la mélusine, qui interagit avec les intégrines, est essentielle pour inactiver la GSK3 $\beta$  (Brancaccio et al, 2003). La délétion chez la souris de l'un ou l'autre de ces composants (intégrines  $\beta$ , FAK, mélusine) mène à une dilatation et un dysfonctionnement ventriculaires (Shai et al, 2002; Brancaccio et al, 2003; Peng et al, 2006).

## La signalisation des MAP kinases

La cascade de signalisation des MAPK est activée par une grande variété de facteurs, incluant les GPCRs, les récepteurs à tyrosine kinase (IGF-I, FGF), les récepteurs à sérine/thréonine (TGF $\beta$ ) et certains stimuli de stress (Sugden & Clerk, 1998). Elle aboutit à l'activation par phosphorylation de p38, des JNKs et des ERKs (Garrington & Johnson, 1999) qui phosphorylent à leur tour de nombreuses cibles intracellulaires, incluant les facteurs de transcription qui induisent la reprogrammation génique cardiaque (Heineke & Molkentin, 2006).

Les ERKs semblent jouer un rôle adaptatif dans la réponse hypertrophique. La délétion de ERK1/2 dans le cœur de souris aboutit à une hypertrophie concentrique compensée (Bueno et al, 2000). La surexpression *in vivo* de MEK5 mène à un remodelage excentrique au cours duquel les cardiomyocytes font l'objet d'une sarcomogénèse en série (Nicol et al, 2001).

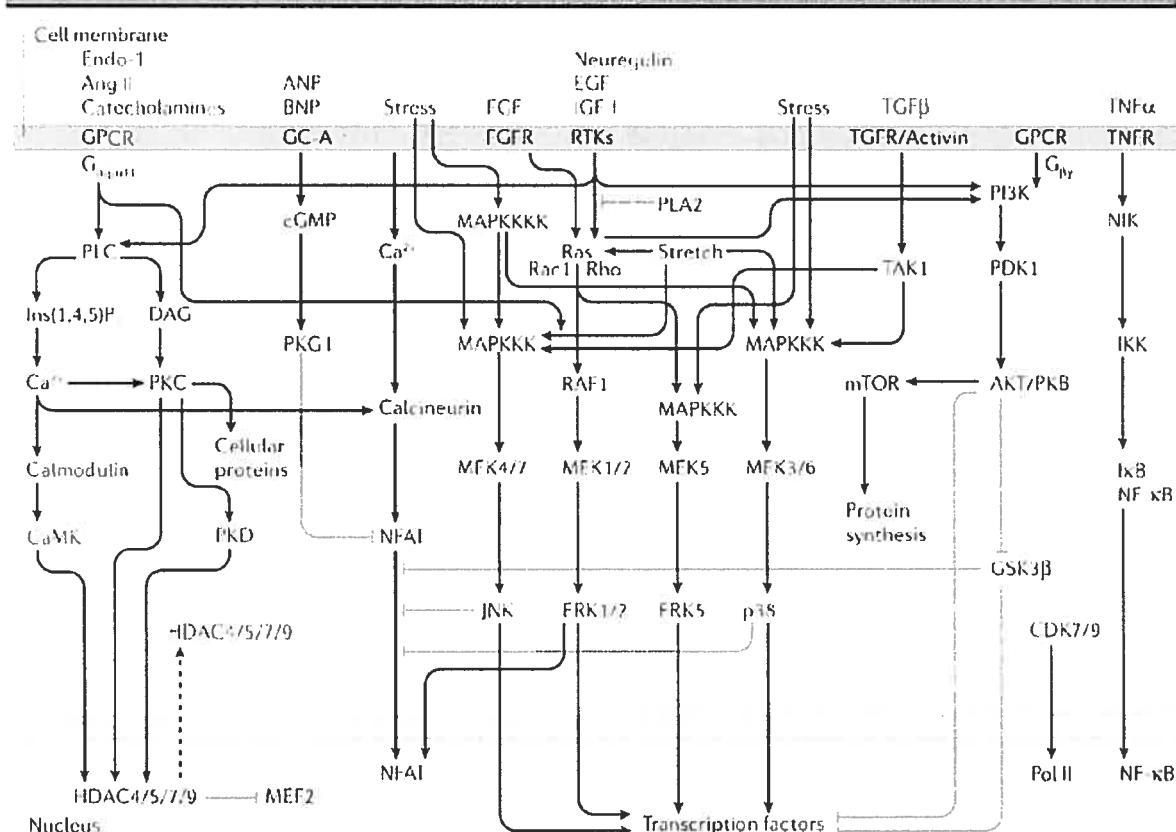
D'un autre côté, p38 et JNK1/JNK2 semblent réguler la réponse hypertrophique de façon négative, notamment parce qu'ils sont capables d'induire une apoptose ou une nécrose dans les cardiomyocytes (Heineke & Molkentin, 2006).

### Le système calcineurine-NFAT

La calcineurine est une phosphatase qui joue un rôle central dans l'HVG, et dont l'activation dépend du  $\text{Ca}^{2+}$  (Molkentin et al, 1998; Frey & Olson, 2003). Sa liaison aux facteurs de transcription de la famille NFAT induit la translocation de ces derniers dans le noyau et l'activation de l'expression de gènes pro-hypertrophiques (Wilkins & Molkentin, 2004). De façon intéressante, de nombreux mécanismes d'inhibition de NFAT existent dans la cellule, incluant les kinases GSK3 $\beta$  (Antos et al, 2002), p38 (Braz et al, 2003) et JNK (Liang et al, 2003) ainsi que le cGMP (Fiedler et al, 2002; Zahabi et al, 2003; Takimoto et al, 2005).

### La voie PI3K-AKT

L'insuline et l'IGF-I régulent l'hypertrophie physiologique du cœur via l'activation de la PI3K $\alpha$ . Cette dernière peut aussi être activée par les protéines couplées aux protéines  $G_{\beta\gamma}$  (Oudit et al, 2004). S'ensuit ensuite l'activation de AKT/PKB qui peut soit activer l'expression de facteurs de transcription (GATA4,  $\beta$ -caténine, c-Myc, NFAT) ou la synthèse protéique (eIF2B) en inhibant GSK3 $\beta$ , soit activer la synthèse protéique en activant mTOR (Cantley, 2002; Proud, 2004). Les effets de la voie PI3K-AKT semblent cependant être bénéfiques uniquement lorsque la voie est activée dans des conditions physiologiques et de manière aiguë (Shiojima et al, 2005), ou lorsque les actions de AKT/PKB sont limitées au noyau (Shiraishi et al, 2004; Rota et al, 2005).



**Figure 5 :** Voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie des cardiomyocytes (Heineke & Molkentin, 2006).

### La masse cardiaque est un caractère complexe

Nous avons vu jusqu'ici que la masse cardiaque est sous le contrôle conjoint de facteurs environnementaux et génétiques. Les formes d'HVG familiales sont rares en regard de la fréquence d'HVG observée dans la population générale, et semblent elles-mêmes sujettes à une modulation par des gènes modificateurs et des facteurs environnementaux (Brugada et al, 1997; Bonne et al, 1998; Bashyam et al, 2003). En fait, l'héritabilité de la masse cardiaque a été démontrée chez l'humain à plusieurs reprises

(Maron et al, 1984; Greaves et al, 1987; Verhaaren et al, 1991; Gardin et al, 1995a; Gardin et al, 1995b; Post et al, 1997; Garner et al, 2000). Il en ressort que 60 à 70% de la variabilité de la MVG est imputable aux facteurs génétiques, l'environnement ne contribuant que de manière modeste aux variations de la MVG. Chez le rat, une étude sur 23 souches consanguines et leurs croisements a montré que les facteurs génétiques expliquent à eux seuls 45 à 65% de la variabilité de la masse cardiaque, indépendamment de la PA (Tanase et al, 1982).

L'étiologie de l'HVG dans la population générale est donc, selon toute vraisemblance, le résultat des effets de multiples gènes, de l'environnement et de l'interaction entre ces différents facteurs. On peut donc considérer l'HVG comme une maladie complexe (Deschepper et al, 2002a) selon la définition de Lander & Schork : « le terme “caractère complexe” réfère à tout phénotype qui ne suit pas les règles classiques de l'héréditabilité mendélienne récessive ou dominante attribuable à un seul gène. En général, les complexités proviennent du fait que la simple correspondance entre le génotype et le phénotype est perdue, soit parce que le même génotype peut aboutir à différents phénotypes (à cause du hasard, de l'environnement ou des interactions avec d'autres gènes), soit parce que différents génotypes peuvent aboutir au même phénotype. » (Lander & Schork, 1994).

Une méthode pour disséquer les bases génétiques d'une maladie complexe consiste à utiliser une approche par gène candidat qui permet de cibler directement des gènes dont la fonction est déjà établie dans la mise en place du phénotype observé (Cardon & Bell, 2001). C'est une stratégie directe, qui présente cependant les limitations suivantes : la connaissance partielle des facteurs génétiques, biochimiques et physiologiques qui contrôlent le phénotype; le manque de structure des populations humaines, notamment la stratification due aux différences ethniques; la petite taille des échantillons de population étudiés; le manque de réplication des résultats; et l'absence possible de déséquilibre de liaison avec les loci adjacents (MacRae, 2000; Cardon & Bell, 2001). Malgré tout, plusieurs gènes ont été associés à l'HVG grâce à cette méthode, tel que résumé dans le Tableau 2, page 52.

La cartographie génétique par criblage de génomes entiers permet quant à elle de mettre à jour de façon systématique les loci (et finalement les gènes) qui causent des maladies héréditaires sans connaître ni leur localisation, ni leur fonction (Lander & Schork, 1994). La génétique des caractères complexes chez l'humain a offert des perspectives excitantes à la fin des années 80, notamment en permettant de disséquer un caractère quantitatif en facteurs génétiques discrets qui sont susceptibles d'être ensuite analysés grâce au clonage positionnel (Lander & Botstein, 1989; Altmuller et al, 2001). Pourtant, le bilan au début des années 2000 n'était pas à la hauteur des espoirs et des investissements engagés dans la course aux gènes : malgré un nombre croissant de loci génomiques cartographiés, une dizaine de gènes ont été identifiés grâce à la génétique des maladies complexes (Altmuller et al, 2001; Korstanje & Paigen, 2002; Glazier et al, 2002), contre plusieurs milliers de gènes morbides impliqués dans les maladies mendéliennes (McKusick, 2007). Les principaux écueils rencontrés en génétique humaine sont entre autres l'absence de contrôle des facteurs environnementaux, l'expression différentielle des gènes cibles en fonction de l'âge et le manque d'homogénéité dans les populations étudiées (Schork, 1997), même si le séquençage du génome humain a permis entre temps de multiplier le nombre de marqueurs afin d'enrichir les cartes génétiques.

Pour remédier à ces difficultés qui diminuent énormément le pouvoir statistique de la cartographie génétique chez l'humain, les investigateurs se sont naturellement tournés vers les modèles animaux.

## Des modèles animaux pour isoler les facteurs génétiques de l'hypertrophie cardiaque

Parce que les réseaux fondamentaux de la régulation génique sont conservés entre diverses espèces animales (parfois même très éloignées), les mécanismes moléculaires à la

**Tableau 2 :** Gènes associés à la régulation de la MVG chez l'humain.

Gène	n ( $\text{♂}/\text{♀}$ )	Méthode	Âge	Polymorphisme	Référence
ACE	80/62	écho	55	1 indel	(Iwai et al, 1994)
ACE	149/141	écho	45-59	1 indel	(Schunkert et al, 1994)
ACE	141/-	IRM	20	1 indel	(Myerson et al, 2001)
ACE + $\beta$ 2BKR	109/-	IRM	20	1 indel/1 SNP	(Brull et al, 2001)
$\beta$ 2BKR	56/34	écho	54	1 SNP	(Nakayama et al, 2003)
AT2	125/72	IRM	55	1 SNP	(Alfakih et al, 2004)
AT2	120/-	écho	26	1 SNP	(Schmieder et al, 2001)
AS	362/464	écho	-	haplotypes	(Mayosi et al, 2003)
AS	120/-	écho	26	1 SNP	(Delles et al, 2001)
AS	173/37	écho	42	1 SNP	(Stella et al, 2004)
eNOS	34/50	écho	45	1 SNP	(Lapu-Bula et al, 2005)
NPPA	160/32	écho	40	3 SNP	(Rubattu et al, 2006)
NPR1	160/32	écho	40	1 microsatellite	(Rubattu et al, 2006)
ADD1	162/-	écho	32	1 SNP	(Winnicki et al, 2002)
TH	108/-	écho	25	1 SNP	(Linhart et al, 2002)
ACE2	536/561	écho	50	haplotypes	(Lieb et al, 2006)
GHSR	827/851	écho	51	haplotypes	(Baessler et al, 2006)

Écho : échocardiographie; SNP : *Single nucleotide polymorphism*; Indel : insertion ou délétion.

base du développement et de la fonction cardiaques peuvent être disséqués dans des organismes tels que la mouche drosophile, le ver nématode ou le poisson-zèbre (Olson, 2006). Toutefois, les avantages d'étudier un cœur de mammifère composé de 4 chambres permettent de mieux traduire les résultats en termes de maladies humaines.

De nombreux bénéfices éthiques, économiques, d'accessibilité aux animaux et de reproductibilité des méthodes expérimentales ont conduit au développement des modèles animaux. Ces derniers ont permis d'évaluer les aspects pathophysiologiques de l'HVG tant au niveau de l'individu qu'au niveau cellulaire. De plus, les progrès technologiques ont rendu possible le développement d'instruments pour mesurer précisément des variables cardiovasculaires quantitatives même chez des animaux de la taille d'une souris, et souvent de manière non invasive (Mitchell et al, 1998; Collins et al, 2003).

L'utilisation de modèles animaux est cependant limitée par leurs caractéristiques physiologiques intrinsèques. Ainsi, le cœur d'une souris au repos bat 10 fois plus vite que celui d'un humain (Chu et al, 2002). Le cœur d'un rat au repos bat 5 fois plus vite que celui d'un humain et la relation force-fréquence est inversée (Hasenfuss, 1998). Dans ces deux modèles (les plus utilisés dans les études sur l'HVG), les ventricules d'un animal adulte expriment principalement l'isoforme  $\alpha$  de la chaîne lourde de myosine, tandis que ceux d'un humain expriment l'isoforme  $\beta$ . Une transition vers l'expression de l'isoforme  $\beta$  s'effectue chez les rongeurs seulement en cas de surcharge hémodynamique ou de changement hormonal (Swynghedauw, 1986).

Malgré ces limitations, de nombreuses études effectuées sur des mammifères ont fourni une quantité énorme d'informations sur les effets de l'hémodynamie et de l'activation neuro-humorale, sur la fonction myocardique ainsi que sur la nature des altérations moléculaires dans les cardiomyocytes (Hasenfuss, 1998).

## Induction expérimentale de l'hypertrophie cardiaque

Le rat est sans doute le modèle animal qui a le plus été utilisé dans les études physiologiques et pharmacologiques du système cardiovasculaire (Jacob & Kwitek, 2002). On peut cependant citer aussi le lapin, le chien, le porc, le chat, le hamster, le furet, le mouton, le babouin, le cobaye (ou cochon d'Inde) et la souris comme modèles animaux pour l'étude expérimentale de l'HVG (Hasenfuss, 1998). Les techniques les plus utilisées pour induire une HVG sont des chirurgies et l'infusion d'hormones causant des stimuli hémodynamiques.

Certaines chirurgies permettent d'induire une HVG tout en modulant la forme d'hypertrophie. Ainsi, la constriction partielle de l'aorte au niveau thoracique ou abdominal provoque une surcharge de pression qui entraîne une hypertrophie concentrique (Mercadier et al, 1981; Baker et al, 1990; Rockman et al, 1993; Barrick et al, 2006; Miyazaki et al, 2006). La chirurgie abdominale a l'avantage de ne pas provoquer d'inflammation ni d'adhésions intrathoraciques, bien qu'une nouvelle technique de constriction de l'aorte thoracique via une approche suprasternale permette d'éliminer certaines de ces complications expérimentales (Del Monte et al, 2002). Un autre avantage de la constriction abdominale est la possibilité de la relâcher facilement afin d'observer l'impact d'une surcharge de pression transitoire (Cutilletta et al, 1975; Jouannot & Hatt, 1975). La fistule aorto-cavale est une chirurgie qui permet de faire communiquer l'aorte et la veine cave. La surcharge de volume induite par le passage du sang de l'aorte vers la veine cave provoque une hypertrophie excentrique (Hatt et al, 1979; Flaim et al, 1979; Garcia & Diebold, 1990; Miyazaki et al, 2006). D'autres chirurgies permettent d'induire une HVG excentrique comme par exemple la ligature de l'artère coronaire gauche (Pfeffer et al, 1979; Litwin et al, 1994).

L'HVG peut aussi être induite par des moyens pharmacologiques. L'infusion de facteurs hormonaux tels que les catécholamines (Colucci, 1998; Li et al, 2003) ou l'Ang II (Dostal & Baker, 1992; Kim et al, 1995; Susic et al, 1996; Lako-Futo et al, 2003) permet

d'obtenir une hypertrophie concentrique. L'avantage des techniques pharmacologiques est la possibilité de faire des études de dose-réponse, et de tester l'effet d'une stimulation chronique ou transitoire (Saadane et al, 1999).

Ces diverses méthodes induisent des hypertrophies importantes qui se développent en l'espace de quelques jours seulement. Ces modèles expérimentaux ne reflètent donc pas les pathologies humaines, qui s'installent progressivement. Cependant, la reproductibilité des méthodes, et le contrôle du fonds génétique des animaux utilisés et de leur environnement, permettent de définir précisément quel degré d'hypertrophie a été induit et quelles en sont les conséquences pathologiques. Il est donc possible d'utiliser ces modèles afin d'étudier les relations structure-fonction ou la régulation de l'expression génique (Hasenfuss, 1998).

Par exemple, nous avons utilisé au laboratoire la fistule aorto-cavale dans un modèle de rat congénique pour un locus contenant le gène codant pour le précurseur de l'ANF (Souzeau et al, 2006). Les résultats ont permis de conclure qu'un locus génétique, qui induit tout au plus un léger remodelage concentrique du VG dans des conditions basales, est également associé à une dilatation marquée et à un dysfonctionnement du VG lorsque le cœur est soumis à un stress hémodynamique. Ceci démontre que les effets d'un locus génétique donné sur le remodelage cardiaque peuvent se manifester différemment en fonction des conditions environnementales.

## Modèles génétiques de l'hypertrophie cardiaque

Afin de s'approcher au plus près des critères cliniques humains de l'HVG, des modèles génétiques animaux ont été développés.

## Modèles issus de l'ingénierie génétique

Les souris modifiées génétiquement (transgéniques, *knock-out* et *knock-in*) représentent des outils de choix qui ciblent spécifiquement l'expression de certains gènes ou transgènes. Grâce à ces modèles, il a été possible de quantifier précisément les effets de mutations et de changements d'expression génique sur la fonction cardiaque aux niveaux de la cellule, de l'organe ou de l'animal entier. La somme de tous ces résultats a conduit à l'identification de mécanismes moléculaires (préalablement non soupçonnés) impliqués dans l'initiation et le développement de l'HVG et/ou la transition vers la défaillance cardiaque (voir plus haut la section sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie cardiaque) (Chu et al, 2002). Cependant, outre les limitations dues aux différences physiologiques entre les cœurs murin et humain soulevées précédemment, les modifications génétiques doivent être considérées avec beaucoup de précautions afin d'éviter les interprétations artéfactuelles : le fonds génétique de la souche de souris utilisée peut avoir de profonds effets sur le phénotype observé, l'insertion aléatoire d'un transgène peut entraîner des bouleversements inattendus dans une voie de signalisation non ciblée, une redondance génique ou un mécanisme compensatoire peuvent compliquer l'interprétation des résultats, l'expression ectopique d'un gène dans le cœur peut avoir avoir des effets toxiques non spécifiques (Chu et al, 2002; Yutzey & Robbins, 2007). Les progrès méthodologiques et technologiques permettront sans doute d'éliminer ces biais expérimentaux, notamment en ciblant les modifications génétiques d'un point de vue spatial et/ou temporel (Yutzey & Robbins, 2007).

## Modèles dérivés par sélection

D'autres modèles génétiques de l'HVG ont été obtenus par sélection de populations ayant des phénotypes extrêmes dans des croisements de souches de rats. À la suite de nombreux croisements consanguins, les propriétés phénotypiques anormales sont alors fixées génétiquement. Ainsi plusieurs souches consanguines de rats qui ont été utilisées

pour étudier l'HVG avaient en premier lieu été sélectionnées pour leur tendance à développer de l'hypertension artérielle (Pinto et al, 1998). Les rats SHR (*Spontaneously hypertensive rat*) (Bing et al, 2002), Dahl-S (Okere et al, 2006; Louhelainen et al, 2007) et LH (*Lyon hypertensive*) (Lantelme et al, 1997) permettent donc d'étudier l'hypertrophie cardiaque dépendante de l'hypertension. D'autres modèles permettent d'étudier la transition entre l'hypertrophie et la défaillance cardiaques, tels que les rats SHR-SP (*Spontaneously hypertensive rat-stroke prone*) (Jesmin et al, 2005; Takemori et al, 2005) et SHHF (*Spontaneously hypertensive heart failure*) (Onodera et al, 1998; Sack & Kelly, 1998; Reffelmann & Kloner, 2003; Minhas et al, 2006).

Certaines souches de rats possèdent une MVG élevée en présence d'une PA normale. La souche de rats consanguins WKHA (*Wistar Kyoto hyperactive*) est issue d'un croisement entre les lignées consanguines SHR hypertendue et WKY (*Wistar Kyoto*) normotendue. Initialement, les WKHA ont été sélectionnés pour séparer les déterminants génétiques de l'hypertension et de l'hyperactivité (Hendley & Ohlsson, 1991) mais le modèle s'est avéré pertinent pour étudier l'HVG, essentiellement dans mon laboratoire d'accueil (Masciotra et al, 1999; Deschepper et al, 2001; Boutin-Ganache et al, 2002; Deschepper et al, 2002a; Deschepper et al, 2002b; Llamas et al, 2005b; Souzeau et al, 2006; Marcil et al, 2006; Palmer et al, 2006). Plus récemment, la souche de rats consanguins HHR (*Hypertrophic heart rat*) a été sélectionnée à partir des lignées consanguines SHR hypertendue et F344 (*Fisher 344*) normotendue afin d'isoler les facteurs génétiques de l'HVG et de l'hypertension (Harrap et al, 2002a).

La grande variété de souches consanguines disponibles tant chez le rat que chez la souris permet aussi de comparer plusieurs lignées existentes pour un phénotype d'intérêt, comme la MVG par exemple. Ainsi, l'analyse quantitative de 13 souches de souris a permis de montrer une grande variabilité de la masse cardiaque, corrélée de façon modeste mais significative avec la pression systolique (Deschepper et al, 2004). En particulier, les lignées consanguines A/J et C57BL/6J contrastent pour la masse et la géométrie cardiaques, bien

qu'elles présentent une PA normale et comparable (Hoit et al, 2002; Deschepper et al, 2004).

### **Identification de loci génomiques impliqués dans l'hypertrophie cardiaque**

Différents modèles de rats ont servi à étudier les bases génétiques de la régulation de la masse cardiaque grâce aux méthodes de cartographie génétique des caractères complexes. Cette méthode est détaillée dans la section suivant ce paragraphe. Rapidement, deux souches parentales qui présentent un polymorphisme génétique suffisant et qui contrastent pour un phénotype quantitatif d'intérêt sont croisées selon un schéma expérimental défini. Dans la descendance, on observe la ségrégation des génotypes recombinés et des valeurs phénotypiques afin de déterminer l'existence d'une éventuelle liaison statistique entre un ou plusieurs loci génomiques et la caractéristique considérée. Une quarantaine de loci génomiques (ou QTL, *quantitative trait locus*) liés à la MVG ont été identifiés chez le rat depuis le milieu des années 90, incluant les loci que j'ai cartographiés au cours de mon doctorat (Tableau 8, page 214). Beaucoup de ces QTL coincident avec des QTL liés à la PA, principalement parce qu'au moins une des souches parentales est hypertendue. Seuls trois laboratoires, dont celui dans lequel j'ai effectué mon doctorat, ont choisi d'utiliser des souches parentales normotendues (Sebkhi et al, 1999; Deschepper et al, 2001; Gauguier et al, 2005; Llamas et al, 2005b).

Chez la souris, peu d'études de cartographie de QTL ont considéré la masse cardiaque comme un phénotype d'intérêt (Moody et al, 1999; Sugiyama et al, 2002; Leamy et al, 2002; Rocha et al, 2004). Fait à noter, les souches de souris utilisées étaient normotendues.

## Bases théoriques de la génétique des caractères complexes

Cette section est basée en partie sur un chapitre de méthodologie co-écrit avec mon superviseur et publié dans la série de livres *Methods in Molecular Biology* chez *Humana Press* (Llamas & Deschepper, 2005). Le manuscrit est présenté en annexe 2.

Les caractères complexes, ou quantitatifs, ne sont pas reliés de façon directe et systématique aux variants d'un gène particulier, au contraire des maladies mendéliennes (Lander & Schork, 1994). Ils dépendent des effets combinés de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, chaque locus ne contribuant que pour une portion de la variance totale du caractère. Le phénotype mesuré peut avoir des valeurs discrètes, comme par exemple un nombre de tumeurs, ou une distribution continue, comme dans le cas de la PA (Complex Trait Consortium, 2003). Idéalement, les valeurs phénotypiques sont distribuées selon une loi normale dans la population étudiée. Du point de vue génétique, un même locus peut être considéré soit comme un QTL, soit comme un locus mendélien selon la nature de l'allèle examiné : certains allèles peuvent avoir des effets quantitatifs, alors que d'autres allèles au même locus peuvent avoir des effets qualitatifs du type « tout ou rien ». Cependant, la distinction entre un locus mendélien et un QTL est souvent artificielle car les mêmes techniques de détection peuvent être appliquées dans les deux cas. La classification des effets alléliques devrait être considérée comme un continuum, avec les caractères mendéliens à un extrême et les caractères très polygéniques à l'autre extrême. En corollaire, une cartographie de QTL sera simplifiée si le caractère considéré est sous le contrôle d'un petit nombre de loci ayant chacun des effets modérés à majeurs (Complex Trait Consortium, 2003).

Le présent chapitre s'intéresse à certaines méthodologies concernant particulièrement la génétique des caractères complexes chez les rongeurs de laboratoire.

## Les croisements expérimentaux de rongeurs

### Les souches parentales

Les méthodes de cartographie de QTL chez le rat et la souris reposent sur la liaison statistique entre d'une part des variants génétiques et d'autre part des variations phénotypiques dans une population expérimentale. Le point de départ de toute étude classique en génétique des caractères complexes est le choix de deux souches parentales. Le plus simple consiste à utiliser des lignées consanguines dans lesquelles tous les animaux d'une même lignée sont identiques d'un point de vue génétique et où tous les gènes autosomaux (et ceux du chr X chez les femelles) sont homozygotes. En conséquence, les seules causes de variabilité phénotypique dans les souches parentales sont d'origine non génétique (environnement et/ou méthode utilisée pour mesurer le phénotype) lorsqu'on considère des individus du même sexe.

Le choix des souches parentales repose principalement sur deux critères : la présence de différences quantitatives pour le caractère d'intérêt et un polymorphisme allélique entre les deux lignées. Un contraste marqué pour le phénotype étudié est préférable (Moore & Nagle, 2000; Deschepper et al, 2002a) mais certaines études ont abouti à l'identification de QTL majeurs même si les souches parentales avaient des valeurs phénotypiques comparables (Sugiyama et al, 2002; Llamas et al, 2005a). D'autre part, un polymorphisme allélique élevé donne la possibilité d'obtenir des cartes génétiques denses, et donc d'affiner la cartographie des QTL (Lander & Schork, 1994).

### L'hérédité des caractères : étude de la génération F1

La génération F1 s'obtient par croisement de deux souches parentales consanguines P1 et P2. Tous les individus F1 héritent d'un lot de chromosomes de P1 et du lot de chromosomes homologues de P2. Ainsi les individus F1 ont tous le même bagage

génétique. De plus, tous les gènes autosomaux (et ceux du chr X chez les femelles) sont hétérozygotes. Comme pour les souches parentales, la variabilité phénotypique est due exclusivement aux facteurs non génétiques lorsqu'on considère des individus du même sexe.

Une analyse de la transmission du caractère des souches parentales à la génération F1 permet de déterminer un modèle d'hérédité de ce caractère. Les individus F1 peuvent avoir une valeur phénotypique identique à celle de P1 (ou P2). On parle alors de dominance du caractère apporté par P1 (ou P2) et de récessivité du caractère apporté par P2 (ou P1). Le plus souvent, les individus F1 ont une valeur intermédiaire du phénotype et on parle alors de codominance des caractères. Plus rarement, les individus F1 auront une valeur phénotypique en-dehors des limites parentales : on parle dans ce cas de "superdominance" ou "vigueur hybride".

Il est important d'effectuer des croisements F1 réciproques entre les souches parentales : des femelles P1 sont croisées avec des mâles P2 et des femelles P2 sont croisées avec des mâles P1. Cette procédure permet de déterminer si les chromosomes sexuels portent une information génétique susceptible d'influencer le caractère d'intérêt. En effet, les individus mâles des deux croisements F1 réciproques auront des valeurs phénotypiques identiques si tous les QTL sont sur des autosomes. Par contre s'il y a au moins un QTL sur les chromosomes sexuels, les valeurs phénotypiques seront différentes entre les mâles F1 réciproques selon l'origine P1 ou P2 des chromosomes sexuels hétérologues X et Y.

### **Exploiter la recombinaison génétique : les croisements expérimentaux**

La génération F1 sert de base pour les croisements expérimentaux. En effet, la nature hétérozygote des individus F1 permet de créer un brassage allélique aléatoire grâce à la recombinaison méiotique dans les croisements subséquents. La taille de la population à

générer est difficile à prédire car elle dépend de nombreux facteurs généralement inconnus au début de l'étude : nombre de QTL, effets individuels des QTL, biais techniques et/ou environnementaux lors du phénotypage, polymorphisme génétique entre les lignées parentales (Moore & Nagle, 2000). En général, il est admis qu'une augmentation du nombre d'animaux analysés renforce le pouvoir de détection des QTL à effet mineur (Soller et al, 1976).

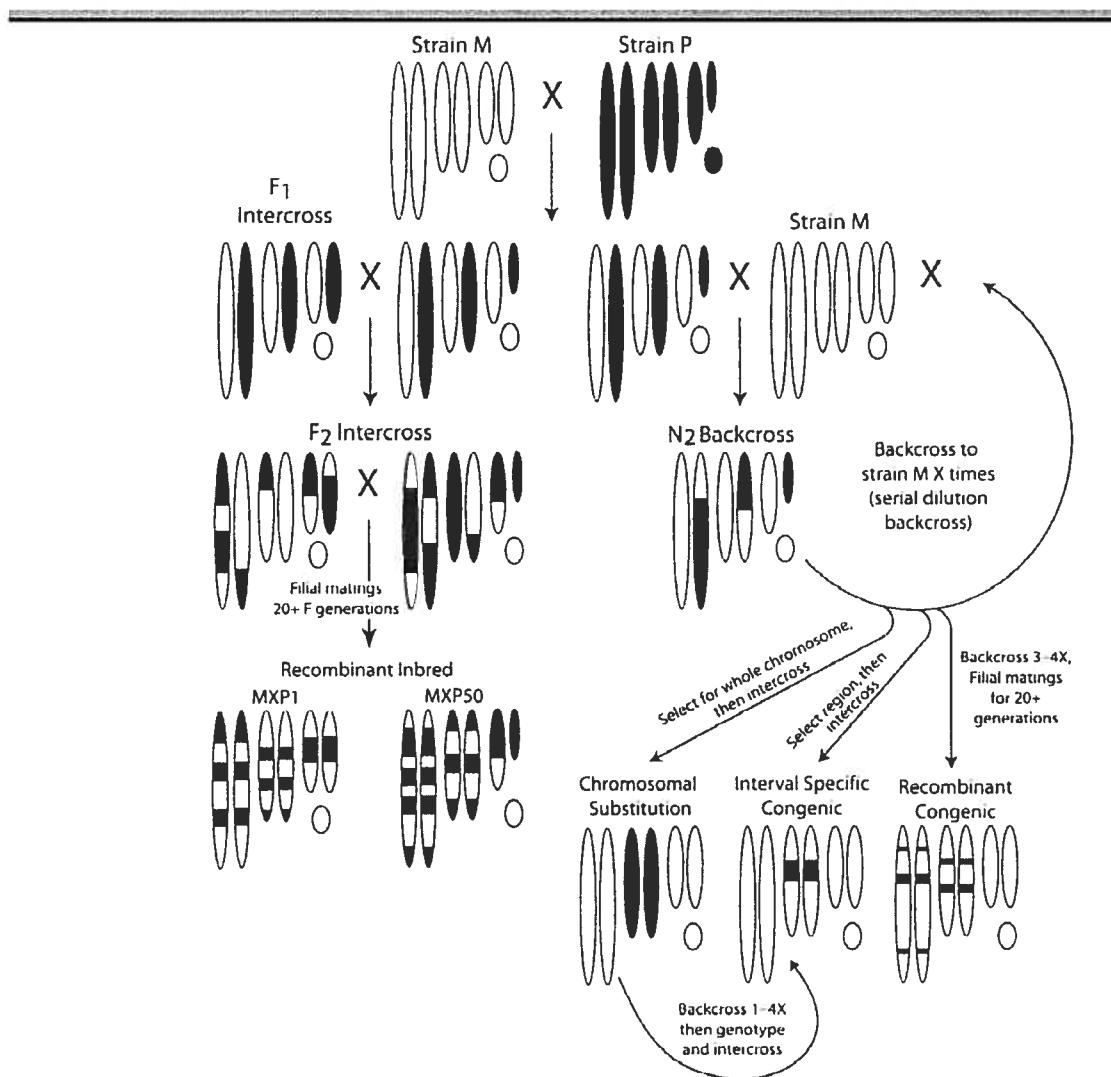
Deux approches classiques ont été utilisées avec succès en génétique des traits complexes (Peters et al, 2007). Le croisement en retour (ou rétrocroisement) entre la génération F1 et la souche parentale P1 (ou P2) permet de générer une population N2, dans laquelle on retrouve autant d'individus homozygotes pour P1 (ou P2) et hétérozygotes à chaque locus (Figure 2 de l'annexe 2). Cette stratégie est particulièrement efficace lorsque le caractère considéré est transmis de façon récessive par la souche parentale croisée avec les F1 (Moore & Nagle, 2000). Si le caractère est codominant, une autre approche classique est conseillée. L'inter-croisement des individus F1 permet de générer une population F2, dans laquelle toutes les combinaisons alléliques sont possibles à chaque locus avec une distribution 1:2:1 (homozygote P1:hétérozygote:homozygote P2) des génotypes (Figure 2 de l'annexe 2). Ce croisement expérimental permet aussi d'étudier l'effet additif des allèles (Moore & Nagle, 2000).

De nombreuses autres ressources sont disponibles, principalement chez la souris (Complex Trait Consortium, 2003) : lignées d'inter-croisements avancés (Darvasi & Soller, 1995), lignées recombinantes consanguines (Bailey, 1971), croisements entre lignées recombinantes consanguines (Threadgill et al, 2002; Zou et al, 2005), stocks hétérogènes (Talbot et al, 1999; Chia et al, 2005; Valdar et al, 2006), lignées congéniques (Snell, 1948; Davis et al, 2005), lignées congéniques consanguines (Demant & Hart, 1986), lignées consomiques (Singer et al, 2004). Parmi ces ressources, certaines sont dérivées des croisements classiques F2 et N2. Par exemple, un second rétrocroisement avec les N2 permet de générer des individus N3, à partir desquels on effectue une série de croisements frère-sœur pendant au moins 20 générations. On obtient ainsi des lignées congéniques

consanguines qui contiennent chacune une portion aléatoire du génome de la souche parentale donneuse (environ 12.5%) dans le fonds génétique de la souche parentale receveuse qui a servi pour les rétrocroisements (Figure 6, page 64) (Demant & Hart, 1986; Fortin et al, 2001). Autre exemple, une série de croisements frère-sœur à partir des individus F2 pendant au moins 20 générations permet d'obtenir des lignées recombinantes consanguines. Chaque lignée possède une combinaison unique des allèles parentaux, la moitié provenant de P1 et l'autre de P2 (Figure 6, page 64) (Marshall et al, 1992; Rapp, 2000). Enfin une série de rétrocroisements assistés par des marqueurs génétiques à partir des N2 sur plusieurs générations permet de sélectionner des souches avec une substitution chromosomique (aussi appelées souches consomiques). Dans chaque lignée, une paire de chromosomes homologues du génome de la souche parentale receveuse a été substituée par celle de la souche parentale donneuse (Figure 6, page 64) (Nadeau et al, 2000; Singer et al, 2004). Tous ces modèles dérivés des F2 ou des N2 offrent l'avantage d'immortaliser une combinaison particulière des allèles parentaux au sein d'une même lignée.

Par rapport aux croisements dérivés, l'avantage de l'inter-croisement F2 ou du rétrocroisement N2 est l'obtention d'un grand nombre d'individus (plusieurs centaines). Ceci offre la possibilité d'analyser un grand nombre d'événements de recombinaison allélique et permet ainsi de détecter des QTL à faible pénétrance. Cependant, la mesure du phénotype et le génotypage doivent être extrêmement précis car chaque individu est unique (Sen et al, 2005).

L'utilisation de plusieurs centaines de lignées recombinantes consanguines serait nécessaire afin de détecter des QTL à effet mineur. Cependant, l'analyse d'au moins une vingtaine de lignées recombinantes permet déjà de détecter des QTL à forte pénétrance (Demant, 2003). Chez le rat, un seul ensemble de lignées recombinantes correspond à ce critère. Il a été développé à partir des souches consanguines SHR et BN et comprend 11 lignées BXH (dérivées d'un croisement entre des femelles BN et des mâles SHR) et 21 lignées HXB (dérivées du croisement réciproque) (Pravenec et al, 1989). Chez la souris,



**Figure 6 :** Schéma représentatif de la génération de populations recombinantes. Dans chaque génome schématique les paires de chromosomes à gauche et au centre représentent des autosomes, la paire de droite les chromosomes sexuels (X plus grand que Y). L'ADN mitochondrial et les facteurs cytoplasmiques sont représentés par le cercle sous les chromosomes sexuels. L'information génétique paternelle (*strain P*) est en noir et celle venant de la souche maternelle (*strain M*) est en blanc. *Chromosomal substitution strain* : lignée consomique. Adapté de Hunter & Williams (2002).

plusieurs ensembles de plus de 20 lignées recombinantes ont été développés et sont disponibles commercialement, dont 29 lignées AXB et BXA (dérivées des souches consanguines C57BL/6J et A/J) (Nesbitt & Skamene, 1984). Dans ce dernier cas, le nombre de lignées utilisables a été réduit à 24 pour cause soit de redondance génétique, soit d'extinction. Même si ces ressources sont limitées par le nombre de lignées disponibles, elles offrent les avantages expérimentaux suivants (de même pour les autres croisements dérivés) :

1. Le génotypage de chaque lignée n'a pas besoin d'être répété. Dans le cas particulier des lignées les plus communément utilisées, le génotype pour des milliers de marqueurs microsatellites et de SNP est disponible dans des bases de données publiques (Williams et al, 2001).
2. La mesure du phénotype peut être répétée sur plusieurs individus génétiquement identiques dans une même lignée. La moyenne résultante augmente la précision de la mesure et permet de minimiser les biais environnementaux et techniques (Rapp, 2000).
3. Un phénotype peut être mesuré en fonction du temps sur différents individus d'une même lignée (par exemple à différents âges), même si la mesure nécessite le sacrifice des animaux ou l'utilisation d'une technique invasive (Rapp, 2000).
4. La réponse à des stimuli environnementaux peut être considérée comme un caractère quantitatif. La possibilité de comparer des groupes contrôles et expérimentaux dans une même lignée donne accès à de tels phénotypes (Rapp, 2000).
5. L'analyse de phénotypes complémentaires augmente le pouvoir statistique pour détecter des QTL (Deschepper et al, 2002a) : soit certains phénotypes complémentaires contrastent mieux entre les souches parentales que le caractère d'intérêt (Deschepper et al, 2002b), soit des phénotypes intermédiaires sont sous

le contrôle de peu de gènes, voire d'un seul gène (Rapp, 1991). Or le phénotypage extensif d'un caractère d'intérêt et des caractères complémentaires n'est pas toujours possible sur un même animal mais devient envisageable dans des lignées recombinantes consanguines.

Lorsqu'un effet des chromosomes sexuels est détecté suite à l'analyse de la génération F1, les souches consomiques pour ces chromosomes offrent la possibilité d'étudier en détail leur impact sur un caractère quantitatif. En ce qui concerne les autosomes, les lignées consomiques offrent l'avantage de pouvoir créer très rapidement des lignées congéniques spécifiques pour un locus d'intérêt en effectuant quelques rétrocroisements avec la souche parentale receveuse (Figure 6, page 64).

## Cartographie génétique de QTL

La réussite d'un criblage du génome pour cartographier des QTL dépend de l'héritabilité du caractère, de sa nature génétique (dominant, récessif ou additif) et du nombre de gènes qui l'affectent. Pour un QTL donné, la résolution pour le localiser dépend du nombre d'évènements de recombinaison dans la population étudiée (Complex Trait Consortium, 2003).

### Méthode de régression par marqueur

Les lois de base de la cartographie de QTL ont été formulées par Soller et al (1976). Dans cet article princeps, les auteurs développent une méthode de régression par marqueur qui utilise l'analyse de variance à chaque marqueur. Lorsque le génotype à un marqueur coségrège de façon significative avec la distribution phénotypique dans la population recombinante, on dit que ce marqueur est lié à un QTL. La méthode de régression par marqueur a l'avantage d'être simple, de ne pas nécessiter la construction d'une carte

génétique et de prendre en compte des covariables (sexe, traitement, effets environnementaux). D'un autre côté, il y a des faiblesses importantes : on ne peut connaître la localisation précise du QTL (il est lié à un marqueur, mais on ne connaît pas la distance entre le QTL et le marqueur), on sous-estime les effets réels du QTL (à moins que la distance entre le marqueur et le QTL soit nulle), les individus pour lesquels il manque le génotype au marqueur sont écartés de l'analyse et finalement une faible densité en marqueurs diminue énormément le pouvoir de détection du QTL (Lander & Botstein, 1989; Broman, 2001).

### Méthode de cartographie par intervalle

Lander et Botstein (1989) ont corrigé ces faiblesses en développant la méthode de cartographie par intervalle, qui est à ce jour la plus utilisée. Il est cette fois nécessaire de construire une carte génétique. Pour les croisements F2 et N2, la position des marqueurs SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*, généralement des marqueurs microsatellites) ou des SNP polymorphes est déterminée en fonction de la recombinaison observée dans la population expérimentale (Crow, 1990). La distance génétique entre deux marqueurs est statistique et son unité est le centiMorgan (cM). Dans le cas particulier de certaines populations dérivées de F2 ou de N2, des cartes à haute densité en marqueurs sont disponibles dans des bases de données publiques et la position physique (en paire de bases, pb) des marqueurs est déterminée grâce aux données de séquençage des génomes murins (Williams et al, 2001). Le génotypage doit nécessairement être dénué d'ambiguïté. En effet, la liaison d'un QTL au caractère d'intérêt est toujours basée sur la coségrégation des allèles des marqueurs avec la distribution phénotypique dans la population recombinante (Soller et al, 1976). Une erreur dans le génotypage augmente donc l'occurrence d'erreurs de type I (faux-positifs) et de type II (faux-négatifs).

La méthode de cartographie par intervalle prend en compte la recombinaison méiotique et nécessite de calculer la probabilité qu'un QTL ait un certain génotype en

fonction de la distance entre les marqueurs flanquants et du génotype de ces derniers (Lander & Botstein, 1989; Broman, 2001). On assume que la distribution du phénotype pour chaque génotype du QTL est gaussienne et donc caractérisée par deux paramètres : la moyenne (propre à chaque génotype du QTL) et la déviation standard (commune à tous les génotypes du QTL). Pour un QTL à une position donnée, on peut donc décrire la probabilité  $Pr$  des données observées qui tient compte des différentes moyennes et de la déviation standard à cette position. Il est possible d'estimer le maximum de vraisemblance des paramètres (moyennes et déviation standard) pour chaque génotype, c'est-à-dire les valeurs pour lesquels  $Pr$  atteint son maximum. Finalement, on calcule le logarithme de la vraisemblance de privilégier une liaison entre le QTL et le caractère mesuré : le LOD (*Logarithm of the odds*). Le LOD est le logarithme décimal du rapport de  $Pr$  (probabilité de la présence d'un QTL à la position donnée) sur la probabilité de l'absence de QTL dans le génome. Plus le LOD est élevé, plus l'existence d'un QTL est vraisemblable. Ce calcul est effectué en tout point du génome et les valeurs sont reportées sur un graphique sous forme de courbe, la valeur maximale au pic correspondant à la position probable du QTL (Figure 7, page 72). Plusieurs algorithmes spécialisés équivalents ont été développés afin d'utiliser la méthode de cartographie par intervalle : algorithme EM (Lander & Botstein, 1989), méthode de Haley et Knott (Haley & Knott, 1992) ou méthode par répartition (Sen & Churchill, 2001).

La cartographie par intervalle permet aussi de considérer les interactions entre plusieurs QTL. Il est donc possible d'identifier des loci qui n'ont aucun effet individuellement mais qui ont un impact sur le phénotype dans le contexte d'une interaction. Plusieurs algorithmes ont été développés afin de déterminer ce type d'interaction (Zeng, 1993; Jansen, 1993; Kao et al, 1999; Sen & Churchill, 2001), bien que seule l'utilisation de lignées congéniques permette de l'établir factuellement (Deng, 2007).

## Significativité de la liaison et intervalle de confiance

Une fois la cartographie par intervalle effectuée, il faut s'assurer qu'un pic avec un LOD élevé (autrement dit une liaison) est crédible. En effet les erreurs de type I (on détecte un QTL alors qu'il n'y en a pas dans le génome) sont susceptibles d'être plus fréquentes lorsqu'un grand nombre de marqueurs est utilisé, et les erreurs de type II (on ne détecte pas de QTL alors qu'il y en a au moins un dans le génome) lorsque le génome étudié est grand (Lander & Botstein, 1989). Sous l'hypothèse qu'il n'y a pas de QTL, une valeur seuil est définie par le fait que la valeur du test statistique doit dépasser le seuil avec une probabilité de ne pas dépasser une valeur nominale  $\alpha$ . Si le coût d'un faux-positif n'est pas important, des seuils bas peuvent être obtenus avec  $\alpha = 0.10$  ou  $\alpha = 0.20$ . Si les faux-positifs sont une préoccupation sérieuse, des seuils plus stringents tels que  $\alpha = 0.01$  ou  $\alpha = 0.001$  sont désirés (Doerge & Churchill, 1996). Pour résoudre ce problème, une série de critères a été énoncée pour correction après tests multiples dans un criblage de génome : une liaison très significative correspond à  $\alpha = 0.001$ , significative à  $\alpha = 0.05$  et suggestive à  $\alpha = 0.63$ , tous ces critères correspondant à une probabilité de 1%, 5% et 63% respectivement que la détection du QTL par criblage génomique soit due au hasard (Lander & Kruglyak, 1995). En plus de ces critères, des valeurs seuils de LOD ont été proposées, basées sur des approximations conservatrices valides uniquement dans le cas de croisements spécifiques F2 ou N2 analysées avec une densité infinie de marqueurs génétiques (Lander & Kruglyak, 1995). Cependant, des tests de permutation représentent une approche plus générale pour obtenir des valeurs seuils ajustées pour un test multiple dans un criblage de génome particulier (Churchill & Doerge, 1994; Doerge & Churchill, 1996). Dans un tel test, des criblages sont répétés sur des versions permutées des données analysées. En respectant les critères sur l'occurrence de faux-positifs énoncés par Lander et Kruglyak, il est ainsi possible de calculer des seuils de LOD suggestifs ou significatifs à partir des données elles-mêmes (Figure 7, page 72).

Un débat demeure au sujet de l'estimation de l'intervalle de confiance pour localiser un QTL. Le pic de LOD étant calculé à partir d'un rapport de probabilités, il est nécessaire

de valider statistiquement sa position. Il est admis qu'un intervalle de confiance à 95% (la probabilité que le QTL soit effectivement dans cet intervalle est de 95%) est suffisant, bien qu'il soit conseillé d'être plus stringent si l'objectif est d'isoler le QTL dans une lignée congénique (Manichaikul et al, 2006). Plusieurs méthodes ont été proposées :

1. Le *bootstrap* non paramétrique est une méthode d'inférence statistique basée sur le rééchantillonnage des données avec remplacements possibles (des génotypes peuvent manquer ou être présents plusieurs fois dans les données rééchantillonées). La position du QTL est estimée sur la base de ces nouvelles données, puis le processus est répété un grand nombre de fois. Un intervalle de confiance à 95% contient ainsi 95% des positions du QTL estimées à partir des calculs répétés du *bootstrap* (Visscher et al, 1996). Cette méthode semble toutefois être peu fiable dans le cas particulier d'une cartographie de QTL (Manichaikul et al, 2006).
2. L'approche bayésienne est une autre inférence statistique basée sur des calculs de probabilités conditionnelles, dans lesquelles l'observation d'un QTL à une position donnée modifie la probabilité de l'observer de nouveau à cette même position (Sen & Churchill, 2001). Il en résulte une distribution des positions probables du QTL, qui semble être robuste quelque soit la taille de la population, la densité en marqueurs et l'effet du QTL (Manichaikul et al, 2006).
3. Le saut de LOD a le mérite de ne pas nécessiter de calculs élaborés puisqu'il consiste à retrancher une valeur fixe de LOD (saut de 1 à 2) au pic de la courbe et à considérer les positions aux intersections avec la courbe comme les bornes de l'intervalle de confiance (Figure 7, page 72). La valeur du saut de LOD doit être ajustée en fonction de la taille de la population, de la densité en marqueurs et de l'effet du QTL (Manichaikul et al, 2006).

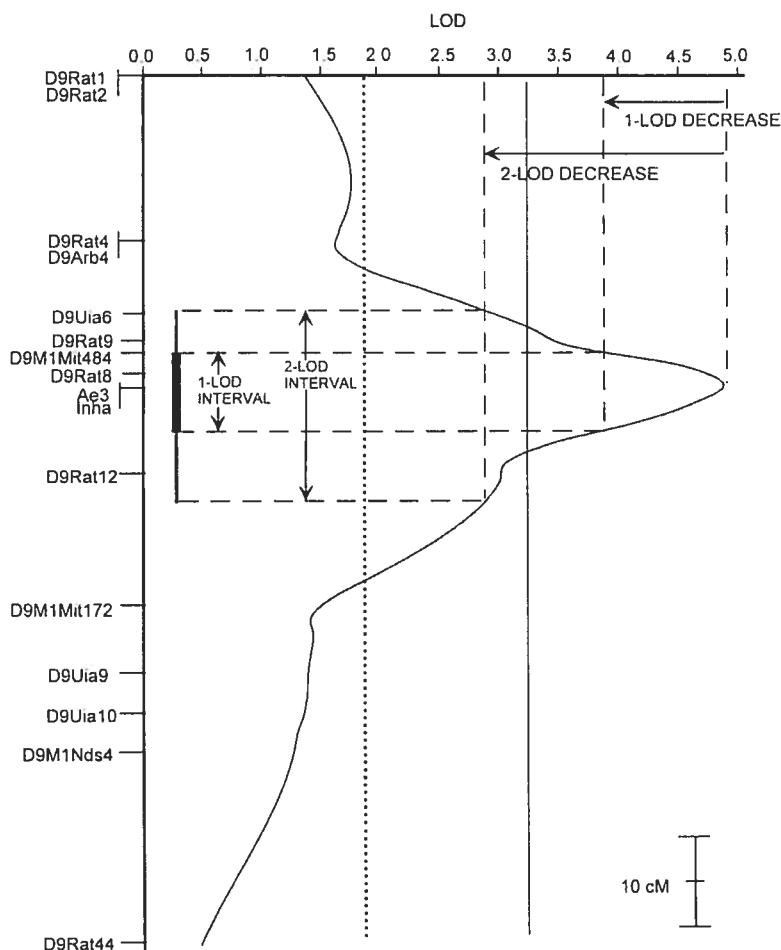
Il semble qu'une approche bayésienne ou celle du saut de LOD soient plus appropriées que la méthode par *bootstrap* (Manichaikul et al, 2006).

## Cartographie sommaire

La cartographie sommaire (*coarse mapping*) est la localisation d'un QTL sur une portion de chromosome, généralement dans un intervalle de 10 à 30 cM (Complex Trait Consortium, 2003). La majorité des QTL physiologiques et comportementaux détectés à ce jour dans une population recombinante F2 ont un effet de l'ordre de 5%, c'est-à-dire qu'ils sont responsables d'environ 5% de la variance totale du phénotype. Augmenter la densité de marqueurs améliore la probabilité de cartographier des QTL, mais n'apporte pas une meilleure résolution pour localiser le ou les gène(s) causal(aux) (Darvasi et al, 1993). Il en va de même pour le nombre d'animaux : il y a plus de 99% de chance de cartographier des QTL avec un effet de 5% à l'aide de 800 animaux (Flint et al, 2005), mais utiliser 1000 individus ne réduira pas l'intervalle de confiance à moins de 10 cM (Darvasi & Soller, 1997). En conséquence, une expérience standard avec une population F2 nécessiterait 300-400 animaux génotypés avec une centaine de marqueurs (espacés d'environ 20 cM) pour détecter des QTL ayant un effet de 5% et plus (Johan, 1992; Flint et al, 2005).

Il a aussi été montré que si la mesure du phénotype doit être faite pour tous les animaux, il n'est nécessaire de génotyper que 25% des individus aux extrémités de la distribution phénotypique afin de conserver un maximum de variance génétique (Darvasi & Soller, 1992; Sen et al, 2005). Les stratégies d'élaboration des croisements F2 ou N2, de leur phénotypage et de leur génotypage peuvent être modélisées afin d'optimiser les études en termes de coûts et d'information (Sen et al, 2005; Sen et al, 2007).

Comme la cartographie de QTL est basée sur la distribution du phénotype dans la population recombinante et non directement sur les différences entre les souches parentales, il n'est pas rare de révéler des QTL transgressifs (ou cryptiques) dont l'allèle délétère provient de la lignée parentale utilisée comme contrôle, ou inversement (Moore & Nagle, 2000). Ceci s'explique par la nature polygénique des caractères complexes. Le contraste phénotypique observé entre les souches parentales S (sensible) et R (résistant) est la résultante des interactions entre plusieurs QTL et l'environnement. Cependant, tous les



**Figure 7 :** Courbe de LOD, seuils statistiques et intervalles de confiance. La carte génétique du chromosome (en cM) est en abscisse. La ligne pointillée à LOD = 1.9 est le seuil de suggestivité ( $p < 0.63$ ), la ligne pleine à LOD = 3.3 est le seuil de significativité ( $p < 0.05$ ). Le pic de la courbe (LOD = 4.9) indique la position d'un QTL significativement lié au phénotype d'intérêt. Deux intervalles de confiance estimés par des sauts de 1 et 2 LOD sont représentés. Adapté de Rapp (2000).

facteurs génétiques de la lignée S ne contribuent pas systématiquement au phénotype “sensible”, et inversement.

### Confirmation de la liaison

La confirmation de l'existence d'un QTL à l'aide de plusieurs études indépendantes est recommandée avant d'aller plus avant dans l'identification du (ou des) gène(s) causal(aux) (Lander & Kruglyak, 1995; Complex Trait Consortium, 2003). Ceci peut être effectué en testant uniquement le chromosome d'intérêt dans d'autres croisements expérimentaux (Lander & Kruglyak, 1995), voire en comparant les résultats de la cartographie sommaire à ceux publiés par d'autres investigateurs (Llamas et al, 2005b).

Une autre méthode consiste à développer des lignées congéniques dans lesquelles le locus d'intérêt (correspondant à l'intervalle de confiance du QTL) d'une des souches parentales (donneuse) est introgressé dans le génome de l'autre lignée parentale (receveuse), et réciproquement (Snell, 1948). De telles souches peuvent être générées en effectuant 5 rétrocroisements successifs par la méthode des congéniques rapides (*speed congenics*). Il s'agit de sélectionner les individus ayant le locus d'intérêt de la souche donneuse dans un génome enrichi par la souche receveuse à l'aide de marqueurs à chaque génération (Markel et al, 1997; Wakeland et al, 1997). Pour valider l'existence du QTL, les souches congéniques doivent montrer des différences quantitatives pour le caractère d'intérêt lorsqu'elles sont comparées aux souches receveuses et ainsi révéler expérimentalement une relation de cause à effet (Complex Trait Consortium, 2003). L'avantage des lignées congéniques est qu'il est possible de mesurer le phénotype d'intérêt ou des phénotypes complémentaires chez plusieurs individus génétiquement identiques (Boutin-Ganache et al, 2002; Souzeau et al, 2006; Deng, 2007). Un autre avantage est que la liaison statistique établie lors de la cartographie génétique devient une liaison physique dans les animaux congéniques.

La limitation principale des lignées congéniques est surtout due à la nature même du QTL. En effet, les résultats d'une cartographie génétique ne sont pas forcément reproductibles dans différents croisements. L'analyse de liaison ne révèle que les QTL qui expliquent les différences observées entre deux souches parentales données. Par exemple, un QTL peut être détecté dans un croisement AxB mais pas dans un croisement AxC. De plus, les effets du QTL peuvent ne pas être détectables dans un autre fonds génétique à cause des effets épistatiques d'autres loci (Lander & Schork, 1994). Cette dernière situation, illustrée dans une lignée congénique où le QTL est introgressé dans un nouveau génome, est semblable aux caractères mendéliens pour lesquels le phénotype est visible ou non selon le contexte génomique (Marian, 2002; Heydemann et al, 2007).

### Cartographie fine

Une distance de 1 cM chez la souris ou le rat équivaut en moyenne à 1 Mb ( $1 \times 10^6$  pb). Selon la densité génique très variable d'une région du génome à une autre, on peut trouver une vingtaine de gènes dans cet intervalle, parfois moins, souvent plus (Flint et al, 2005). Le but est de réduire au maximum le nombre de gènes présents dans la région du QTL afin de faciliter l'identification du bon candidat. Afin de réduire l'intervalle de confiance à moins de 5 cM, plusieurs solutions sont envisageables.

Dans le cas particulier d'un QTL isolé avec un effet majeur, une augmentation de la densité en marqueurs dans la région ciblée permettra de préciser la position du QTL. Cependant, il est recommandé d'augmenter le nombre de recombinaisons dans la région du QTL. Ceci est possible en utilisant des lignées d'inter-croisements avancés dans lesquelles des croisements sont effectués au hasard à chaque génération à partir d'une population F2. Au bout de 20 générations (F20), il est théoriquement possible de réduire un intervalle de 20 cM à 2 cM (Darvasi & Soller, 1995). Les inconvénients majeurs de cette technique sont la durée nécessaire à l'obtention d'une population (en général F5 à F8) et la nécessité

d'utiliser un grand nombre de marqueurs puisque le génome est très fragmenté (Demant, 2003).

Une autre méthode plus efficace consiste à dériver des sous-lignées congéniques à partir d'une lignée congénique initiale (Rapp, 2000). En effet, la lignée initiale contient une portion de chromosome relativement importante (20 à 40 cM) de la souche donneuse afin de s'assurer que le QTL soit bien inclus. Il est donc intéressant de fragmenter le locus et de localiser plus précisément le QTL dans l'ensemble des sous-lignées congéniques (Deng, 2007). Cependant, il est difficile de réduire la région introgressée à moins de 1 cM à moins d'un coup de chance, un évènement de recombinaison post-méiotique n'ayant qu'une probabilité de 1% dans un intervalle de 1 cM (Rapp, 2000).

### Validation de gènes candidats

La causalité est un concept central de la génétique, le but étant de démontrer qu'une mutation dans un gène donné explique les variations phénotypiques observées. La causalité, telle que citée dans la littérature épidémiologique, peut se définir de 5 manières non mutuellement exclusives (Parascandola & Weed, 2001) :

1. Réalisation : la cause est la condition qui joue un rôle essentiel dans la réalisation de l'occurrence de l'effet. En d'autres termes la cause affecte ou altère le résultat.
2. Nécessaire : une cause nécessaire est une condition sans laquelle il n'y a pas de production de l'effet.
3. Suffisante : lorsque la cause est présente, l'effet doit se produire.
4. Probabiliste : une cause probabilistique augmente la probabilité que l'effet se produise. Elle n'a besoin d'être ni nécessaire, ni suffisante.

5. Contrefactuelle : une cause contrefactuelle fait une différence dans le résultat quand elle est présente *versus* quand elle est absente, toute chose étant constante par ailleurs. Elle n'a besoin d'être ni nécessaire, ni suffisante.

En génétique des caractères mendéliens, on parle le plus souvent de cause suffisante et/ou nécessaire. Dans le cas de la génétique des maladies complexes, certains ont proposé de se référer à une cause probabiliste et/ou contrefactuelle (Page et al, 2003). Ces définitions offrent l'avantage d'être plus inclusives, de nécessiter moins d'hypothèses (la parcimonie étant un concept clé en sciences) et de tenir compte de la distribution d'un phénotype quantitatif. Dans ce cadre théorique, la causalité entre un polymorphisme génétique et un caractère complexe ne sera prouvée qu'au terme d'une accumulation systématique d'évidences expérimentales : mettre en évidence des variations dans la séquence d'un gène candidat, montrer que le polymorphisme conduit à une modification de fonction et/ou d'expression de la protéine correspondante *in vitro*, démontrer que cette mutation fonctionnelle et/ou structurale induit des changements quantitatifs au niveau du caractère d'intérêt. Ce dernier point nécessite l'utilisation de modèles animaux dans lesquels le gène peut être surexprimé par transgénèse, inactivé, remplacé par un variant allélique ou régulé par des moyens pharmacologiques. Les modèles murins sont utilisés préférentiellement afin de respecter les caractéristiques pathophysiologiques d'une perturbation dans un cœur de mammifère (Yutzey & Robbins, 2007). Cependant, la génomique comparative permet de considérer des modèles alternatifs (invertébrés comme la drosophile, ou vertébrés comme le poisson-zèbre et le xénophage) dans lesquels les méthodes d'ingénierie génétique sont souvent plus simples et rapides (Stainier, 2001; Bier & Bodmer, 2004; Warkman & Krieg, 2007).

L'utilisation de sous-lignées congéniques a mené à l'identification de gènes candidats par clonage positionnel (Olofsson et al, 2003; Deng, 2007). En particulier, l'intervalle a pu être réduit à 300 kb dans une étude sur un modèle de rat de l'arthrite rhumatoïde. Deux gènes sont localisés dans cet intervalle minimum, dont la fonction ne semblait *a priori* pas reliée à la maladie étudiée. Le polymorphisme causatif a finalement

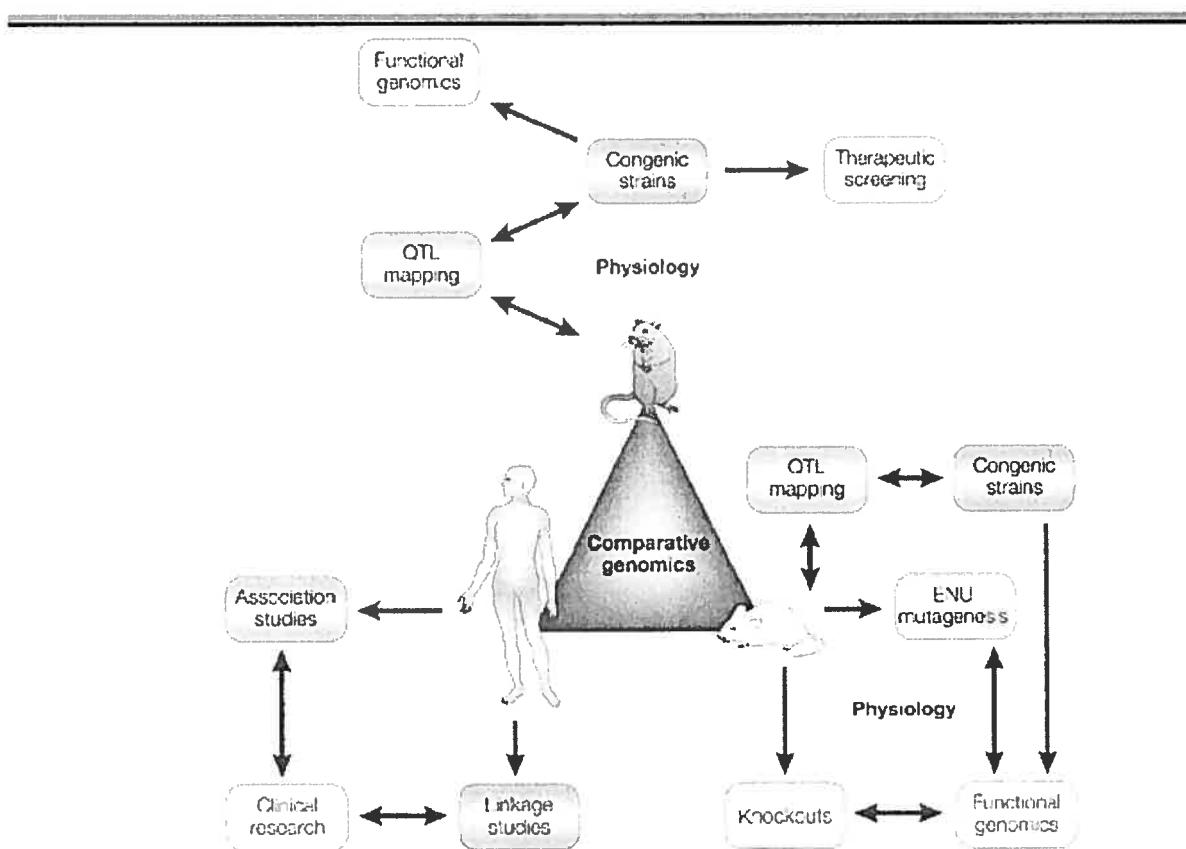
été identifié dans *Ncf1*, gène codant pour une sous-unité du complexe d'oxidation du NADPH qui produit des radicaux libres en réponse aux infections. Bien que le rôle de cette protéine dans l'arthrite rhumatoïde ne soit toujours pas compris, les investigateurs ont malgré tout pu prouver une relation de causalité (Olofsson et al, 2003). Finalement, des études subséquentes ont permis d'identifier d'une nouvelle classe de traitements de l'arthrite rhumatoïde (Hultqvist et al, 2006).

Cependant, même s'il est recommandé de réduire au maximum le locus, il n'existe aucune méthode standard pour identifier un gène candidat. Quelques rares études ont pu mener à l'identification de candidats directement à partir des résultats de la cartographie sommaire, en s'appuyant sur la présence dans la région du QTL de gènes dont la fonction était déjà décrite (Korstanje & Paigen, 2002). Par exemple au laboratoire, une mutation dans le promoteur du gène *Nppa* (codant pour le précurseur de l'ANF) a été identifiée sur la base de la localisation du gène dans l'intervalle de confiance d'un QTL lié à la MVG, de son rôle de biomarqueur de l'HVG et de sa fonction dans la régulation de la MVG (Deschepper et al, 2001). Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de valider ce gène candidat (Deschepper et al, 2001; Boutin-Ganache et al, 2002; Zahabi et al, 2003), ainsi que des modèles de transgénèse ou d'inactivation génique élaborés par d'autres investigateurs (John et al, 1995; Oliver et al, 1997; Chusho et al, 2000; Knowles et al, 2001; Kishimoto et al, 2001; Holtwick et al, 2003).

Les modèles animaux peuvent permettre des avancées importantes dans la connaissance des maladies complexes humaines, dont l'identification et la validation de gènes candidats morbides. Cependant, le rat et la souris ne reflètent pas toujours, ou ne développent pas forcément, tous les symptômes cliniques humains. De plus, les études en génétique des caractères complexes chez les animaux se limitent souvent à l'analyse de deux souches parentales consanguines. Dans ces conditions, un investigator ne peut prétendre qu'un modèle animal restreint possède la diversité génétique nécessaire pour saisir la complexité d'un phénotype. Donc même si un modèle animal peut illustrer certains

aspects d'une maladie complexe humaine, il ne peut en aucun cas la récapituler complètement (Jacob & Kwitek, 2002).

L'accumulation et l'intégration des données physiologiques et génétiques dans les trois organismes que sont le rat, la souris et l'humain permettent toutefois de mieux appréhender les maladies humaines (Figure 8 :, ci-dessous) (Demant, 2003). En particulier, un nombre croissant de méthodes et d'outils bioinformatiques permet de disséquer les bases



**Figure 8 :** Intégration des données provenant du rat et de la souris pour étudier les maladies humaines. Adapté de Jacob & Kwitek (2002).

génétiques des caractères complexes en comparant les génomes du rat, de la souris et de l'humain (Kwitek et al, 2001; Pennacchio & Rubin, 2003; DiPetrillo et al, 2005). Quelques unes de ces méthodes sont (DiPetrillo et al, 2005) :

1. La génomique comparative, qui permet d'identifier des régions chromosomiques où la synténie est conservée afin de vérifier que des QTL sont concordants d'une espèce à l'autre. La résolution de cette méthode est de 10 à 20 Mb.
2. L'analyse de croisements combinés recode l'information génétique à partir de plusieurs croisements qui ont un QTL en commun. Les génotypes des différents croisements sont combinés afin de créer un génotype de résistance et un génotype de sensibilité, et une nouvelle analyse de cartographie est effectuée. La résolution de cette méthode est de 10 à 20 Mb.
3. L'analyse d'haplotypes spécifiques d'un intervalle détecte les régions identiques par descendance dans les intervalles de confiance d'un même QTL identifié dans plusieurs croisements. La résolution de cette méthode est inférieure à 5 Mb.
4. L'analyse d'haplotypes à travers le génome associe les blocs d'haplotypes conservés et le phénotype en comparant plusieurs lignées consanguines. La résolution de cette méthode est inférieure à 5 Mb.
5. La comparaison de séquences permet de chercher des polymorphismes (codants ou de régulation de l'expression) dans l'intervalle du QTL en utilisant les données de séquençage spécifiques d'une lignée. La résolution de cette méthode est de 10 à 20 gènes.
6. La comparaison d'expression de gènes permet d'identifier des gènes dans les banques de données d'expression pour lesquels l'expression est soit ciblée dans un tissu d'intérêt, soit différentielle entre deux souches d'intérêt. La résolution de cette méthode est de 10 à 20 gènes.

## Hypothèses et projet de doctorat

La masse cardiaque est un caractère complexe sous le contrôle de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Je fais l'hypothèse que les méthodes de cartographie génétique des caractères complexes, appliquées à des croisements expérimentaux de rats ou de souris de laboratoire, permettront d'isoler des loci génomiques impliqués dans la régulation de la masse cardiaque ou de systèmes biologiques qui influencent la masse cardiaque (pression artérielle, taille des cardiomyocytes). D'autre part, un certain nombre de différences génétiques et physiopathologiques ont été observées entre les sexes en ce qui concerne l'hypertrophie cardiaque. Je fais l'hypothèse additionnelle que l'analyse systématique et simultanée de phénotypes cardiaques chez les mâles et les femelles permettra de mettre en évidence une architecture génétique différentielle entre les sexes. Enfin, je fais l'hypothèse que l'analyse simultanée de la morphologie des cardiomyocytes et de la géométrie ventriculaire permettra de cartographier des déterminants génétiques communs aux deux caractères.

Le but de mon projet de doctorat était d'améliorer la compréhension des bases génétiques de la régulation de la masse cardiaque et/ou de la taille des cardiomyocytes. Plusieurs travaux mutuellement complémentaires ont été réalisés dans ce sens.

En effectuant une analyse de liaison génétique sur le chromosome 5 à partir d'un croisement F2 entre les souches consanguines de rats WKY et WKHA, mon laboratoire a identifié un QTL majeur lié à la fois à la masse cardiaque et à la concentration ventriculaire en ANF chez les mâles, et uniquement à la concentration ventriculaire en ANF chez les femelles. Ces résultats, en plus de ceux d'études complémentaires, ont montré que des variants alléliques du gène *Nppa* (codant pour le précurseur de l'ANF et localisé dans l'intervalle de confiance du QTL) étaient responsables des différences de masse cardiaque entre les rats mâles de ces 2 souches (Deschepper et al, 2001). D'autre part, des analyses morphologiques de cardiomyocytes isolés à partir de coeurs de mâles adultes ont montré que le même locus est lié à des différences de largeur de cardiomyocytes, leur longueur

étant semblable entre les 2 souches (Boutin-Ganache et al, 2002; Deschepper et al, 2002b). J'ai complété la cartographie des génomes entiers des 332 femelles et une partie des 351 mâles issus du même croisement F2 pour les QTL liés à la MVG. Les résultats publiés sont présentés dans le chapitre 2 (Llamas et al, 2005b). J'ai par la suite créé des lignées congéniques réciproques pour un locus d'intérêt sur le chr 17 dont l'analyse est en cours.

Tel que décrit dans l'introduction, la régulation de la MVG dépend en partie de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux. Parmi ces derniers, on retrouve plusieurs maladies qui augmentent le risque de développer une HVG, incluant l'hypertension artérielle. Certaines formes d'hypertension sont monogéniques mais la plupart des humains souffrent surtout d'hypertension essentielle ou polygénique, considérée alors comme une maladie complexe (Hamet et al, 1998). Au cours d'une collaboration, j'ai effectué l'analyse d'un croisement F2 entre deux souches de rats normotendus afin de mettre en évidence des QTL liés aux différentes composantes de la PA. Les résultats publiés sont présentés dans le chapitre 3 (Llamas et al, 2006).

Nous avons utilisé le modèle de rat parce qu'il présente certains avantages expérimentaux pour les investigations cardiovasculaires. Cependant, des études ont montré que les mâles de la souche consanguine de souris C57BL/6J présentaient des caractéristiques d'HVG lorsque comparés aux A/J, en présence d'une PA normale et comparable (Hoit et al, 2002; Deschepper et al, 2004). Ces résultats présentent plusieurs intérêts particuliers par rapport à nos études précédentes chez le rat. Il est en effet possible d'exploiter les souches recombinantes consanguines AXB et BXA dérivées des C57BL/6 et des A/J pour effectuer une cartographie de QTL, ce qui nous offre un certain nombre de bénéfices. Premièrement, le génotype des lignées (plusieurs milliers de marqueurs microsatellites et SNP) est disponible dans des bases de données publiques. Deuxièmement, la précision des mesures phénotypiques peut être augmentée en les répétant dans chaque souche sur des individus génétiquement identiques. Troisièmement, l'analyse de phénotypes complémentaires augmente le pouvoir statistique pour détecter des QTL

(Deschepper et al, 2002a). En particulier il a été montré qu'entre deux souches de rat, les différences dans la taille des cardiomyocytes isolés étaient amplifiées par rapport aux différences observées au niveau de la MVG (Deschepper et al, 2002b). Or l'utilisation des souches recombinantes permet d'avoir accès à la fois à la masse cardiaque et à la taille des cellules cardiaques isolées en utilisant plusieurs individus génétiquement identiques. Il existe aussi des lignées dérivées des C57BL/6J et A/J dans lesquelles un chromosome de la souche receveuse a été substitué par le même chromosome de la souche donneuse (Nadeau et al, 2000; Singer et al, 2004). Ces souches consomiques offrent la possibilité d'étudier en détail l'impact de chromosomes particuliers (incluant les chromosomes sexuels) sur un caractère quantitatif, ainsi que de pouvoir créer très rapidement des lignées congéniques. Pour finir, le modèle de souris a l'avantage de faciliter l'extension ultérieure des résultats génétiques par des expériences de transgénèse ou d'inactivation génique.

J'ai donc mesuré une variété de phénotypes cardiovasculaires dans 24 souches recombinantes AXB et BXA : masse cardiaque, taille des cardiomyocytes isolés et variables de la pression sanguine par télémétrie. Les résultats de l'analyse de cartographie de QTL sont présentés dans le chapitre 4 et sont présentement sous presse (Llamas et al, 2007). L'article a de plus été choisi pour illustrer la couverture du journal *Physiological Genomics* (annexe 3). Pour finir, cet article a fait l'objet d'une revue éditoriale écrite par Gary Churchill, présentée dans l'annexe 4 (Churchill, 2007).

Un des résultats majeurs de l'article précédent est la mise en évidence du rôle majeur du chr Y des souris C57BL/6J dans la régulation de la taille des cellules cardiaques. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, j'ai étudié les effets du chr Y seul ou combinés à ceux des androgènes sur la taille des cardiomyocytes isolés de souris. Tous les résultats supplémentaires sont présentés dans le chapitre 5.



## **Chapitre 2 : Cartographie génétique de QTL liés à la masse cardiaque dans un croisement expérimental de rats consanguins normotendus.**

*When you have eliminated all which are impossible, then whatever remains, however improbable, must be the truth.*

Sir Arthur Conan Doyle (The adventure of the blanched soldier)



## Contribution des auteurs à la préparation de l'article 1

Sylvie Picard et Christian F. Deschepper ont générée les populations de rats F1 et F2. Ils ont ensuite effectué les mesures phénotypiques sur les souches parentales, les F1 et les F2. Zhibin Jiang a extrait et purifié l'ADN des mâles F2, puis il a commencé le génotypage des animaux qui a été complété par Marie-Line Rainville et moi-même. J'ai extrait et purifié l'ADN des femelles F2 puis j'ai effectué le génotypage de ces animaux. L'ensemble de ces données a servi aux analyses dont les résultats sont présentés dans les figures 1, 2, 3 et 4 et le tableau 2.

J'ai effectué la totalité des analyses statistiques présentées dans l'article, incluant la cartographie de QTL chez les mâles et les femelles F2 (Figures 1, 2, 3, 4 et tableau 2).

Sylvie Picard et moi-même avons isolé les cardiomyocytes à partir des cœurs de rats. J'ai ensuite effectué les mesures par vidéomicroscopie (Figure 5).

J'ai effectué la revue de littérature résumée dans le tableau 1 et la recherche dans les bases de données génomiques présentée dans le tableau 3. J'ai finalement écrit l'article sous la supervision de Christian F. Deschepper.

**Article 1 : Distinct QTLs are linked to cardiac left ventricular mass in a sex-specific manner in a normotensive inbred rat intercross**

Authors: Bastien Llamas, Zhibin Jiang, Marie-Line Rainville, Sylvie Picard, Christian F. Deschepper<sup>†</sup>

Running head: Linkage of sex-specific loci to left ventricular mass

Address: Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7, and Université de Montréal

<sup>†</sup> Corresponding author: Phone: (514) 987 5759

Fax: (514) 987 5585

E-mail: [REDACTED]

## Abstract

Genetic mapping of the progeny of a F2 intercross between WKY and WKHA rats had previously allowed us to detect male-specific linkage between locus *Cm24* and left ventricular mass index (LVMI). By further expanding that analysis, we detected additional loci that were all linked to LVMI in a sex-specific manner despite their autosomal location. In males, we detected one additional locus (*Lvm8*) on chromosome 5 (lod = 3.4), the two loci *Lvm13* (lod = 4.5) and *Lvm9* (lod = 2.8) on chromosome 17, and locus *Lvm10* (lod = 4.2) on chromosome 12. The locus *Lvm13* had the same boundaries as locus *Cm26* previously reported by others using a different cross. None of these loci showed linkage to LVM in females. In contrast, we identified in females the novel locus *Lvm11* on chromosome 15 (lod = 2.8), as well as locus *Lvm12* (lod = 2.7) that had the same boundaries on chromosome 3 as locus *Cm25* detected previously by others using a cross of other normotensive strains. In prepubertal males, there were no differences in the width of cardiomyocytes from WKY and WKHA rats, but cardiomyocytes from WKHA became progressively wider than that of WKY as sexual maturation progressed. Altogether, these results provide evidence that distinct genes may influence LVMI of rats in a sex-dependent manner, maybe by involving sex-specific interactions of sex steroids with particular genes involved in the determination of LVMI and/or cardiomyocyte width.

**Keywords:** quantitative trait locus; genetics; linkage study; left ventricular mass; left ventricular hypertrophy; sex-specificity; rat.

## Introduction

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a major predictor of cardiovascular mortality and morbidity in humans (Levy et al. 1990; Devereux et al. 1994; de Simone et al. 2002). In hypertensive patients, regression of LVH is associated with reduction in cardiovascular events (Zhang et al. 2003), and recent evidence from clinical trials has indicated that LVH constitutes a legitimate target for treatment above and beyond blood pressure (BP) control (Sharp and Mayet 2002). However, it has also been recognized that individuals with comparable levels and duration of high BP may manifest different levels of end-organ injury (Cohn 1998). In the particular case of left ventricular mass (LVM), it appears that a major part of its variance is accounted for by genetic factors (Nunez et al. 1996; Verhaaren et al. 1991). The identity of these factors in humans has remained elusive, because LVM is a “complex quantitative trait” that is controlled by the interactions between a number of environmental and genetic factors, and genes responsible for such traits have been notoriously difficult to detect by classical genetic linkage analysis in humans (Altmüller et al. 2001). One useful alternative is to perform linkage studies in animal genetic crosses, as this approach may reveal candidate genes that can be later tested by association in human populations.

LVM index (LVMI) is the ratio of LV weight over whole body weight (BW). BP-independent quantitative trait loci (QTL) can either increase LVMI in normotensive individuals or amplify the effects of hypertension on LVMI. In genetic crosses, they are revealed as QTLs linked to LVMI without coincidental linkage to BP in the same cross. To date, the Rat Genome Database (RGD; <http://rgd.mcw.edu/>) has inventoried 13 BP-independent QTLs in crosses where at least one of the parental strains was hypertensive. These QTLs are now identified by the symbol *Cm* (for “cardiac mass”), and include *Cm3* and *Cm6* (Moreno et al. 2003), *Cm17-21* (Garrett et al. 2003), *Cm32-36* (Bilusic et al. 2004), *Cm22* (Innes et al. 1998) and *Cm26* (Tsujita et al. 2000) (Table 1). In addition, two other QTLs for LVMI have been identified in crosses performed with two normotensive parents, i.e. *Cm25* (Sebkhi et al. 1999) and *Cm24* (Deschepper et al. 2001; Boutin-Ganache

et al. 2002). Of note, many of these QTLs had been identified previously by RGD with different symbols (as indicated in Table 1 in the “synonyms” column).

*Cm24* has been detected by us in a cross between Wistar-Kyoto (WKY) and WKY-derived hyperactive (WKHA) rats. WKHA constitutes a recombinant inbred strain derived from phenotypic selection and repeated inbreeding of the progeny of a cross between WKY and spontaneously hypertensive rats (SHR) (Hendley and Ohlsson 1991). We have shown by telemetry recording that these 2 strains had identical and normal levels of BP, yet that LVMI as well as the width of cardiomyocytes were higher in WKHA rats than in their WKY counterparts (Deschepper et al. 2002). Genome scanning of the progeny of the WKYxWKHA F2 intercross revealed on chromosomal band 5q36 of *Rattus Norvegicus* chromosome 5 (RNO5) *Cm24* as major QTL that was linked simultaneously (and in an inverse fashion) to LVMI and LV concentration of atrial natriuretic peptide (ANP) (Deschepper et al. 2001; Boutin-Ganache et al. 2002). In the course of that study, identification of *Cm24* had been facilitated by the fact that linkage of that QTL to a trait associated with LVMI (i.e. LV concentration of ANP) was so strong (lod = 8.9) that the locus was already detectable after obtaining the genotypes of a relatively small subset (i.e. 74 individuals out of total of 345 individuals) of the male progeny (Deschepper et al. 2001). Although mapping of this locus was further refined and confirmed by genotyping all male and female individuals of the progeny with markers for RNO5 (Deschepper et al. 2001; Boutin-Ganache et al. 2002), genotyping of chromosomes other than RNO5 remained to be performed for all individuals from the progeny in order to exploit all information provided by the cross. Moreover, we had noticed that *Cm24* was linked to LVMI only in the male progeny of the WKYxWKHA cross despite the fact that it was linked to LV ANP concentration both in males and females (Boutin-Ganache et al. 2002). Consequently, in the event that we could identify other QTLs linked to LVMI, we were interested in testing whether the linkage would be sex-specific. Other previous studies on LVMI in rats had used only male individuals (Innes et al. 1998; Sebkhi et al. 1999; Tsujita et al. 2000; Moreno et al. 2003; Garrett et al. 2003; Bilusic et al. 2004). Finally, one additional utility of any QTL study is that replication of reported QTLs is an integral part of

the strategy toward verifying the significance of linkage signals, and that replication of a QTL by an independent group of investigators using a different sample population is a required step to obtain so-called “confirmed linkage” (Lander and Kruglyak 1995). In the event that we could detect additional QTLs, it was of interest to test whether their boundaries matched that of other QTLs reported as being linked to LVMI in crosses generated previously by others.

## Material and methods

### *Animals and genetic crosses*

The WKHA/Cfd rats originated from a colony maintained at the “Institut de recherches cliniques de Montréal” (IRCM), as registered with the Institute of Laboratory Animal Resources. WKY/Cfd rats also originated from a colony maintained at the IRCM and were derived from WKY/Cr parents obtained from Charles River (St. Constant, Quebec, Canada). All animals were used at 12 weeks of age for the purpose of these studies. The total progeny of 345 males and 332 females from a F2 intercross between WKHA and WKY rats was the same as that used previously for genotyping either the whole genome of a subset of animals from the population or one particular chromosome for all members of the population (Deschepper et al. 2001; Boutin-Ganache et al. 2002). For practical reasons, these animals were generated by 2 separate waves of breeding. For the first wave, male WKHA rats were mated to female WKY rats, and the resulting F1 animals were further mated randomly to generate 153 male and 198 female F2 rats. For the second wave (performed a few months later), male WKY rats were mated to female WKHA rats to produce F1 animals, then 146 male and 186 female F2 animals. This design represents a “reciprocal cross”, which ensures that sexual chromosomes of both parental origins are represented equally within the F2 population.

### *Animal procedures*

On the day of tissue collection, each animal was weighed for determination of whole BW. The rats were then killed by decapitation, and spleens and hearts were collected. Heart ventricles were dissected into right ventricle (without the septal wall) and left ventricle (LV; including the septal wall). Each part was blotted dry and weighed individually. LVMI was calculated by dividing the weight of LV by that of whole body

weight. The spleens were frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C for additional analysis.

### ***Microsatellite analyses***

Genomic DNA was obtained from frozen spleen samples from each animal using the DNeasy tissue kit (Qiagen, Mississauga, ON). Analysis of simple sequence length polymorphisms was carried out by polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic DNA with M13-tailed microsatellite markers labelled with either dye IRD700 or dye IRD800 (LiCor Biotechnology, Lincoln, NE, USA), similarly as described previously (Boutin-Ganache et al. 2001). The products were separated and analyzed using a LiCor 4200 DNA analysis system. Of note, this procedure represented an improvement vs. the manual technique that we had used in our previous studies (Deschepper et al. 2001), as it provided clearer resolution and better discrimination between alleles (Deschepper et al. 2001; Boutin-Ganache et al. 2001). Although we had reported previously that a panel of 80 markers provided coverage of all autosomes in the WKY/WKHA cross (Deschepper et al. 2001), one marker on RNO6 and one other on RNO16 no longer appeared as polymorphic between WKY and WKHA with the improved technique. As a result, we had only one polymorphic marker on RNO6 and no polymorphic marker on RNO16, and were unable to find other polymorphic markers despite extensive testing of published markers. Since at least 2 markers per chromosome are required to define intervals, RNO6 and RNO16 were excluded from the interval mapping linkage study.

### ***Genetic analyses***

Previous modeling studies have shown that for single trait studies, it is almost never useful to genotype more than the upper and lower 25% of a population (Darvasi and Soller 1992). Since we had observed that the LVMI values were distributed normally in both

male and female F2 rats, we selected the individuals that had the 25% highest and lowest LVMI values within each progeny for preliminary whole-genome scans, which amounted to 179 males and 168 female rats. We used our panel of 78 markers that were polymorphic between WKY and WKHA rats to cover all autosomes with the exception of RNO6 and RNO16 (see above). The defined intervals averaged  $17.2 \pm 13.5$  and  $18.9 \pm 10.8$  centimorgan (cM) (mean  $\pm$  SD) for females and males, respectively. Although it is usually recommended to use  $\sim 150$  markers defining intervals averaging  $\sim 10$  cM, the lower number of markers and longer intervals in the present study reflect the low rate of polymorphism between the WKY and WKHA strains (since one parental strain for the generation of WKHA was WKY, and the other one was SHR which derives from an ancestral stock that is shared by WKY as well). This panel of 78 markers comprises more polymorphic markers and covers more autosomes than a panel published previously by others for the same 2 strains (Courvoisier et al. 1997). We also calculated (assuming that the combined length all rat autosomes amount to 1,497 cM, and that the length of RNO6 and RNO16 is 45 cM and 85 cM, respectively, as reported in RGD) that the percentage of autosomes (excluding RNO6 and RNO16) that were covered with spacings  $< 20$  cM off markers amounted to 88%. Of note, it is likely that this panel of 78 markers does not result in a lack of sensitivity as compared to a larger set, since chromosomal regions not covered by a dense set of markers are likely to represent chromosomal regions that are identical between WKY and WKHA, and thus not informative.

Genotyping data were analyzed with Map Manager QTX (Manly and Olson 1999) in order to construct linkage maps. Linkage probability was then examined by interval mapping, using the Haley-Knott regression method (Haley and Knott 1992). Genome-wide significance thresholds were set, as suggested previously, at the  $p < 0.63$  ("suggestive"),  $p < 0.05$  ("significant") and  $p < 0.001$  ("highly significant") levels (Lander and Kruglyak 1995; Manly and Olson 1999). Threshold for values of the log-likelihood of the odds (lod) ratios were calculated on the basis of permutation tests performed on the data sets themselves (using 1000 permutations with  $p = 0.01$  in either male or female populations) (Churchill and Doerge 1994). For initial linkage analyses, lod scores and significance

thresholds were calculated without any assumption about the mode of heritability. For all QTLs reaching the suggestive level, the phenotypic data were grouped according to the origin of the allele closest to the peak of the lod curve, and corresponding data were analyzed by one-way ANOVA to determine the mode of inheritance (either additive or dominant/recessive). For each QTL, lod scores and significance thresholds were then recalculated on the basis of the appropriate model of inheritance. Confidence intervals (C.I.) were estimated by bootstrap analysis (Visscher et al. 1996). To estimate the contribution of each QTL to the total variance, additional genotyping was performed in order to assess for all 345 males and 332 females of the F2 intercross the allelic origin of markers belonging to those chromosomes where QTLs had been detected with the genome-wide analysis. These recalculations did not change the localization of any of the QTLs: the data were used to obtain a precise estimate of the contribution of each QTL to the total variance, but not to recalculate the significance of linkage since permutation tests require complete data from the whole genome. Finally, possible interactions between QTLs were investigated by two-dimensional, two-QTL genome scanning, as implemented in Map Manager QT (Manly and Olson 1999).

### *Isolation of adult cardiomyocytes*

For isolation of cardiomyocytes, hearts were rapidly removed from anesthetized WKY and WKHA rats previously injected intraperitoneally with 500 units heparin sulfate, and  $[Ca^{2+}]$ -tolerant cardiomyocytes were isolated by the Langendorff method (cardiac retrograde aortic perfusion), as described previously (Deschepper et al. 2002; Touyz et al. 1996). The cardiomyocytes were separated from non-cardiomyocytes by sedimentation on a 6% solution of bovine serum albumin, fixed for 30 min in 0.08 M phosphate buffer containing 1.5% glutaraldehyde, and rinsed with 0.15 M phosphate buffer. After being allowed to settle in Petri dishes, the cardiomyocytes were examined with a Zeiss Axiovert microscope connected to a video camera that allowed capture of the images as electronic files. Using the Northern Eclipse v. 6.0 software, about 100 cells ( $\pm 5$ ) from each animal

were analyzed for determination of cell length and cell surface. On the basis of these measurements, cell width was calculated as the surface/length ratio, as described previously (Deschepper et al. 2002).

## Results

### ***LVM, BW and LVMI in parental strains, F1 and F2 progeny***

We first verified that in the male and female F2 progenies, there was a correlation (as should be expected) between LVM and BW. The correlation was linear and significant ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1), with the values of the  $r^2$  correlation scores indicating that BW accounted for ~ 60% of the total variance of LVM in the male and female F2 populations. To adjust the values of LVM for the BW covariate, we therefore calculated LVMI (as performed in most studies assessing changes in LVM) for comparisons between individuals. LVMI in WKHA rats was significantly higher than in their WKY counterparts in male ( $2.61 \pm 0.14$  vs.  $2.51 \pm 0.10$ , mean  $\pm$  SD;  $P = 0.0028$ , Fig.1A) as well as in female rats ( $2.97 \pm 0.19$  vs.  $2.76 \pm 0.13$ , mean  $\pm$  SD;  $P = 0.0001$ , Fig.1B). The overall pattern of inheritance of the genes underlying LVMI in WKHA rats seemed to be dominant, since LVMI in the F1 progeny was similar to that in WKHA rats. The LVMI of the F2 progeny was distributed normally around the mean for both sexes (data not shown). Of note, mean BW was similar and not statistically different in WKY, WKHA and F2 animals (Fig. 1).

### ***Model-free detection of QTLs in the progenies***

A preliminary linkage map for LVMI was constructed on a model-free basis (i.e. without assumption about the mode of inheritance). It revealed that QTLs linked to LVMI in the male progeny (on RNO5, RNO12 and RNO17) were clearly distinct from those in the female progeny (on RNO3 and RNO15) (Fig. 2). To further test that QTLs linked to LVMI may not be due to artifactual changes of the value of LVMI by an isolated change in BW, we compared those results to a linkage analysis performed for BW. No significant peak was found in females, and one single significant peak ( $lod = 4.0$ ) was found in males centered around D1Mit7 on RNO1. The boundaries of that QTL overlapped with that of a QTL previously detected in a cross between SHR/Mol and BB/Ok rats (Kovács et al.

1998), and identified in the Rat Genome Database by the symbol *Bw20* (RGD; <http://rgd.mcw.edu/>). There was no QTL linked to BW on any of the chromosomes comprising a peak linked to LVMI.

#### ***Model-based analysis of QTLs linked to LVMI in the male progeny***

On RNO5, we detected (in addition to the *Cm24* locus reported previously (Deschepper et al. 2001)) a second peak on the lod curve (lod = 3.4) that was positioned closer to the centromere (Fig. 3 and Table 2). It reached the “significant” threshold and appeared to be independent from *Cm24* because there was no overlap of the C.I. of both QTLs. Of note, symbols used for QTLs linked to cardiac mass have recently been regrouped and renamed in RGD with the *Cm* symbol, replacing the previously used nomenclature that included *Lvm* (for “left ventricular mass”) and *Hw* (for “heart weight”). We chose to identify all QTLs reported in the present paper using the *Lvm* symbol, assuming that RGD will rename them later using the *Cm* symbol. Since QTLs previously identified in RGD with the *Lvm* symbol ranged from *Lvm1* to *Lvm7*, we named any additional QTL identified in the present study starting from *Lvm8*, which corresponded to the QTL distinct from *Cm24* on RNO5. On RNO17, we detected 2 peaks with non-overlapping C.I. (Fig. 3 and Table 2). Both QTLs (herein named *Lvm 9* and *Lvm13*) were linked to LVMI in an additive manner and were “transgressive”, meaning that high LVMI was associated with the WKY allele despite the fact that the LVMI of the parental WKY was lower than that of WKHA. *Lvm13* (lod = 4.5) was positioned at the telomeric end of the long arm of RNO17 and reached the “highly significant” level. The region covered by the C.I. of *Lvm13* was relatively small (4 cM), and matched closely with the C.I. of *Cm26* reported previously by others using a SHRxLEW cross (Tsujita et al. 2000). The other QTL on RNO17 (*Lvm9*, lod = 2.8) reached the “significant” level, and its C.I. had boundaries that matched that of a cardiac mass QTL that also mapped to BP using a LHxLN cross (Bilusic et al. 2004). Finally, one QTL (*Lvm10*) was detected on chromosome RNO12 (lod = 4.2) (Fig. 3 and Table 2). High LVMI was linked to the WKY

allele of *Lvm10* (meaning that it was also transgressive) in a dominant manner, and reached the “highly significant” level. Analysis of the combined allele effects for all loci did not reveal any QTL interactions in the male progeny.

#### ***Model-based analysis of QTLs linked to LVMI in the female progeny***

One QTL (designated *Lvm11*) was detected at the telomeric end of the long arm of chromosome RNO15 (*lod* = 2.8), was linked to LVMI in an additive manner (Fig. 4 and Table 2), and reached the “significant” level. One other transgressive QTL (designated *Lvm12*) was detected on chromosome RNO3 (*lod* = 2.7), with LVMI being linked to the WKY allele in a recessive manner. Its peak was centered on D3Wox9 and linkage reached the “significant” threshold level (*lod* = 2.7) (Fig. 4 and Table 2). The C.I. of *Lvm12* matched closely with that of QTL *Cm25* previously reported by others using a WKYxF344 cross (Sebkhi et al. 1999). Analysis of the combined allele effects for all loci did not reveal any QTL interactions in the female progeny.

#### ***Development-dependent changes in the width of cardiomyocytes isolated from male WKY and WKHA rats***

We have shown previously that cardiomyocyte width correlates closely with LV mass and morphology in WKY and WKHA rats (Deschepper et al. 2002; Boutin-Ganache et al. 2002). To test whether differences in the width of cardiomyocytes from WKY and WKHA rats may depend on sexual maturation, we measured the width of cardiomyocytes isolated from the hearts of male WKY and WKHA rats sacrificed either before puberty (at 4 weeks of age) or after the onset of sexual maturation (at 8 and 12 weeks of age) (Fig. 5). We found no differences in the width of cardiomyocytes isolated from the hearts of four week-old male WKY and WKHA rats. However, cardiomyocytes from male WKHA rats

became progressively and significantly wider than that from their WKY counterparts at 8 and 12 weeks of age.

## Discussion

The present study represents a continuation and completion of the genotyping of the same WKYxWKHA F2 intercross that had previously allowed us to identify *Cm24* on band 5q36 of RNO5 as a major QTL linked to LVMI in male rats. In addition to *Cm24*, the current study allowed us to identify in males 3 novel QTLs (*Lvm8* on RNO5, *Lvm9* on RNO17 and *Lvm10* on RNO12), as well as QTL *Lvm13* on RNO17 that had the same boundaries as the BP-independent QTL *Cm26* previously reported by others in males from an intercross between SHR and LEW rats (Tsujita et al. 2000). In female rats, none of the QTLs matched that found in males from the same cross, but we found the novel QTL *Lvm11* on RNO15, as well as one QTL on RNO3 (*Lvm12*) that had the same boundaries as that of QTL *Cm25* previously reported by others in males from an intercross between normotensive WKY and F344 rats (Sebkhi et al. 1999). It is unlikely that linkage of any QTL to LVMI could result from a QTL affecting BW independently of LVM, and thus artifactually affecting LVMI. Indeed, even in the event of a QTL affecting BW, the strong correlation between LVM and BW indicates that the change in BW would probably have a proportional effect on LVM. Of note, we detected (in males only) one QTL linked to BW. The boundaries of that QTL overlapped with that of QTL *Bw20* (previously detected in a cross between SHR/Mol and BB/Ok rats (Kovács et al. 1998)), but it was clearly distinct from any QTL linked to LVMI.

Within *Cm24*, there is now abundant functional and genetic evidence that *natriuretic peptide precursor A* (*Nppa*) is the gene that links to LVMI (Deschepper et al. 2001; Holtwick et al. 2003; Zahabi et al. 2003; Boutin-Ganache et al. 2002). *Lvm12* is a locus whose C.I. matched that of QTL *Cm25* reported in previous studies where it had been proposed that the prostaglandin synthase 1 gene (*Ptgs1*) might be a possible candidate within that interval (Sebkhi et al. 1999). However, recent data from the rat genome sequence do not support this possibility, because *Ptgs1* is located on the 3p11 cytogenetic band, whereas *Lvm12/Cm25*, as reported herein and previously (Sebkhi et al. 1999), is located on the 3q24 band (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). *Lvm13* is another

locus whose C.I. had boundaries that matched that of QTL *Cm26* detected previously by others (Tsujita et al. 2000). The C.I. of *Lvm13/Cm26* was much smaller and better defined than that of *Lvm12/Cm25*, as it covered a region of only ~ 4 cM on the telomeric end of band 17q12.3 of RNO17. Within the last 10 Mb of the telomeric region of RNO17 (thus a region that is slightly larger than that comprised by the last telomeric 4 cM of RNO17), only 10 known genes (Table 3) and 56 putative genes have been identified by the last version of published rat genome sequence (build 2.1). Based on published profiles of tissue expression and pathophysiological data, *Cacnb2* (which codes for the  $\beta_2$  subunit of the L-type calcium channel) may be the gene for which a possible link to LVM may be most obvious, given the fact that integration of calcium-dependent signals is a central mechanism of paramount importance in the control of LVMI (Frey et al. 2000). Likewise: 1) pharmacologic stimulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents induces hypertrophy in cultured cardiomyocytes (Liu et al. 1994; Zhang et al. 1998; Sei et al. 1991), 2) long-acting antagonists of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents prevent the development of LVH in SHR rats (Zou et al. 2002), and 3)  $\beta$  subunits (such as the one encoded by *Cacnb2*) have been shown to be rate-limiting for expression of functional L-type calcium channels (Colecraft et al. 2002), so changes in expression may translate in differences in the levels of corresponding currents. Another candidate gene may be vimentin, which is present in cardiac fibroblasts and myofibroblasts, and whose expression may be increased in the course of post-injury cardiac growth (Heling et al. 2000; Sehl et al. 2000). However, additional expression studies (aimed at determining which genes are expressed in the heart at significant levels, and which ones are differentially expressed between WKY and WKHA) are needed to further incriminate candidate genes, and their possible role will need to be further validated in congenic animals.

Whenever a QTL is detected in a given population, replication of that QTL by an independent group of investigators using a different sample population is a required step to obtain so-called “confirmed linkage”, and it has been suggested that linkage should exceed the  $p < 0.01$  level to confer “confirmed status” to a QTL (Lander and Kruglyak 1995). *Lvm13* clearly exceeded that significance threshold. The C.I. of *Lvm12* also matched that

of the QTL previously reported by others using a cross between normotensive parents (Sebkhi et al. 1999), but linkage was significant only at the  $p < 0.05$  level. The boundaries of *Lvm9* on RNO17 matched that of *Cm34* reported previously by others, although that QTL also mapped with BP in that cross, and may therefore not have been BP-independent (Bilusic et al. 2004). Although it was not the focus of the present study, we also found in the male progeny a QTL for whole BW ( $p < 0.01$ ) whose boundaries were similar to QTL *Bw20* (RGD; <http://rgd.mcw.edu/>) detected by others in a cross between SHR/Mol and BB/Ok rats (Kovács et al. 1998).

Another feature of particular interest was that many of the QTLs detected were transgressive, meaning that it was the WKY allele that was linked to high LVMI despite the fact that LVMI was higher in WKHA than in WKY. This may be in line with the previous reports indicating that WKY hearts had features of hypertrophic cardiomyopathy when compared to other rat strains (Aiello et al. 2004; Kurabayashi et al. 1988b; Kurabayashi et al. 1988a). WKY have even been used previously as the strain with high LVMI in a cross with F344 rats in order to detect QTLs linked to LVMI (Sebkhi et al. 1999). These hypertrophic characteristics of WKY hearts have been considered as independent from and additional to the biventricular hypertrophy that can be seen in a subpopulation of WKY and have been believed to be due to ventricular septal defects (Pfeffer et al. 1979; Slama et al. 2002). One other possibility would be that, despite the fact that both parental strains were normotensive, particular patterns of gene segregation would lead to increased BP in some of the F2 individuals, leading to changes in LVMI. Accordingly, with the notable exception of *Lvm13/Cm26* on RNO17, the C.I. of all other QTLs identified in the present study overlapped with that of QTLs linked to BP (as listed in RGD for many studies). However, precise assessment of BP requires telemetry measurements. These were not performed either in the present progenies (because they comprised large numbers of individuals). Since QTLs identified by linkage analysis require further physical confirmation in congenic animals, it will be possible to perform telemetry measurements of BP in these new strains to test whether differences in LVMI could be due to differences in BP. Accordingly, we have verified that BP was not affected in congenic animals where the

*Cm24* locus had been exchanged between WKY and WKHA rats (unpublished observations).

Strikingly, all the QTLs detected in the present study were sex-specific despite their autosomal location. Although the majority of previous QTL linkage studies in rodents have used mostly male progenies, some have previously revealed sex-related differences for cardiovascular traits such as plasma cholesterol levels (Kato et al. 2000; Korstanje et al. 2004) or several BP-related traits (Moreno et al. 2003). Interestingly, there are now many examples where inactivation or overexpression of genes have been found to have different outcomes in either male or female mice (Leinwand 2003; Du 2004). In human hearts, sex has been reported as one of the most important variable accounting for differences in cardiac gene expression (Boheler et al. 2003). Such differences may partly be due to the effects of sex steroids. Accordingly, we found that differences in the width of cardiomyocytes between male WKY and WKHA rats was not present prior to puberty, but developed progressively along with sexual maturation. Cardiomyocyte width is a variable that correlates closely with concentric hypertrophy in rats (Gerdes 1992), and we have verified previously that this was also true in the parental WKY and WKHA rats (Deschepper et al. 2002; Boutin-Ganache et al. 2002). There is also evidence that sex steroids may interact with either the production or the effects of ANP (whose production is governed by *Nppa*, the gene responsible for linkage of *Cm24* to LVMI). Indeed, inactivation of the ANP receptor has recently been shown to block the effect of testosterone on the width of cardiomyocytes (Li et al. 2004). Conversely, estradiol has been shown to increase the production of ANP by neonatal cardiomyocytes (Babiker et al. 2004). Likewise, there is evidence that *Cacnb2* (a candidate gene within *Lvm13/Cm26*) is influenced by sex steroids, since estrogens (and also possibly testosterone) affect both the expression and/or properties of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Du 2004; Golden et al. 2004). Altogether, these data provide possible explanations for the sex-specificity of the QTLs linked to LVMI.

The trait of LVMI is of great importance, since epidemiological studies have shown that it is one of the strongest predictors of cardiovascular mortality and morbidity in humans (de Simone et al. 2002; Devereux et al. 1994; Levy et al. 1990). Although whole-genome scanning constitutes a commonly used strategy to elucidate the genetic determinants of complex traits (such as LVMI), a recent review of such studies revealed that their success rate is disappointingly low when performed directly in human populations (Altmüller et al. 2001). This highlights the importance of finding QTLs in crosses performed with animal models, since such studies can reveal candidate genes whose role can be further tested in human populations by association studies. The current study reveals an additional layer of complexity, since QTLs may be distinct and different in male and female progenies. Further studies are therefore needed to investigate how sex-dependent factors may interfere with the effects of particular genes on LVMI.

## Acknowledgements

This work has been supported by the NIH/NHLBI grant HL69122 (to CFD) and by a Group Grant of the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to the IRCM Multidisciplinary Research Group in Hypertension.

## References

- Aiello EA, Villa-Abrille MC, Escudero EM, Portiansky EL, Perez NG, Camilion de Hurtado MC, and Cingolani HE (2004) Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol* 286, H1229-H1235
- Altmüller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, and Wjst M (2001) Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* 69, 936-950
- Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Thijssen V, Bronsaer RJP, Grohé C, van Bilsen M, and Doevedans PAF (2004) 17 $\beta$ -estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation* 109, 269-276
- Bilusic M, Bataillard A, Tschannen MR, Gao L, Barreto NE, Vincent M, Wang T, Jacob HJ, Sassard J, and Kwitek AE (2004) Mapping the genetic determinants of hypertension, metabolic diseases, and related phenotypes in the Lyon hypertensive rat. *Hypertension* 44, 695-701
- Boheler KR, Volkova M, Morrell C, Garg R, Zhu Y, Margulies K, Seymour A-M, and Lakatta EG (2003) Sex- and age-dependent human transcriptome variability: implications for chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2754-2759
- Boutin-Ganache I, Picard S, and Deschepper CF (2002) Distinct gene-sex interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently. *Physiol Genomics* 12, 61-67
- Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M, and Deschepper CF (2001) M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques* 31, 24-26
- Churchill GA and Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963-971
- Cicila GT, Choi C, Dene H, Lee SJ, and Rapp JP (1999) Two blood pressure/cardiac mass quantitative loci on chromosome 3 in Dahl rats. *Mamm Genome* 10, 112-116

- Cicila GT, Dukhanina OI, Kurtz T, Walder R, Garrett MR, Dene H, and Rapp JP (1997) Blood pressure and survival on a chromosome 7 congenic strain bred from Dahl rats. *Mamm Genome* 8, 896-902
- Cohn JN (1998) Arteries, myocardium, blood pressure and cardiovascular risk: towards a revised definition of hypertension. *J Hypertens* 16, 2117-2124
- Colecraft HM, Alseikhan B, Takahashi SX, Chaudhuri D, Mittman S, Yegnasubramanian V, Alvania RS, Johns DC, Marbán E, and Yue DT (2002) Novel functional properties of  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\beta$  subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Physiol* 541, 435-452
- Courvoisier H, Bihoreau M-T, Gauguier D, Plomion C, Mormède P, and Moisan M-P (1997) Integrated genetic mapping of 64 rat microsatellite markers from different sources. *Mamm Genome* 8, 282-283
- Darvasi A and Soller M (1992) Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theor Appl Genet* 85, 353-359
- de Simone G, Verdecchia P, Pede S, Gorini M, and Maggioni AP (2002) Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension. The MAVI study. *Hypertension* 40, 470-476
- Deschepper CF, Masciotra S, Zahabi A, Boutin-Ganache I, Picard S, and Reudelhuber T (2001) Functional alterations of the *Nppa* promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ Res* 88, 222-227
- Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, and Rouleau JL (2002) Characterization of left ventricular myocardium, isolated cardiomyocytes and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol* 82, H149-H155
- Devereux RB, de Simone G, Ganau A, and Roman MJ (1994) Left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in hypertension: stimuli, functional consequences and prognostic implications. *J Hypertens* 12 (suppl. 10), S117-S127
- Du X-J (2004) Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res* 63, 510-519

- Frey N, McKinsey TA, and Olson EN (2000) Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nature Medicine* 6, 1221-1227
- Garrett MR, Dene H, and Rapp JP (2003) Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *J Am Soc Nephrol* 14, 1175-1187
- Garrett MR, Saad Y, Dene H, and Rapp JP (2005) Blood pressure QTL that differentiate Dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics* 29, 33-38
- Gerdes AM (1992) The use of isolated myocytes to evaluate myocardial remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 2, 152-155
- Golden KL, Marsh JD, and Jiang Y (2004) Testosterone regulates mRNA levels of calcium regulatory proteins in cardiac myocytes. *Horm Metab Res* 36, 197-202
- Haley CS and Knott SA (1992) Simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69, 315-324
- Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, Bauer E, Klovekorn WP, Schlepper M, Schaper W, and Schaper J (2000) Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ Res* 86, 846-853
- Hendley ED and Ohlsson WG (1991) Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *Am J Physiol* 261, H583-H589
- Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Scheider MD, Garbers DL, and Kuhn M (2003) Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl-cyclase-A. *J Clin Invest* 111, 1399-1407
- Innes BA, McLaughlin MG, Kapuscinski MK, Jacob HJ, and Harrap SB (1998) Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* 31, 741-746
- Kato N, Hyne G, Bihoreau M-T, Ganguier D, Lathrop GM, and Rapp JP (2005) Complete genome searches for quantitative trait loci controlling blood pressure and related

- traits in four segregatinf populations derived from Dahl hypertensive rats. *Mamm Genome* 10, 259-265
- Kato N, Tamada T, Nabika T, Ueno K, Gotoda T, Matsumoto C, Mashimo T, Sawamura M, Ikeda K, Nara Y, and Yamori Y (2000) Identification of quantitative trait loci for serum cholesterol levels in stroke-prone hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 223-229
- Korstanje R, Li R, Howard T, Kelmenson P, Marshall J, Paigen B, and Churchill G (2004) Influence of sex and diet on quantitative trait loci for HDL-cholesterol levels in a SM/J by NZB/BINJ intercross population. *J Lipid Res* 45, 881-888
- Kovács P, Voigt B, and Klöting I (1998) Congenic strain confirms putative quantitative trait locus for body weight in the rat. *Mamm Genome* 9, 294-296
- Kuribayashi T, Mizuta T, Shimoo K, Kubota H, Katsume H, Nakagawa M, and Ibata Y (1988a) Spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy in the rat. II. Distribution of, and correlations between, various cardiac abnormalities in the WKY/NCrj and its related strains. *Jpn Circ J* 52, 1156-1170
- Kuribayashi T, Mizuta T, Shimoo K, Kubota Y, Katsume H, Nakagawa M, and Ibata Y (1988b) Spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy in the rat. I. Pathologic features. *Jpn Circ J* 51, 573-588
- Lander ES and Kruglyak L (1995) Genetic dissection of compex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet* 11, 241-247
- Leinwand LA (2003) Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 112, 302-307
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, and Castelli WP (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *N Engl J Med* 322, 1561-1566
- Li Y, Kishimoto I, Saito Y, Harada M, Kuwahara K, Izumi T, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Tanimoto K, Nakagawa Y, Nakanishi M, Adachi Y, Garbers DL, Fukamizu A, and Nakao K (2004) Androgen contributes to gender-related cardiac

- hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology* 145, 951-958
- Liu QY, Karpinski E, and Pang PK (1994) The L-type calcium channel current is increased by alpha-1 adrenoceptor activation in neonatal rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 271, 935-943
- Manly KF and Olson JM (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm Genome* 10, 327-334
- Moreno C, Dumas P, Kaldunski ML, Tonellato PJ, Greene AS, Roman RJ, Cheng Q, Wang Z, Jacob HJ, and Cowley AW Jr (2003) Genomic map of cardiovascular phenotypes of hypertension in female Dahl S rats. *Physiol Genomics* 15, 243-257
- Nunez DJR, Clifford CP, Al-Mahdawi S, and Dutka D (1996) Hypertensive cardiac hypertrophy - is genetic variance the missing link? *Br J Clin Pharmacol* 42, 107-117
- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Dunn FG, Nishiyama K, Tsuchiya M, and Frohlich ED (1979) Natural biventricular hypertrophy in normotensive rats. I. Physical and hemodynamic characteristics. *Am J Physiol* 236, H640-H643
- Sebkhi A, Zhao L, Lu L, Haley CS, Nunez DJR, and Wilkins MR (1999) Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats. Results from an F344xWKY cross. *Hypertension* 33, 949-953
- Sehl PD, Tai JT, Hillan KJ, Brown LA, Goddard A, Yang R, Jin H, and Lowe DG (2000) Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation* 101, 1990-1999
- Sei CA, Irons CE, Sprenkle AB, McDonough PM, Brown JH, and Glembotski CC (1991) The  $\alpha$ -adrenergic stimulation of atrial natriuretic factor expression in cardiac myocytes requires calcium influx, protein kinase C, and calmodulin-regulated pathways. *J Biol Chem* 266, 15910-15916
- Sharp A and Mayet J (2002) Regression of left ventricular hypertrophy: hoping for a longer life. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 3, 141-144
- Siegel AK, Planert M, Rademacher S, Mehr AP, Kossmehl P, Wehland M, Stoll M, and Kreutz R (2003) Genetic loci contribute to the progression of vascular and cardiac

- hypertrophy in salt-sensitive spontaneous hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1211-1217
- Slama M, Susic D, Varagic J, and Frohlich ED (2002) High rate of ventricular septal defects in WKY rats. *Hypertension* 40, 175-178
- Stoll M, Cowley AWJr, Tonellato PJ, Greene AS, Kaldunski ML, Roman RJ, Dumas P, and Schork NJ (2001) A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science* 294, 1723-1726
- Touyz RM, Fareh J, Thibault G, and Schiffrian EL (1996) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  modulation by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes and fibroblasts from hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 28, 797-805
- Tsujita Y, Iwai N, Tamaki S, Nakamura Y, Nishimura M, and Kinoshita M (2000) Genetic mapping of quantitative trait loci influencing left ventricular mass in rats. *Am J Physiol* 279, H2062-H2067
- Verhaaren HA, Schieken RM, Mosteller M, Hewitt JK, Eaves LJ, and Nance WE (1991) Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Wisconsin twin study). *Am J Cardiol* 68, 661-668
- Visscher PM, Thompson R, and Haley CS (1996) Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* 143, 1013-1020
- Zahabi A, Picard S, Fortin N, Reudelhuber TL, and Deschepper CF (2003) Expression of constitutively active guanylate cyclase in cardiomyocytes inhibits the hypertrophic effects of isoproterenol and aortic constriction on mouse hearts. *J Biol Chem* 278, 47694-47699
- Zhang R, Crump J, and Reisin E (2003) Regression of left ventricular hypertrophy is a key goal of hypertension management. *Curr Hypertens Rep* 5, 301-308
- Zhang S, Hiraoka M, and Hirano Y (1998) Effects of  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1955-1965
- Zou Y, Yamazaki T, Nakagawa K, Yamada H, Iriguchi N, Toko H, Takano H, Akazawa H, Nagai R, and Komuro I (2002) Continuous blockade of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels

*Mamm Genome*. 2005 Sep;16(9):700-11 (used with permission)

110

suppresses activation of calcineurin and development of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 25, 117-124

## Tables

**Table 1:** List of QTLs inventoried in the Rat Genome Database for linkage to cardiac mass

QTL	Synonym	Parental strains	Chr	Reference
<i>Cardiac mass QTL coincident with a blood pressure QTL in the same study</i>				
<i>Cm1</i>	<i>Bp158</i>	SR/Jr, SS/Jr	7	(Cicila et al. 1997)
<i>Cm2</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	8	(Moreno et al. 2003)
<i>Cm4</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	9	(Moreno et al. 2003)
<i>Cm5</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	12	(Moreno et al. 2003)
<i>Cm10</i>	<i>Bp112</i>	SS/JrRkb, SHR/FubRkb	3	(Siegel et al. 2003)
<i>Cm11</i>	<i>Bp113</i>	SS/JrRkb, SHR/FubRkb	9	(Siegel et al. 2003)
<i>Cm12</i>	<i>Bp114</i>	SS/JrRkb, SHR/FubRkb	19	(Siegel et al. 2003)
<i>Cm13</i>	<i>Bp162</i>	SR/Jr, SS/Jr	3	(Cicila et al. 1999)
<i>Cm14</i>	<i>Bp51</i>	SR/Jr, SS/Jr	3	(Cicila et al. 1999)
<i>Cm16</i>	<i>Hw1</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	1	(Cicila et al. 1997)
<i>Cm23</i>	<i>Lvm2</i>	DRY, SHR	1	(Innes et al. 1998)
<i>Cm27</i>	<i>Lvm7</i>	LEW/Crj, SHR/Izm	7	(Tsujita et al. 2000)
<i>Cm28</i>	<i>Bp53</i>	SS/Jr, SHR	9	(Garrett et al. 2005)
<i>Cm29</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	2	(Stoll et al. 2001)
<i>Cm30</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	8	(Stoll et al. 2001)
<i>Cm31</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	10	(Stoll et al. 2001)
<i>Cm34</i>		LH/Mav, LN/Mav	17	(Bilusic et al. 2004)

QTL	Synonym	Parental strains	Chr	Reference
<i>Cmi1</i>		SS/Jr, BN	10	(Kato et al. 2005)
<i>Cmi2</i>		SS/Jr, BN	10	(Kato et al. 2005)
<i>Cardiac mass QTL independent from blood pressure with at least one hypertensive parental strain</i>				
<i>Cm3</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	8	(Moreno et al. 2003)
<i>Cm6</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	7	(Moreno et al. 2003)
<i>Cm17</i>	<i>Hw2</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	3	(Garrett et al. 2003)
<i>Cm18</i>	<i>Hw3</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	4	(Garrett et al. 2003)
<i>Cm19</i>	<i>Hw4</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	8	(Garrett et al. 2003)
<i>Cm20</i>	<i>Hw5</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	9	(Garrett et al. 2003)
<i>Cm21</i>	<i>Hw6</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	9	(Garrett et al. 2003)
<i>Cm22</i>	<i>Lvm1</i>	DRY, SHR	2	(Innes et al. 1998)
<i>Cm26</i>	<i>Lvm6</i>	LEW/Crj, SHR/Izm	17	(Tsujita et al. 2000)
<i>Cm32</i>		LH/Mav, LN/Mav	1	(Bilusic et al. 2004)
<i>Cm33</i>		LH/Mav, LN/Mav	10	(Bilusic et al. 2004)
<i>Cm35</i>		LH/Mav, LN/Mav	1	(Bilusic et al. 2004)
<i>Cm36</i>		LH/Mav, LN/Mav	1	(Bilusic et al. 2004)
<i>Cardiac mass QTL with normotensive parental strains</i>				
<i>Cm24</i>	<i>Lvm3</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	5	(Deschepper et al. 2001)
<i>Cm25</i>	<i>Lvm4</i>	WKY, F344/N	3	(Sebkhi et al. 1999)

“Synonym” refers to previous appellations of the same QTLs in previous versions of the Rat Genome Database. Chr refers to the chromosome where each QTL has been detected.

**Table 2:** Characteristics for QTLs linked to left ventricular mass index.

Sex	QTL	Peak Marker	lod variance	C.I. (cM)	Model	WKHA/WKHA	WKY/WKHA	WKY/WKY
Male	<i>Lvm8</i>	D5Rat173	3.4	4%	94-116	WKY rec	2.71 ± 0.03*	2.72 ± 0.02**
Male	<i>Cm24</i>	D5Rat99	4.3	5%	137-154	WKY rec	2.72 ± 0.02***	2.70 ± 0.01***
Male	<i>Lvm10</i>	D12Arb13	4.2	3%	25-46	WKY dom	2.58 ± 0.02***/†	2.70 ± 0.02
Male	<i>Lvm9</i>	D17Mgh5	2.8	5%	5-40	Additive	2.60 ± 0.03**	2.66 ± 0.03
Male	<i>Lvm13</i>	D17Rat52	4.5	5%	71-75	Additive	2.54 ± 0.03***	2.66 ± 0.03
Female	<i>Lvm12</i>	D3Wox9	2.7	4%	20-47	WKY rec	2.95 ± 0.03*	2.94 ± 0.02**
Female	<i>Lvm11</i>	D15Rat26	2.8	3%	60-83	Additive	3.08 ± 0.03***	2.98 ± 0.02
								2.89 ± 0.03

Rec: recessive; dom: dominant. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. WKY/WKY. †† $p < 0.01$ , ††† $p < 0.001$  vs. WKY/WKHA, as determined by one-way ANOVA followed by post-hoc Newman-Keul's tests. All results are means  $\pm$  SE. The lod scores were calculated with data from individuals for which data were available for the entire genome.

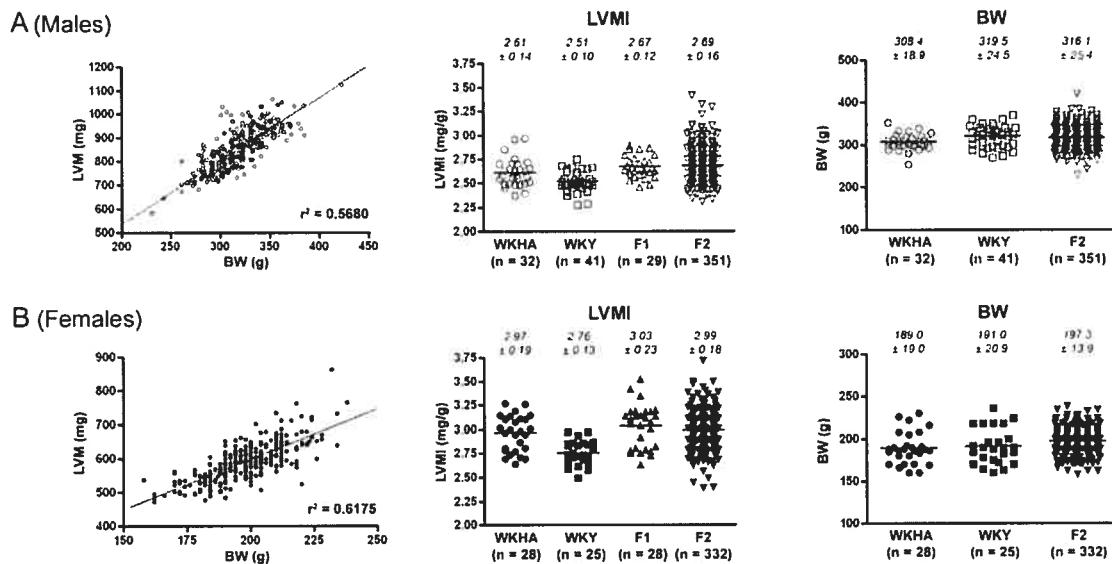
The values of % of total variance were calculated from the genotyping data obtained with all individuals from the population for cognate chromosomes.

**Table 3:** List of known genes in the telomeric region of the 17q12.3 band on RNO17

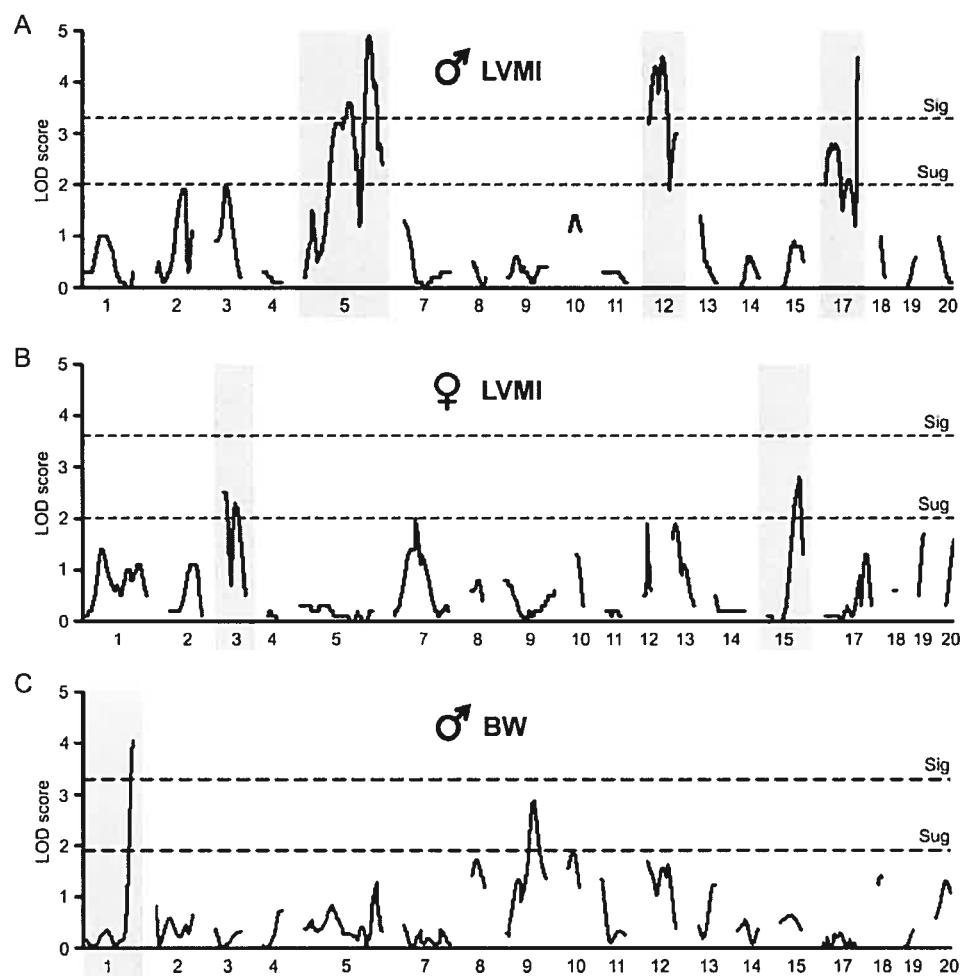
<b>Start</b>	<b>Stop</b>	<b>Symbol</b>	<b>Description</b>
86440505	86514516	Itga8	integrin alpha 8
87262796	87285493	Pter	phosphotriesterase related
87556726	87634645	Cubn	Cubilin
87858113	87866596	Vim	Vimentin
88864079	89089703	Cacnb2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
92962988	92986829	Pip5k2a	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II $\alpha$
93505522	93507376	Ptf1a	pancreas specific transcription factor, 1a
96270263	96332690	Gad2	glutamate decarboxylase 2
96587164	96659522	Abi1	eps8 binding protein (e3B1), alternatively spliced
96769605	96807358	Yme1l1	YME1 (S.cerevisiae)-like 1

Start and stop: respective positions of start and stop sites of corresponding genes in the sequence of RNO17 (NCBI, build 2.1).

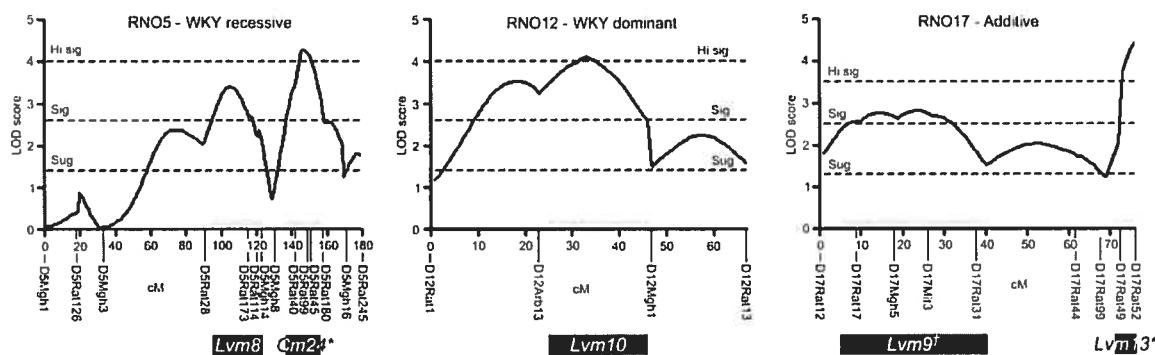
## Figures



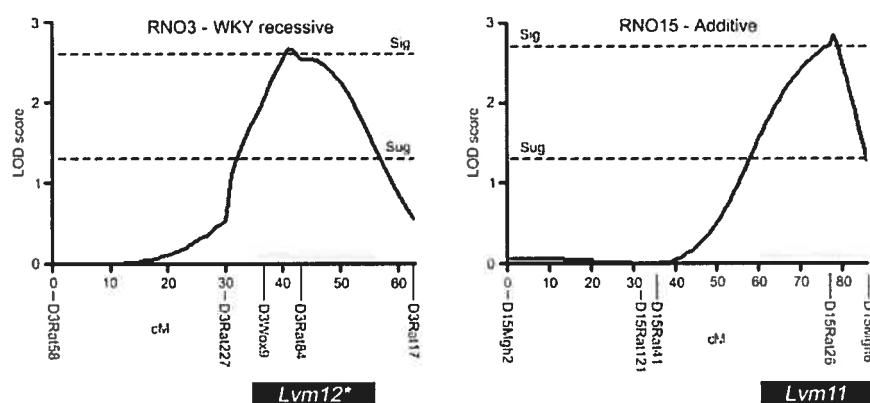
**Figure 1:** Correlation between LVM and BW, and distributions of values of LVMI and BW in parental, F1 and/or F2 populations. The value for each animal is represented by a symbol; the mean values for each group are represented by horizontal lines; the values for mean and SD are indicated for each group. The number of rats used in each group (n) is indicated under each corresponding group. The top (Fig 1A) represent values for males. The bottom (Fig 1B) represent the values for females.



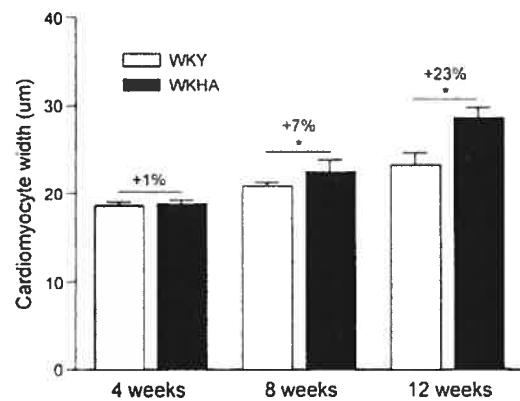
**Figure 2:** Genomewide scans for LVMI in the male ( $\sigma$ ) and female ( $\varphi$ ) progenies, as well as for BW in the male progeny. The dotted lines represent the suggestive ( $p = 0.63$ ) and significant ( $p = 0.05$ ) levels as determined by permutation tests using 1,000 permutations, using a model-free basis without assumptions about the mode of heritability. Hatched areas highlight QTLs reaching at least the suggestive level in each population.



**Figure 3:** QTLs linked to LVMI in the male F2 progeny . The plain lines represent the plot of variations of lod scores across the chromosome. The dotted lines represent the suggestive ( $p = 0.63$ ), significant ( $p = 0.05$ ) and highly significant ( $p = 0.001$ ) levels as determined by permutation tests using 1,000 permutations, using the corresponding mode of heritability. The gray bars represent the confidence interval of the QTLs as calculated by bootstrap analysis. The name of each QTL is indicated below. \* QTL matching the interval of a BP-independent QTL published previously; † QTL matching the interval of a BP-dependent QTL published previously.



**Figure 4:** QTLs linked to LVMI in the female F2 progeny. The plain lines represent the plot of variations of lod scores across the chromosome. The dotted lines represent the suggestive ( $p = 0.63$ ) and significant ( $p = 0.05$ ) levels as determined by permutation tests using 1,000 permutations, according to the corresponding model of heritability. The gray bars represent the confidence interval of the QTL as calculated by bootstrap analysis. The name of each QTL is indicated below. \* QTL matching the interval of a BP-independent QTL published previously.



**Figure 5:** Width of cardiomyocytes isolated from WKY and WKHA male rats at 4, 8 and 12 weeks of age. Values are average  $\pm$  SD. \*  $P < 0.05$  vs. WKY, as determined by one-way ANOVA followed by post-hoc Newman-Keul's tests.

## **Chapitre 3 : Cartographie génétique de QTLs liés à la pression sanguine dans un croisement expérimental de rats consanguins normotendus.**

*In the long history of humankind (and animal kind, too) those who learned to collaborate and improvise most effectively have prevailed*

Charles Robert Darwin

## Contribution des auteurs à la préparation de l'article 2

Catherine Lau a générée les populations F1 et F2 sous la supervision de William A. Cupples et Christian F. Deschepper. Elle a ensuite effectué la totalité des mesures phénotypiques. Emmanuelle Souzeau, Marie-Line Rainville et moi-même avons extrait et purifié les ADN à partir des animaux F2. J'ai ensuite supervisé le génotypage effectué par Emmanuelle Souzeau et Marie-Line Rainville. L'ensemble de ces données a servi aux analyses dont les résultats sont présentés dans les figures 1, 2, 3 et 4 et les tableaux 1 et 2.

J'ai effectué la totalité des analyses statistiques présentées dans l'article, incluant la cartographie de QTL (Figures 1, 2, 3 et tableaux 1, 2).

J'ai écrit l'article sous la supervision de Christian F. Deschepper. Des corrections mineures ont été apportées par William A. Cupples.

## **Article 2 : Genetic determinants of systolic and pulse pressure in an intercross between normotensive inbred rats**

**Authors:** Bastien Llamas<sup>1,3</sup>, Catherine Lau<sup>2,3</sup>, William A. Cupples<sup>2</sup>, Marie-Line Rainville<sup>1</sup>, Emmanuelle Souzeau<sup>1</sup>, Christian F. Deschépfer<sup>1†</sup>

**Running head:** Llamas – Genetics of pulse pressure in rats

**Address :** <sup>1</sup>Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) and Université de Montréal, Montréal (QC) Canada H2W 1R7 ; <sup>2</sup>Department of Biology, University of Victoria ; <sup>3</sup>both authors contributed equally to the present study.

**† Corresponding author:** Phone: (514) 987 5759

Fax: (514) 987 5585

E-mail: [REDACTED]

## Abstract

By continuous monitoring of abdominal aortic blood pressure via telemetry in conscious rats, we have observed that systolic, diastolic and pulse pressures of male Brown-Norway rats were all significantly lower than that of male Wistar-Kyoto rats, despite the fact that all values in both strains were within normotensive ranges. Further analyses performed in 166 animals from the progeny of a F2 intercross between Brown-Norway and Wistar-Kyoto rats revealed that, despite a high correlation between systolic blood pressure and diastolic blood pressure, there was no correlation between pulse pressure and diastolic blood pressure, and the value of the correlation between systolic blood pressure and pulse pressure was lower than that of systolic blood pressure with diastolic blood pressure. Two major and highly significant ( $p < 0.001$ ) QTLs linked to pulse pressure were found on chromosome 4 (*Pp1*) and 16 (*Pp2*). Only suggestive QTLs were found for systolic blood pressure, but the strongest one (*Sbp1*) had the same peak and linkage probability profile as *Pp1*. Altogether, these data show that genetic determinants affecting pulse pressure in normotensive animals are either stronger or independent from the ones affecting systolic blood pressure, and are of interest in light of evidence showing that pulse pressure is highly heritable in humans and that elevated pulse pressure is a predictor of cardiovascular risk.

**Keywords:** blood pressure/analysis – blood pressure/genetics – quantitative trait loci/genetics – rat inbred bn/genetics – models, animal/genetics – vascular diseases/ultrastructure

## Introduction

Numerous studies have used crosses between inbred rat strains to dissect out quantitative trait loci (QTL) linked to blood pressure. Although such crosses (maintained under different environmental conditions) have made it possible to identify up to now ~ 273 QTLs linked to blood pressure (<http://rgd.mcw.edu>), most of these studies (if not all) have used crosses where at least one parental strain was hypertensive. Moreover, the majority of these QTLs concern only systolic blood pressure (SBP), as only a limited number of studies have measured blood pressure via intra-arterial devices <sup>1-4</sup>. Such recordings are a requirement to measure diastolic blood pressure (DBP) and pulse pressure (PP). PP is of particular interest because it is governed, in addition to the force of ventricular ejection, by intrinsic properties of the vascular tree. The principal vascular characteristics that influence PP are the cushioning capacity of large arteries and the timing and intensity of wave reflections <sup>5</sup>, both of which are governed predominantly by large artery stiffness <sup>6</sup>. Moreover, PP is a powerful and independent predictor of cardiovascular risk, particularly in older patients <sup>7-10</sup>, and thus carries predictive information above and beyond that carried by SBP or DBP. Likewise, PP or surrogate measurements are markers of atherosclerosis <sup>11-13</sup>, and elevated PP associates with low renal function in elderly patients <sup>14</sup>.

In the course of preliminary experiments where abdominal aortic blood pressure was continuously monitored via telemetry in conscious rats, we have observed that SBP, DBP and PP of Brown-Norway (BN) rats were all significantly lower than that of Wistar-Kyoto (WKY) rats, despite the fact that all values in both strains were within normotensive ranges <sup>15</sup>. We therefore proceeded to generate an F2 intercross between both strains to test: 1) to which extent the values of SBP, DBP and PP would cosegregate; and 2) whether QTLs linked to each particular trait would be distinct or show overlap.

## **Material and methods**

### *Animals*

Two inbred strains of rats were used for the current studies. The WKY/Cfd rats originated from a colony maintained at the “Institut de recherches cliniques de Montréal” (IRCM) and were derived from WKY/Cr parents obtained from Charles River (St. Constant, Quebec, Canada). BN/SsN rats were purchased from Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN). Male and female WKY/Cfd rats were first mated to either male or female BN/SsN rats. The resulting F1 animals were further mated randomly to generate male F2 animals. This design represents a “reciprocal cross”, which ensures that sex chromosomes of both parental origins are represented equally within the F2 population. All procedures on animals were approved by the University of Victoria Animal Care Committee and conducted according to guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care.

### *Surgery and telemetry recordings*

Each rat was first operated at 10-12 weeks of age. Twenty min before induction of anesthesia, each animal received the analgesic buprenorphine (Temgesic®, Schering-Plough, 0.02 mg/kg i.p.) and the antibiotic preparation Tribriissen 24% (0.25 mL/kg). Anesthesia was first induced by 4% isoflurane in inspired gas (30% O<sub>2</sub>, 70% air), then maintained by reducing the concentration to ~2%. Each rat was transferred to a heated table for surgical implantation of the blood pressure PA-C40 telemetry implant (Datasciences, St-Paul, MN). The cannula of the implant was advanced via the femoral artery into the abdominal aorta at about the level of the kidneys. The body of the transmitter was inserted into a subcutaneous pocket on the rat's left flank and held in place by a purse string suture. The rats received two additional doses of buprenorphine at approximately 12 h intervals after transmitter implantation. At least 10 days were

allowed for recovery before acquiring one 24 h control record of blood pressures, heart rate (HR) and locomotor activity. We occasionally acquired a second 24 h record if the first was of poor quality or incomplete. Data were acquired at 250 Hz for 10 sec every 2 min. Transmitters were zeroed before implantation and the zero was checked at explantation. If the two zeroes differed by more than 12 mmHg then a linear correction was applied to the data. All values for the above variables represent averages of values collected over the 24 h period.

After recording baseline values in parental BN and WKY rats, a second surgery was performed to clip the right renal artery and thus generate two kidney-one clip (2K-1C) hypertension. The right kidney was approached by a flank incision and a silver clip placed on its artery. The gap in the clip was initially set to 0.25 mm with a feeler gauge; after positioning, the gap was adjusted so that the diameter of the artery distal to the clip was less than that proximal to the clip. The incision was closed in layers, the abdominal muscle with interrupted sutures and the skin with uninterrupted subcuticular sutures. Analgesia and anesthesia procedures were as described above. Blood pressure was monitored by brief sampling in the following days. Animals that developed malignant hypertension (defined as mean arterial pressure > 160 mmHg accompanied by rapid weight loss and/or development of seizures) and those that failed to develop hypertension were culled (~11%). The effect of strains on the time-dependent evolution of SBP and PP was tested by 2-way ANOVA, followed by post-hoc Fisher's test to test for differences between strains at particular time points.

To monitor general health, rats were weighed daily from 5 days before the initial surgery until 12 days after the second surgery and then at weekly intervals. Blood pressure recordings after 2K-1C began 12 – 14 days after surgery. Twenty four hour records were acquired weekly for 8 weeks, as described above. At the end of that period, all animals were killed by KCl injection under isoflurane anesthesia, and the spleens were collected for genomic DNA extraction.

### ***Microsatellite markers and genetic analyses***

Genomic DNA was obtained from frozen spleen samples using the DNeasy tissue kit (Qiagen, Mississauga, ON). Analysis of simple sequence length polymorphisms was carried out by polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic DNA with M13-tailed microsatellite markers labeled with either dye IRD700 or dye IRD800 (LiCor Biotechnology, Lincoln, NE, USA), similarly as described previously<sup>16</sup>. The products were separated and analyzed using a LiCor 4200 DNA analysis system.

The order of microsatellite markers was obtained from rat genome databases (<http://www.niams.nih.gov/rtbc/ratgbase>; <http://rgd.mcw.edu>; [http://www.well.ox.ac.uk/rat\\_mapping\\_ressources](http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_ressources); <http://www-genome.wi.mit.edu/rat/public>). Genotyping data were then analyzed with J/qtl (<http://www.jax.org/staff/churchill/labsite/software/Jqt1/>), which is a JAVA-enabled version of the R/QTL package<sup>17</sup>. Markers misplaced or showing aberrant recombination were removed from the dataset. We used a total of 144 polymorphic microsatellite markers in order to obtain dense coverage of all autosomal chromosomes ( $7.6 \pm 3.2$  markers per chromosome, with distance between two markers averaging  $14.3 \pm 8.2$  cM). Linkage probability was examined by interval mapping, using the EM algorithm<sup>18</sup>. Genome-wide significance thresholds were set, as suggested previously, at the 37th (“suggestive”), 95th (“significant”) and 99.9th (“highly significant”) percentiles which correspond to the chance of finding one false positive linkage 0.63, 0.05 and 0.001 times, respectively<sup>19,20</sup>. Threshold for values of the log-likelihood of the odds (LOD) ratios were calculated on the basis of permutation tests performed on the data sets themselves (using 1000 permutations)<sup>21</sup>. For QTLs of interest, the phenotypic data were grouped according to the origin of the allele closest to the peak of the LOD curve, and corresponding data were analyzed by one-way ANOVA to determine the mode of inheritance. Confidence intervals (C.I.) were estimated by the 1-lod support interval method<sup>22</sup>. Possible interactions between QTLs were investigated by two-dimensional, two-QTL genome scanning using the EM algorithm.

The degree of genetic determination (i.e. the ratio of genetic to total variance) was estimated as  $(V_t - V_g)/V_t$ , where  $V_t$  was the total variance of the phenotype in the F2 cohort (explained by both environmental and genetic factors), and  $V_g$  was the pooled estimate of the phenotype variance in the parental and F1 cohorts (solely due to environmental factors)<sup>1</sup>.

## Results

The distribution of phenotypic values in the parental, F1 and F2 cohorts is shown in Table 1. It can be appreciated that the values of PP, SBP and DBP were ~24%, 15% and 11% lower in BN than in WKY rats, respectively. Phenotypic values in the F1 and F2 animals were intermediate between those of the 2 parental strains. The degree of genetic determination in the F2 cohort was estimated as 36%, 25% and 20% for PP, SBP and DBP, respectively. Other measured phenotypes (HR and locomotor activity) were not different between the 2 strains and did not segregate in the progeny of the cross.

Using results obtained in all 166 F2 male animals, we performed correlations between the values of SBP, DBP, PP and mean arterial pressure (MAP) (Fig. 1). Not surprisingly (since each variable participates in the calculation of MAP), there was a high and significant correlation ( $r^2 > 0.88$ ;  $p < 0.0001$ ) of the values of SBP and DBP with that of MAP. However, the value of the correlation of SBP with DBP, although still highly significant ( $p < 0.0001$ ), was lower ( $r^2 = 0.625$ ) than that of SBP with MAP. Despite the high correlation between SBP and DBP, there was no correlation between PP and DBP, and the value of the correlation between SBP and PP was lower ( $r^2 = 0.345$ ;  $p < 0.0001$ ) than that of SBP with DBP.

The whole genome scan revealed 2 major and highly significant ( $p < 0.001$ ) QTLs linked to PP on chromosome 4 (*Pp1*) and 16 (*Pp2*) (Table 2 and Fig. 2). Two-dimensional, two-QTL genome scanning revealed that *Pp1* and *Pp2* interacted in an additive (non-epistatic) manner, the combined LOD score for *Pp1* and *Pp2* being 10.49. In contrast to PP, only suggestive QTLs were found for SBP. The highest of such QTLs (*Sbp1*) had a LOD score  $> 3$  but did not quite reach the significant level ( $p < 0.08$ ) (Table 2 and Fig. 2). However, the peak of *Sbp1* was identical to that of *Pp1*, and its profile of linkage probability on chromosome 4 was very similar to that of *Pp1* (Fig. 3). Other QTLs linked to either PP and SBP showed only suggestive linkage ( $p < 0.63$ ), and none of these peaks showed significant overlap. Characteristics of all significant or suggestive

QTLs (with exact location, C.I. and mode of inheritance) are summarized in Table 2. Although DBP was different in parental strains, we found no QTL with significant or suggestive linkage to DBP in the F2 progeny.

To test whether the difference in PP observed between BN and WKY under basal normotensive conditions would persist under hypertensive conditions, hypertension was induced by 2K-1C, and blood pressure was monitored up to 8 weeks after installing the clip of the renal artery. SBP increased in both BN and WKY rats in a time-dependent manner, but at most time-points, both SBP and PP were lower in BN rats than in their WKY counterparts (Fig. 4). By 2-way ANOVA, it was found that strains ( $P < 0.05$ ) and time ( $P < 0.001$ ) each had a significant effect on the values of SBP and PP, but that the strains had no significant interaction with the effect of time.

## Discussion

PP is defined as the difference between DBP and SBP. As DBP and SBP are both lower in BN than in their WKY counterparts, it is not possible *a priori* to determine which component of blood pressure is responsible for the 24% lower PP in BN rats. As co-segregation studies in the F2 progeny showed no correlation of PP with DBP, SBP appears to be the only component of the blood pressure profile that contributes to PP in the current cross. Using the progeny of a cross between Lyon hypertensive (LH) and Lyon normotensive (LN) rats, others had previously reported a similar lack of correlation between PP and DBP<sup>1</sup>. Although PP correlated significantly with SBP, the relatively low correlation coefficient ( $r^2 = 0.345$ ) also indicated that other factors must play prominent roles. Genetic factors are likely candidates, as human studies indicate that heritability of PP is high, with some loci influencing PP being different from the ones linked to either DBP or SBP<sup>23-25</sup>.

Calculated estimates showed that the degree of genetic determination of PP was greater than that of either SBP or DBP in the current cross between normotensive rat strains. In keeping with this notion, we found 2 highly significant QTLs for PP (*Pp1* and *Pp2*), only suggestive QTLs were found for SBP (*Sbp1* being the strongest one), and no QTL was found for either DBP, HR or locomotor activity. Several lines of evidence suggest that *Pp1* and *Sbp1* might correspond to one same QTL being linked to both traits: 1) the peak marker of *Pp1* was identical to that of *Sbp1*; 2) the profiles of linkage probability of both QTLs were very similar; and 3) the fact that SBP co-segregated to some extent with PP in the F2 population indicates that there is a genetic link between both phenotypes. Of note, we cannot rule out the possibility that *Pp1* and *Sbp1* correspond to two very close but distinct loci. However, simultaneous linkage for both PP and SBP has been reported for a QTL on chromosome 13 in a low resolution mapping of a LN/LH intercross<sup>1</sup> as well as for a QTL on chromosome 3 in a SHRSP/WKY intercross maintained on a high-salt diet<sup>2</sup>.

In addition to *Ppl1*, we found one other QTL on chromosome 16 (*Pp2*) that showed highly significant linkage to PP but no linkage with either SBP or DBP. In human populations, it has been reported that QTLs linked to PP may either be different from those linked to SBP or DBP<sup>25</sup>, show partial overlap<sup>23,24</sup>, or show complete overlap<sup>26</sup> with QTLs linked to SBP or DBP. In animals, our data are the first to identify at least one QTL linked to PP independently of blood pressure.

The mechanisms governing PP and aortic stiffness are complex, and involve multiple factors including the properties of the extracellular matrix, the composition and properties of cells constituting the vessel walls, and several humoral influences<sup>6,27</sup>. Although some have reported that there were differences in collagen content and mechanical properties of conduit arteries from several normotensive and hypertensive strains of rats<sup>28</sup>, it has not been verified whether these differences correlate with differences in PP *in vivo*. Interestingly, the vascular walls of BN rats have been reported to harbor several anomalies compared to other strains, including a high incidence of ruptures of the internal elastic lamina (IEL) of large arteries and a decreased concentration of aortic elastin<sup>29</sup>. Moreover, IEL ruptures have been linked to two QTLs on chromosomes 5 and 10 in a cross between BN and the New Zealand Genetically Hypertensive (GH) rat<sup>30</sup>, and the aortic elastin content has been linked to two QTLs on chromosome 2 and one QTL on chromosome 14 in a cross between BN and LOU rats<sup>31</sup>. Although these 2 traits indicate that there is vascular fragility in BN rats, it is unknown whether they have an impact on PP. Moreover, none of these previously reported QTLs show any overlap with the ones identified in the present study.

## Perspectives

The continuation of the current studies by the generation of congenic animals should make it possible to identify candidate genes and/or vascular factors that are responsible for differences in PP. Although the current QTLs were identified under normotensive conditions, we also show that differences in PP were maintained when BN and WKY were made hypertensive. Thus, the generation of congenic animals should have the additional utility of allowing one to test whether PP has pathophysiological consequences that are different or additional to that of blood pressure *per se*. There has been a lack of such a genetic animal model, if one excepts models where more severe monogenic diseases (such as Marfan, Ehlers-Danlos or Williams syndromes) have been mimicked by gene inactivation<sup>6</sup>. For instance, despite having increased susceptibility to hypertension-induced renal disease<sup>32</sup> and defective renal autoregulation<sup>33</sup>, BN rats have both low incidence and slow progression of age-related glomerular disease<sup>34</sup>, and a greater life expectancy than Sprague-Dawley and Wistar rats<sup>35</sup>. One plausible explanation would be that the lower PP in BN rats is partly responsible for their relative freedom from chronic progressive nephrosis, a hypothesis that could be formally tested in congenic strains. Finally identification of genes linked to PP would be of interest in light of the evidences suggesting the adverse prognostic value of elevated PP in humans<sup>7-14</sup>.

## Acknowledgements

This work has been supported by the NIH/NHLBI grant HL69122.

## References

1. Dubay C, Vincent M, Samani NJ, Hilbert P, Kaiser MA, Beressi J-P, Kotelevtsev Y, Beckmann JS, Soubrier F, Sassard J, Lathrop GM. Genetic determinants of diastolic and pulse pressure map to different loci in Lyon hypertensive rats. *Nature Genet*. 1993;3:354-357.
2. Clark JS, Jeffs B, Davidson AO, Lee WK, Anderson NH, Bihoreau MT, Brosnan MJ, Devlin AM, Kelman AW, Lindpaintner K, Dominiczak AF. Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension*. 1996;28:898-906.
3. Herrera VL, Tsikoudakis A, Ponce LR, Matsubara Y, Ruiz-Opazo N. Gender-specific QTLs and interacting-loci underlie salt-sensitive hypertension and target-organ complications in Dahl S/jrHS hypertensive rats. *Physiol Genomics*. 2006;26:172-179.
4. Soler JM, Pereira AC, Torres CH, Krieger JE. Gene by Environment QTL mapping through Multiple Trait Analyses in blood pressure salt-sensitivity: identification of a novel QTL in rat chromosome 5. *BMC Med Genet*. 2006;7:47.
5. Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation*. 2003;107:2864-2869.
6. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension*. 2005;45:1050-1055.
7. Khattar RS, Swales JD, Dore C, Senior R, Lahiri A. Effect of aging on the prognostic significance of ambulatory systolic, diastolic, and pulse pressure in essential hypertension. *Circulation*. 2001;104:783-789.
8. Franklin SS, Larson MG, Khan SA, Wong ND, Leip EP, Kannel WB, Levy D. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2001;103:1245-1249.

9. Asmar R, Rudnichi A, Blacher J, London GM, Safar ME. Pulse pressure and aortic pulse wave are markers of cardiovascular risk in hypertensive populations. *Am J Hypertens*. 2001;14:91-97.
10. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Pede S, Porcellati C. Ambulatory pulse pressure: a potent predictor of total cardiovascular risk in hypertension. *Hypertension*. 1998;32:983-988.
11. van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks AP, van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Association between arterial stiffness and atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Stroke*. 2001;32:454-460.
12. Herrington DM, Kesler K, Reiber JC, Davis W, Brown WV, Helms R, Mallon SM, Raines J. Arterial compliance adds to conventional risk factors for prediction of angiographic coronary artery disease. *Am Heart J*. 2003;146:662-667.
13. Lekakis JP, Ikonomidis I, Protopgerou AD, Papaioannou TG, Stamatelopoulos K, Papamichael CM, Mavrikakis ME. Arterial wave reflection is associated with severity of extracoronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2006;13:236-242.
14. Verhave JC, Fesler P, du CG, Ribstein J, Safar ME, Mimran A. Elevated pulse pressure is associated with low renal function in elderly patients with isolated systolic hypertension. *Hypertension*. 2005;45:586-591.
15. Lau C, Deschepper CF, Cupples WA. Inheritance of blood pressure traits in normotensive Brown Norway rats, Wistar Kyoto rats, and their offspring. *FASEB J*. 2005;19:A1136. Abstract
16. Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M, Deschepper CF. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*. 2001;31:24-26.
17. Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*. 2003;19:889-890.

18. Lander ES, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 1989;121:185-199.
19. Lander ES, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet*. 1995;11:241-247.
20. Manly KF, Olson JM. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm Genome*. 1999;10:327-334.
21. Churchill GA, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 1994;138:963-971.
22. Manichaikul A, Dupuis J, Sen S, Broman KW. Poor performance of bootstrap confidence intervals for the location of a quantitative trait locus. *Genetics*. 2006;E-pub prior to print.
23. Bielinski SJ, Lynch AI, Miller MB, Weder A, Cooper R, Oberman A, Chen YD, Turner ST, Fornage M, Province M, Arnett DK. Genome-wide linkage analysis for loci affecting pulse pressure: the Family Blood Pressure Program. *Hypertension*. 2005;46:1286-1293.
24. Camp NJ, Hopkins PN, Hasstedt SJ, Coon H, Malhotra A, Cawthon RM, Hunt SC. Genome-wide multipoint parametric linkage analysis of pulse pressure in large, extended utah pedigrees. *Hypertension*. 2003;42:322-328.
25. DeStefano AL, Larson MG, Mitchell GF, Benjamin EJ, Vasan RS, Li J, Corey D, Levy D. Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2004;44:152-155.
26. Atwood LD, Samollow PB, Hixson JE, Stern MP, MacCluer JW. Genome-wide linkage analysis of pulse pressure in Mexican Americans. *Hypertension*. 2001;37:425-428.
27. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:932-943.
28. Chamiot CP, Renaud JF, Blacher J, Legrand M, Samuel JL, Levy BI, Sassard J, Safar ME. Collagen I and III and mechanical properties of conduit arteries in rats with genetic hypertension. *J Vasc Res*. 1999;36:139-146.

29. Behmoaras J, Osborne-Pellegrin M, Gauguier D, Jacob MP. Characteristics of the aortic elastic network and related phenotypes in seven inbred rat strains. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H769-H777.
30. Harris EL, Stoll M, Jones GT, Granados MA, Porteous WK, Van Rij AM, Jacob HJ. Identification of two susceptibility loci for vascular fragility in the Brown Norway rat. *Physiol Genomics*. 2001;6:183-189.
31. Gauguier D, Behmoaras J, Argoud K, Wilder SP, Pradines C, Bihoreau MT, Osborne-Pellegrin M, Jacob MP. Chromosomal mapping of quantitative trait loci controlling elastin content in rat aorta. *Hypertension*. 2005;45:460-466.
32. Churchill PC, Churchill MC, Bidani AK, Griffin KA, Picken M, Pravenec M, Kren V, St Lezin E, Wang JM, Wang N, Kurtz TW. Genetic susceptibility to hypertension-induced renal damage in the rat. Evidence based on kidney-specific genome transfer. *J Clin Invest*. 1997;100:1373-1382.
33. Wang X, Ajikobi DO, Salevsky FC, Cupples WA. Impaired myogenic autoregulation in kidneys of Brown Norway rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278:F962-F969.
34. Gray JE, van Zwieten MJ, Hollander CF. Early light microscopic changes in chronic progressive nephrosis in several strains of aging laboratory rats. *J Gerontol*. 1982;37:142-150.
35. Mos J, Hollander CF. Analysis of survival data on aging rat cohorts: pitfalls and some practical considerations. *Mech Ageing Dev*. 1987;38:89-105.

## Tables

**Table 1:** Phenotypic values in parents and progeny of crosses

cohort	n	SBP	DBP	PP	HR	Activity
WKY	10	122.3 ± 6.6	80.1 ± 5.9	42.1 ± 2.2	312 ± 12	3.5 ± 0.4
BN	16	103.9 ± 3.8*	71.6 ± 3.2*	32.3 ± 1.8*	319 ± 12	2.5 ± 1.7
F1	24	109.2 ± 4.6	74.3 ± 3.9	34.9 ± 3.8	315 ± 11	2.4 ± 1.0
F2	166	114.8 ± 6.6	77.1 ± 5.4	37.7 ± 4.1	316 ± 19	2.6 ± 0.8
Estimated degree of genetic determination		0.25	0.20	0.36	N/A	N/A

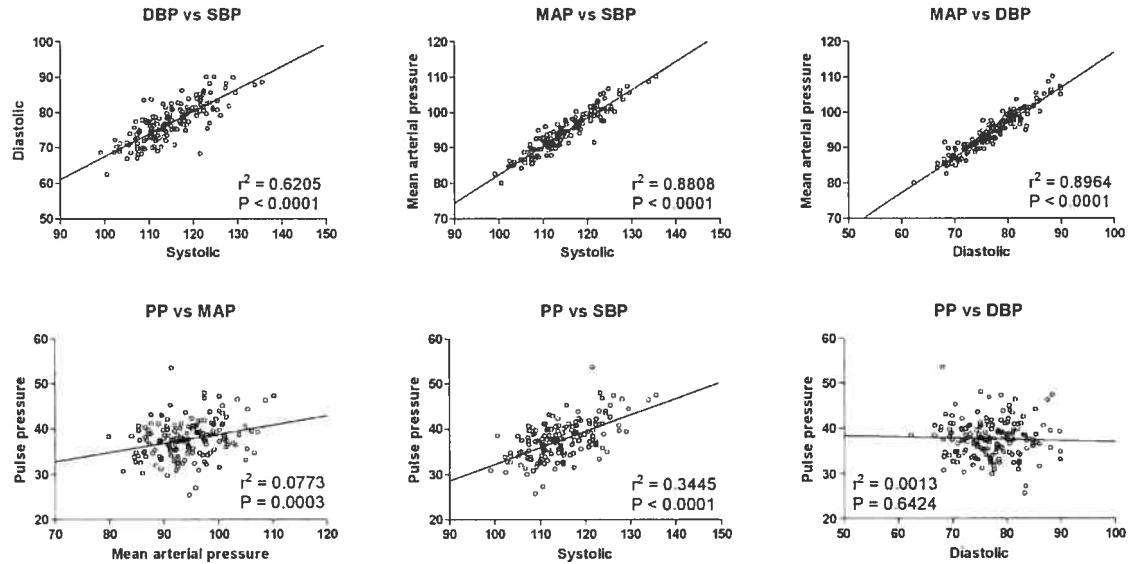
\*P < 0.01 vs. WKY

Table 2 : Characteristics of QTLs

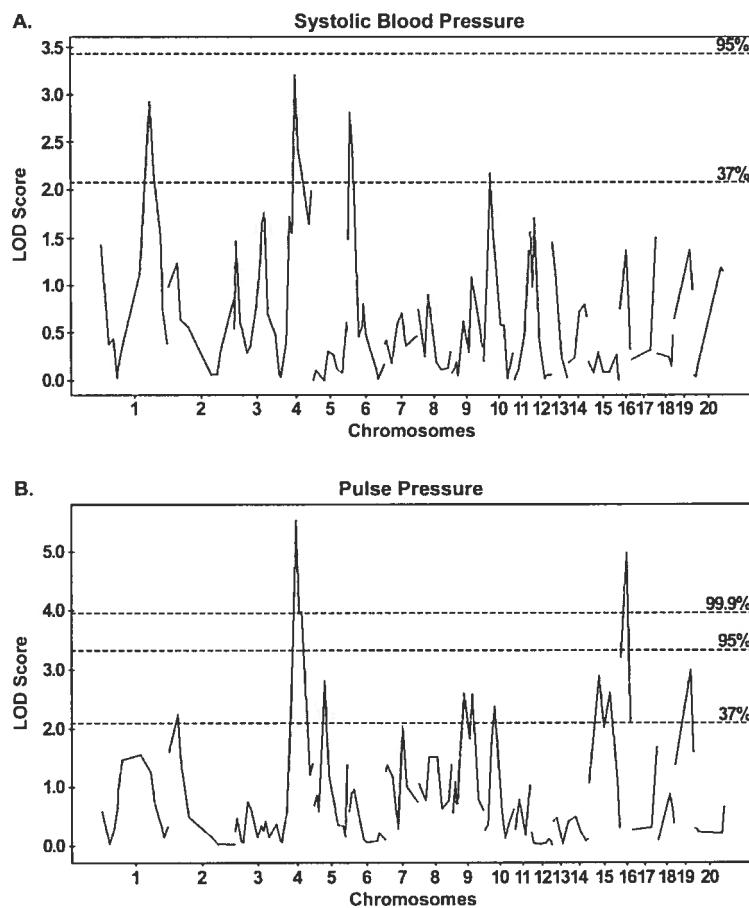
QTL	Chr	Properties	Peak Marker	LOD	Pos (cM)	C.I. (cM)	Dom	BN/BN	BN/WKY	WKY/WKY
<i>Ppl</i>	4	Highly significant	D4Wox2	5.51	59	50-65	BN	35.6 ± 3.7†	37.2 ± 3.8†	39.8 ± 4
<i>Sbp1</i>	4	Suggestive	D4Wox2	3.18	58	48-100	BN	112.3 ± 6.4†	114.1 ± 5.9†	117.5 ± 7.2
<i>Pp2</i>	16	Highly significant	D16Rat66	4.97	23	5-30	WKY	35.2 ± 4.0†	38.3 ± 4.0	38.9 ± 3.6
<i>Pp3</i>	2	suggestive	D2Mgh14	2.27	32	1-44	WKY	36.3 ± 4.2*	38.3 ± 4.0	38.4 ± 3.9
<i>Pp4</i>	5	suggestive	D5Mit9	2.78	42	30-53	BN	38.1 ± 3.7*	38.6 ± 4.3†	36.0 ± 3.7
<i>Pp5</i>	9	suggestive	D9Rat85	2.77	76	65-87	BN	38.7 ± 4.3*	38.3 ± 4.0*	36.2 ± 3.1
<i>Pp6</i>	10	suggestive	D10Mit4	2.36	37	18-57	WKY	39.2 ± 4.3†	36.8 ± 4.1	38.0 ± 3.5
<i>Pp7</i>	15	suggestive	D15Mgh2	2.90	38	20-56	BN	38.9 ± 5.1†	38.2 ± 3.4*	36.0 ± 3.9
<i>Pp8</i>	19	suggestive	D19Rat7	2.99	59	16-66	WKY	35.9 ± 3.7*	37.9 ± 4.2	39.3 ± 3.4
<i>Sbp2</i>	1	suggestive	D1Mgh11	2.92	185	158-217	WKY	111.8 ± 5.8†	115.2 ± 6.1	116.5 ± 6.8
<i>Sbp3</i>	6	suggestive	D6Rat86	2.74	10	3-22	WKY	112.1 ± 6.2†	116.4 ± 6.6	115.3 ± 6.7
<i>Sbp4</i>	10	suggestive	D10Rat44	2.20	24	13-40	WKY	117.6 ± 7.5†	113.5 ± 6.4	115.4 ± 6.1

\*: P &lt; 0.05 vs. WKY; †: P &lt; 0.01 vs. WKY; \*: P &lt; 0.001 vs. WKY.

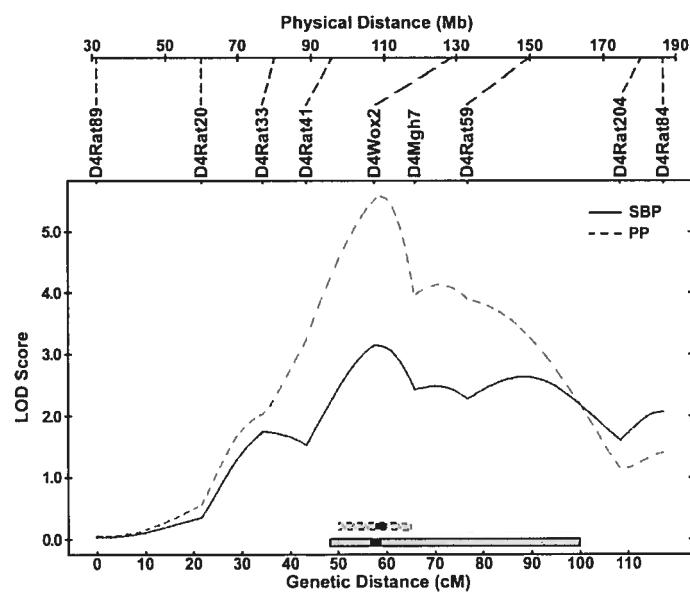
## Figures



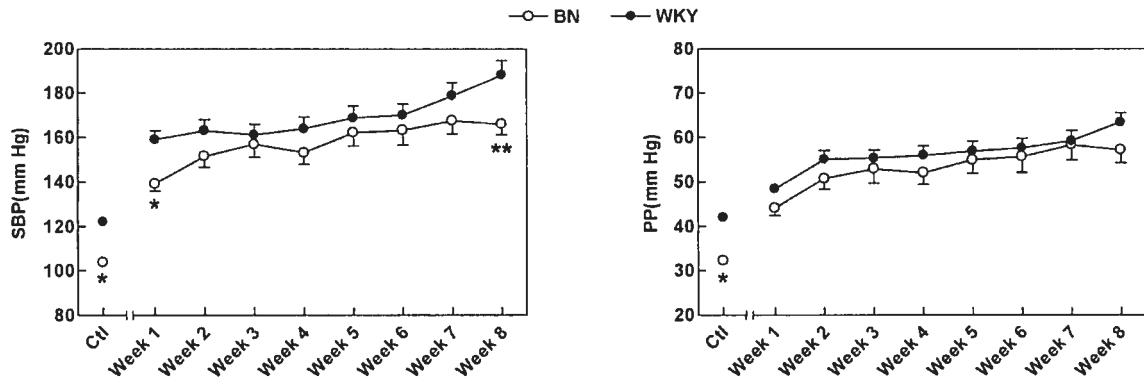
**Figure 1:** Correlations between the values of DBP vs SBP, MAP vs DBP or SBP, and PP vs MAP, DBP or SBP. The values of the  $r^2$  correlation coefficients and the significance levels of each correlation are as indicated.



**Figure 2:** Whole-genome linkage probability plots for SBP (A) and PP (B). The dotted lines represent the suggestive ( $p < 0.63$ ), significant ( $p < 0.05$ ) and highly significant ( $p < 0.001$ ) thresholds as determined by permutation tests.



**Figure 3:** Linkage probability plots for SBP (plain line) and PP (dashed line) across chromosome 4. Grey bars represent C.I. calculated by the 1-LOD support interval method, with the black square placed at the peak position of each QTL. The position of genetic markers and the corresponding physical distances are shown at the top of the graph.



**Figure 4:** Temporal evolution of the values of SBP (left panel) and PP (right panel) in either BN (hollow markers) or WKY (plain markers) from 1 to 8 weeks after 2K-1C surgery. Ctl is the baseline value before surgery, whereas recordings for Week1 started 12-14 days after surgery. All values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 14-18$ ). For SBP, the effect of strain and time were both significant ( $p < 0.001$ ). For PP, the effect of strain and time were both significant ( $p < 0.03$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Asterisks indicate values that were significantly different (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ) at particular time-points.

## **Chapitre 4 : Cartographie génétique de QTLs liés à la masse cardiaque et à la morphologie des cardiomyocytes dans une population de souris recombinantes consanguines.**

*And a mouse is a miracle enough to stagger  
sextillions of infidels*

Walt Whitman (*Leaves of grass*)

## Contribution des auteurs à la préparation de l'article 3

J'ai effectué la totalité des mesures phénotypiques, avec l'aide ponctuelle de Sylvie Picard et de Sonia Bélanger. L'ensemble de ces données a servi aux analyses dont les résultats sont présentés dans les figures 1, 2, 3, 4, 5 et les tableaux 1, 2, 3.

J'ai effectué la totalité des analyses statistiques présentées dans l'article, incluant la cartographie de QTL (figures 1, 2, 3, 4 et tableaux 2, 3).

J'ai écrit l'article sous la supervision de Christian F. Deschepper.

**Article 3 : Cardiac mass and cardiomyocyte size are governed by different genetic loci on either autosomes or chromosome Y in recombinant inbred mice**

Authors: Bastien Llamas, Sonia Bélanger, Sylvie Picard, Christian F. Deschepper<sup>†</sup>

Running head: Genetics of cardiac mass and cardiomyocyte size

Address : Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7, and Université de Montréal

<sup>†</sup> Corresponding author: Phone: (514) 987 5759

Fax: (514) 987 5585

E-mail: [REDACTED]

## Abstract

Left ventricular hypertrophy is one of the main risk factors for cardiovascular mortality and morbidity. It has been proposed that hypertrophic stimuli act for a great part by increasing the size of cardiomyocytes, and that the latter characteristic is a necessary condition to differentiate left ventricular hypertrophy from other benign forms of cardiac enlargement. To test if the same genetic loci control the size of cardiomyocytes and left ventricular mass, we performed whole-genome linkage analyses in a panel of 24 recombinant inbred AXB/BXA mouse strains. Whereas one major locus was linked to left ventricular mass in both males and females, loci linked to the size of cardiomyocytes were clearly distinct and showed sex-specific linkage. Moreover, the parental origin of chromosome Y had strong effects on the size of cardiomyocytes in male mice, but did not affect left ventricular mass. In addition of showing that genetic loci that increase the size of cardiomyocytes are not necessarily linked to increased left ventricular mass, our findings have important consequences on how to evaluate cardiac phenotypes when performing genetic manipulations in mice, and in determining the cause of sex-specific differences when using models derived from C57BL/6J mice.

**Keywords:** Cardiac hypertrophy; Cardiovascular genomics; Linkage analysis; Quantitative trait locus.

## Introduction

Numerous clinical studies have repeatedly and convincingly shown that increased left ventricular mass (LVM) is highly predictive of cardiovascular morbidity and mortality (4;10;15;30;41). Inappropriately high LVM is known as left ventricular hypertrophy (LVH). However, it is difficult to set a threshold that differentiates benign cardiac enlargement from maladaptive LVH, because cardiovascular risk increases continuously and proportionally with LVM over a wide range of LV mass values, even those extending below what had often been considered as the "upper normal" limit (10;41). Another difficulty relates to the fact that changes in LVM may result from differences in the number (hyperplasia) or size (hypertrophy) of cardiomyocytes (CMs), in the number of non-CM cells (primarily fibroblasts), and/or in the composition of the extracellular matrix (17). Consequently, there is no simple definition of what LVH corresponds to at the cellular level. The fact that most signaling pathways that lead to LVH have been identified on the basis of their effect on the size of neonatal rat cultured cardiomyocytes suggests that increased size of cardiomyocytes is an important feature of LVH (23). Consequently, it has been proposed that any phenotypic characterization of LVH should test whether CMs are enlarged, and that increased size of CMs is one essential feature that distinguishes LVH from other benign forms of cardiac enlargement (17;21). A natural extension of this postulate is that genes and/or pathways leading to LVH are the same as those that affect CM size. This has led in part to the common practice of measuring CM size to determine whether increased LVM in genetically-modified mice truly corresponds to LVH (17).

Genetic crosses between normotensive rodents (to date, mostly rats) have made it possible to identify loci and/or genes linked to LVM independently of blood pressure (5;13;25;31;42;46). However, it has never been verified systematically to what extent genes controlling LVM overlap with those controlling the size of CMs in such crosses. This is difficult to test in genetic inter- or backcrosses, because precise measurement of the size of CMs requires their isolation from adult hearts (20), and this procedure is not

compatible with measurements of LVM. An alternative tool for linkage studies is that provided by panels of recombinant inbred (RI) strains, where each strain contains a particular combination of genes from the 2 parental strains consolidated by inbreeding (11). This makes it possible to perform multiple phenotyping, since each individual within a particular strain share the same genotype. For instance, the panel of AXB/BXA RI strains has been constructed from reciprocal crosses between A/J and C57BL/6J mice (34). Although both strains are normotensive, it has been reported that LV from C57BL/6J mice harbored an eccentric hypertrophy in comparison to A/J counterparts (24). We therefore used this panel to perform linkage analyses and compare the genetic pathways that control LVM and the size of CMs.

## Materials and methods

### *Experimental animals*

All procedures on animals were approved by the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) Institutional Animal Care Committee and conducted according to guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care. Breeding trios for the parental A/J and C57BL/6J strains, the chromosome-substitution (consomic) A/J-chrYC57BL/6J/NaJ and C57BL/6J-chrYA/J/NaJ strains, and the recombinant inbred (RI) AXB/PgnJ and BXA/PgnJ strains were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). For simplicity, all RI strains and consomic are identified hereafter without the PgnJ or NaJ suffix, respectively. As females from some RI strains (BXA1, BXA2, BXA12 and BXA26) were known to be poor mothers, they were substituted with ovariectomized C3SnSmn.CB17-Prkdcscid/J females implanted with ovaries from the corresponding RI strains by the Jackson Laboratory technical services, and mated to males from the cognate RI strain. All animals were then bred in the IRCM pathogen-free animal facility. To test for parent-of-origin effects, reciprocal F1 progenies were generated by mating either A/J males with C57BL/6J females (B6AF1) or C57BL/6J males with A/J females (AB6F1). According to a published note from the Jackson Laboratory (2), some nominally independent AXB/BXA RI strains are near duplicates. Thus we chose only one sister strain per duplicate group: AXB13 [related to AXB14 (now called AXB13a)] and AXB18 [now called AXB19a, related to AXB19, and AXB20 (now called AXB19b)]. A total of 13 AXB (AXB1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 18, 23 and 24) and 11 BXA (BXA1, 2, 4, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 24, 25) were used in the current study. The BXA26 strain was discarded because of breeding problems. All animals were used at 12 weeks of age for phenotyping procedures.

### *Tissue collection*

Tissues were collected from 7-11 male and female individuals for each strain (either parental, consomic or RI) or F1 cross. On the day of tissue collection, each mouse was weighed for determination of whole body weight (BW), killed by cervical dislocation, and several tissues (heart, thymus, adrenal glands and kidneys) were collected. Heart ventricles were dissected into right ventricle (RV, without the septal wall) and left ventricle (LV; including the septal wall). Each tissue was blotted dry and weighed individually. Relative tissue weights were then calculated for LV (LVW/BW), RV (RVW/BW), thymus (TW/BW), both adrenal glands (AW/BW) and both kidneys (KW/BW).

### ***Cardiomyocytes isolation and videomicroscopy***

Cardiomyocytes (CMs) were isolated from 4-5 male and female individuals for each strain (either parental, consomic or RI) or F1 cross. After inducing anesthesia, the heart was quickly removed from each mouse, mounted for cardiac retrograde aortic perfusion, and CMs were isolated as described (47). After the last Ca<sup>2+</sup> restoration, cells were fixed for 10 min in 80 mM phosphate buffer containing 1.5% glutaraldehyde, a solution shown to preserve all dimensions of isolated CMs (22). After pelleting fixed cells by gravity for ~10 min, they were resuspended in 100 mM phosphate buffer, and examined with an Axiovert S100TV microscope (Zeiss) with slight modifications vs. our previously published procedure (14). In short, the profiles of cells were visualized by autofluorescence (excitation 540 nm, emission 620 nm) and their image captured with a Retiga EXi monochrome camera (Qimaging, Surrey, BC, Canada). The area, length, width and width/length ratio of ~100 CMs per heart were measured using the public domain Java image processing program ImageJ (40).

### ***Blood pressure measurements***

To measure diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP), mean arterial pressure (MAP), pulse pressure (PP) and heart rate (HR) in conscious unrestrained mice, 3 male and female individuals from each strain (parental or RI) or F1 cross were implanted under isoflurane anesthesia with telemetry devices (Data Sciences International, St. Paul, MN). The catheter of the implant was inserted into the aortic branch through the left carotid, maintained by two ligatures, and the body of the transmitter was inserted into a subcutaneous pocket at the right inguinal level. Animals were allowed one week to recover from surgery, and all measured values were then recorded for 48 hours. Males from the BXA14 and BXA24 strains were discarded because of consistent post-implantation behavioral problems.

### ***QTL mapping***

Genotype data [either single nucleotide polymorphisms (SNP) or simple sequence length polymorphisms (SSLP)] were obtained from GeneNetwork ([www.genenetwork.org](http://www.genenetwork.org)) and edited to remove unused strains and loci with identical strain distribution patterns. Undefined genotypes in sister strains were edited using original data from the Wellcome Trust Center for Human Genetics ([www.well.ox.ac.uk/mouse](http://www.well.ox.ac.uk/mouse)) and the Mouse Genome Informatics ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)). A total of 965 autosomal and 29 X-specific polymorphic markers were used. None of the quantitative trait values were transformed, as they all conformed to the normal distribution according to the D'Agostino test for normality. Genome-wide scans were performed separately in males (using only autosomal markers) and females (using both autosomal and X-linked markers).

Analyses were done in three stages as previously described (43), using the R/qtl package (6). First, main QTL effects were detected by performing single-QTL genome scans. Significance thresholds were set at the  $p < 0.63$  (suggestive) and  $p < 0.05$  (significant) levels as suggested previously (28;33). Thresholds were calculated on the basis of permutation tests (1000 permutations) performed on the data sets themselves (16).

Confidence intervals (CI) were determined by calculating the 1.5-LOD support interval, as recommended recently (32). On the basis of the values of CM size obtained in reciprocal F1 and consomic animals (Fig. 1), the genome scans for CM size components were performed in males by defining the parental origin of chromosome Y (chr Y) as a covariate in either additive or interactive models. The interactive model was used when it yielded significant QTLs whose LOD score differed from the scores calculated by the additive model by a value  $> 2.0$  (27). The second step consisted of performing a two-QTL, two-dimensional genome scan for all traits to detect potential epistatic interactions. As single QTL analysis is based on its marginal effect and does not take into account other loci, the third step used a multiple regression model to re-evaluate the statistical linkage of each locus to the phenotype of interest in the context of all other loci (identified as either QTLs or suggestive loci by the single-locus scans). Using this analysis, terms that fail to meet significance thresholds under the new criteria are eliminated one at a time, and the analysis is repeated until all remaining loci are significant. This method also calculates the contribution of each significant locus to the total variance, based on adjusted (type III) sums of squares (SS), as well as the percentage of the total variance is accounted for by all combined loci.

### ***Statistics***

Differences between groups were evaluated by t-tests or one-way ANOVA followed by Keul's post-hoc analysis. Correlations between phenotypes were evaluated by calculating r<sup>2</sup> values on the basis of linear regression. All calculations were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

## Results

### *Phenotypic analyses*

In parental strains, LVW/BW (but not BW or RVW/BW) was higher in C57BL/6J mice than in its A/J counterparts; likewise, the surface area of CMs from C57BL/6J was greater than that of A/J counterparts (Table 1). Both strains were normotensive, with MAP and SBP being slightly more elevated (by ~10 mmHg) in male (but not female) C57BL/6J mice. Phenotypic values for other traits are compiled in the supplemental data (Tables S1, S2).

Analysis of the reciprocal AB6F1 and B6AF1 crosses revealed a strong parent-of-origin effect on the size of CMs in males, but not in females (Table 1 and Fig. 1A). To test the potential contribution of chr Y from each strain, we used reciprocal consomic strains C57BL/6J-chrYA/J [C57BL/6J mice carrying the non-pseudoautosomal region (NPAR) of chr Y from A/J] and A/J- chrYC57BL/6J (A/J mice carrying the NPAR of chr Y from C57BL/6J), and tested whether substituting the NPAR of chr Y between the C57BL/6J and A/J strains affected the size of CMs. We found that the presence of chrY from C57BL/6J into pure (C57BL/6J or A/J) or mixed (F1) genetic backgrounds was associated with increased size of CMs in comparison to counterpart strains carrying chr Y from A/J (Fig. 1A). In contrast to CM size, LVW/BW did not differ between consomic strains and their corresponding host strain (data not shown), or between reciprocal F1 animals (Table 1).

Distributions of the trait values among all 24 RI strains are shown in supplemental data (Tables S1, S2). All strains were normotensive, but there was a significant correlation of the LVW/BW values with that of telemetric MAP; however, the values of the correlation coefficients ( $r^2 = 0.23$ ,  $P < 0.05$  in males; and  $r^2 = 0.27$ ,  $P < 0.01$  in females) indicated that MAP was not responsible for more than 23-27 % of the variance of the LVW/BW values (Fig 1B). In contrast, there was no correlation between CM size and MAP. Of note, CM surface area provides is a very robust and precise phenotype. Accordingly, the intra-strain

coefficient of variability of CM surface area averaged ~3% in either males or females, whereas CM surface area in strains with the largest CMs was up to 42% higher than in strains with the smallest CMs. Moreover, despite the fact that LVW/BW and CM size were both greater in C57BL/6J than in A/J, the 2 traits segregated independently when examined in all 24 RI strains (Fig. 1B).

### ***QTL mapping***

After the single-locus scan, we detected significant QTLs for LVW/BW and CM size components (Fig. 2, Table 2), but not for any of the other phenotypes measured, including blood pressure values and normalized weight of other tissues (data not shown). For LVW/BW, we detected one major QTL (named QTL Lvm1 for Left Ventricular Mass QTL 1) showing linkage in both sexes (Fig. 2 and Fig 3). Interestingly, the A/J allele at the closest marker to Lvm1 was linked to the highest phenotypic value, despite the fact that the A/J parental strain had a lower LVW/BW than C57BL/6J. QTLs linked to CM size components were different in males and females and clearly distinct from Lvm1 (Fig. 2). In females, one major QTL on chr 14 (named Cms1 for Cardiac Myocyte Size QTL 1) was linked to both CM area and length (Fig. 2 and Fig 3). A peak showing the same profile at the same position also showed suggestive linkage to CM width. This suggested that both length and width contributed to the variance of CM area, as confirmed by the multiple regression model (see below). In females, another QTL on chr 5 (named Cms2) showed significant linkage to CM width only. In males, given that the origin of chr Y had a strong effect on CMs from either reciprocal F1s or consomic strains (Fig. 1A), genome scans for CM size components in males were performed by defining the parental origin of chr Y as a covariate. Using the additive model, one major QTL (named Cms3) showed significant linkage to both CM area and width (Fig. 2). Although found on chr 5, the profile and location of Cms3 in males was clearly distinct from that of Cms2 in females (Fig. 3).

The two-QTL, two-dimensional genome scan did not detect any epistatic interaction between the autosomal QTLs in both males and females. However, to test possible interactions of QTLs with chr Y in males, we repeated the single-locus scan by setting the origin of chr Y as an interactive covariate. This analysis revealed two additional QTLs that were not detected in the previous analysis: Cms4 on chr 10 (linked to CM area and width) and Cms5 (linked to CM length) (Fig 4). All the above QTLs (along with their positions, LOD score and phenotypic effects) are summarized in Table 2.

To re-evaluate the importance of chr Y and the single scan-QTLs in the context of all other loci (either significant or suggestive), build the final linkage model and calculate which percentage of the total variance is accounted for by all loci, all data were recalculated using the multiple regression model. The results (Table 3) show that: 1) both in males and females, Lvm1 contributed for a large part of the variance (~31 %) of LVW/BW; 2) in females, Cms1 and Cms2 each contributed to a large part of the variance of CM size components; 3) some loci other than QTLs identified by single-locus scans contributed to part of the variance of LVW/BW (both in male and females) and CM size components (in females); 4) in males, chr Y (as well as its interactions with Cms4 and Cms5) contributed to a large part of the variance of CM size components (ranging from 15-32%); and 5) other QTLs contributing individually to CM size components in males were Cms1, Cms2 and Cms3.

## Discussion

The present study allowed us to identify for the first time natural genetic variants that control CM size in mice. Most of these loci were sex-specific, and, importantly, were different and distinct from the major QTL Lvm1 that controlled LVM in both sexes. The distinct influence of loci controlling LVM and CM size was reinforced when examining the effects of the origin of alleles on the phenotypes. Indeed, strains with AA genotypes for Lvm1 had greater LVM than their BB counterparts, whereas the CMs strains with BB genotypes at all Cms loci had increased size compared to their AA counterparts. Interestingly, regulation of the width and the length of CMs has been suggested to correspond to different biologic processes controlled by different regulation pathways, with increased width corresponding to the addition of sarcomeres in parallel, while increased length corresponds to the addition of sarcomeres in series (3;38). This notion is compatible with our findings showing that (in addition to the effects of chrY): 1) in females, Cms1 was linked to both area and length of CMs, whereas Cms2 was linked only to CM width; and 2) in males, Cms 3 and Cms4 were linked to both area and width of CMs, whereas Cms5 was linked only to CM length. Others had suggested that beyond absolute values, the width/length ratio of CMs was a very conserved and tightly regulated phenotype (20). However, in contrast to absolute values of CM size, we did not detect in the present study any QTL linked to this relative ratio.

None of the QTLs identified in the present study showed any obvious overlap with QTLs previously reported (either by us or by others) as being linked to LVM, either in mice or syntenic regions in other species. Neither did we identify within these QTLs any obvious candidate genes on the basis of their known function. However, the latter strategy suffers from limitations, as it has been shown that it may distract from identifying genes that are truly linked to a trait but could not have been suspected on the basis of their known functions (39). Identification of culprit genes will therefore need to wait until congenic lines further narrow the regions of interest.

Of note, others had previously used the same panel of AXB/BXA RI mice to acquire cardiac phenotypes by M-mode echocardiography and estimate LVM, but these authors did not report on association of a QTL with LVM (36). However, we have verified that there was no correlation between the values of LVW/BW acquired by ourselves with the values of LVM estimated on the basis of non-invasive echocardiography. We postulate that, despite its utility in evaluating LV function and morphology in the very contrasted parental strains, this method does not have sufficient resolution to detect smaller differences in LVM in the RI strains that constitute this panel. In contrast to LVW/BW, the values we obtained for telemetric blood pressure were very similar to those published by others using the same method and the same parental C57BL/6J and A/J strains (35). However, we did not detect any QTL linked to any component of blood pressure, and the latter cannot therefore account for any of the phenotypic differences in LVW/BW or CM size.

It is well established that there are important differences between males and females in cardiac morphology, function and disease progression, both in humans and animal models (9;12;18;29). From a genetic standpoint, sex-specific differences in linkage from various studies do not manifest themselves in the same fashion for all loci. For instance, in a previous study with rats, QTLs linked to LVM in males were different from those linked to the same phenotype in females (31). This is in contrast to the present study, where there was a perfect match of the linkage profile of Lvm1 in both male and female mice. From a phenotypic standpoint, sex-specific differences concern many aspects of cardiac physiology and are more the rule than the exception (9;12;18;29). Although these differences may arise from multiple mechanisms (including differential effects of sex steroids), there has been evidence that chr Y carries genes that may affect cardiovascular outcome (8). Accordingly, chr Y variants have been linked to blood pressure in rats (19) and humans (44), as well as to cholesterol levels in the human population (7). However, the mechanism by which chr Y associated to these phenotypes has always been elusive, and has never been linked to a phenotype to the level of a well-defined cell type. In our study, we found that chr Y accounted for a large part of the variance of CM size, both in the background of

parental strains or in the mixed background of RI strains. The interactions of the responsible genes on chr Y with that of other QTLs (and how the latter differ from the ones linked to LVM) are summarized in part in Fig. 5. Outside of their effect on sex determination and germ cell function, the function of genes on chr Y are still poorly understood (26). It has been reported that chr Y from most mouse laboratory strains (including A/J and C57BL/6J) all originated from common male *Mus musculus molossinus* ancestors (37). However, it has recently been reported that chr Y polymorphisms in A/J and C57BL/6J mice are capable of modifying autoimmune disease susceptibility (45), indicating that some genetic drift in chr Y must have occurred. Accordingly, recent data indicate that ~10% of all 4935 identified SNPs on chr Y are polymorphic between A/J and C57BL/6J (1). Further experiments on the mechanisms responsible for the effect of chr Y on CM size might provide an important adjunct for understanding how genes on chr Y affect cardiovascular outcome.

Importantly, there is an ever-growing list of examples where the effects of gene manipulations in mice (resulting from either knockout, overexpression or dual targeting) on cardiomyopathy phenotypes differ between male and females (18). These differences concern survival, the level of hypertrophy and/or fibrosis, as well as dysfunction (18). The mechanisms responsible for these sex-specific differences have often not been resolved, but C57BL/6J mice are the preferred genetic background for most genetic manipulations. We do not know yet whether chr Y (beyond its effect on CM size) also affects cardiac function, particularly in the context of disease and perturbed genetic regulation. However, our data suggest that, at the very least, sex-specific differences in the C57BL/6J background should not be generalized to all mouse strains.

In summary, our data show that genetic loci that increase the size of CMs do not necessarily lead to increased LVM, and that different loci can even influence both phenotypes independently from each other. Consequently, one cannot assume that genetic modifications in animals should automatically alter both phenotypes to the same extent. We also found that chr Y from C57BL6/J harbors allelic variants that have strong effects on

the size of CMs. Since C57BL6/J mice are the preferred background for most genetic manipulations, the origin of chr Y should be assessed when genetic manipulations affect phenotypes in a sex-specific fashion in models derived from C57BL/6J mice.

## Acknowledgements

This work has been supported by the grant HL69122 from NIH/NHLBI and by grant MOP-64391 from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR).

## References

1. <http://mouse.perlegen.com/mouse/index.html> . 2007.
2. <http://jaxmice.jax.org/library/notes/504/504e.html> . 2007.
3. Aoki H, Sadoshima J, and Izumo S. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nature Medicine* 6: 183-188, 2000.
4. Benjamin EJ and Levy D. Why is left ventricular hypertrophy so predictive of mortality? *Am J Med Sci* 317: 168-175, 1999.
5. Boutin-Ganache I, Picard S, and Deschepper CF. Distinct gene-sex interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently. *Physiol Genomics* 12: 61-67, 2002.
6. Broman KW, Wu H, Sen S, and Churchill GA. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-890, 2003.
7. Charchar FJ, Tomaszewski M, Lacka B, Zakrzewski J, Zukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W, and Dominiczak AF. Association of the human Y chromosome with cholesterol levels in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 308-312, 2004.
8. Charchar FJ, Tomaszewski M, Strahorn P, Champagne B, and Dominiczak AF. Y is there a risk to being male? *Trends Endocrinol Metab* 14: 163-168, 2003.
9. Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, and Abrenica B. The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 93-109, 2006.
10. de Simone G, Verdecchia P, Pede S, Gorini M, and Maggioni AP. Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension. The MAVI study. *Hypertension* 40: 470-476, 2002.
11. Demant P. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nature Rev Genetics* 4: 721-735, 2003.
12. Deschepper CF and Llamas B. Hypertensive cardiac remodeling in males and females: from the bench to the bedside. *Hypertension* 49: 401-407, 2007.

13. Deschepper CF, Masciotra S, Zahabi A, Boutin-Ganache I, Picard S, and Reudelhuber T. Functional alterations of the Nppa promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ Res* 88: 222-227, 2001.
14. Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, and Rouleau JL. Characterization of left ventricular myocardium, isolated cardiomyocytes and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol* 82: H149-H155, 2002.
15. Devereux RB, de Simone G, Ganau A, and Roman MJ. Left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in hypertension: stimuli, functional consequences and prognostic implications. *J Hypertens* 12 (suppl. 10): S117-S127, 1994.
16. Doerge RW and Churchill GA. Permutation tests for multiples loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142: 285-294, 1996.
17. Dorn GW, Robbins J, and Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 92: 1171-1175, 2003.
18. Du XJ, Fang L, and Kiriazis H. Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 111: 434-475, 2006.
19. Ely D, Turner M, and Milsted A . Review of the Y chromosome and hypertension. *Braz J Med Biol Res* 33: 679-691, 2000.
20. Gerdes AM. The use of isolated myocytes to evaluate myocardial remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 2: 152-155, 1992.
21. Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Failure* 8: S264-S268, 2002.
22. Gerdes AM, Kriseman J, and Bishop SP. Morphometric study of cardiac muscle. The problem of tissue shrinkage. *Lab Invest* 46: 271-274, 1982.
23. Heineke J and Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 589-600, 2006.
24. Hoit BD, Kiatchoosakun S, Restivo J, Kirkpatrick D, Olszens K, Shao H, Pao Y-H, and Nadeau JH. Naturally occurring variation in cardiovascular traits among inbred strains of mice. *Genomics* 79: 679-685, 2003.

25. Innes BA, McLaughlin MG, Kapuscinski MK, Jacob HJ, and Harrap SB. Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* 31: 741-746, 1998.
26. Jobling MA and Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4: 598-612, 2003.
27. Korstanje R, Li R, Howard T, Kelmenson P, Marshall J, Paigen B, and Churchill G. Influence of sex and diet on quantitative trait loci for HDL cholesterol levels in an SM/J by NZB/BINJ intercross population. *J Lipid Res* 45: 881-888, 2004.
28. Lander ES and Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet* 11: 241-247, 1995.
29. Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 112: 302-307, 2003.
30. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, and Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *N Engl J Med* 322: 1561-1566, 1990.
31. Llamas B, Jiang Z, Rainville M-L, Picard S, and Deschepper CF. Distinct QTLs are linked to cardiac left ventricular mass in a sex-specific manner in a normotensive inbred rat intercross. *Mamm Genome* 16: 700-712, 2005.
32. Manichaikul A, Dupuis J, Sen S, and Broman KW. Poor performance of bootstrap confidence intervals for the location of a quantitative trait locus. *Genetics* 174: 481-489, 2006.
33. Manly KF and Olson JM. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm Genome* 10: 327-334, 1999.
34. Marshall JD, Mu JL, Cheah YC, Nesbitt MN, Frankel WN, and Paigen B. The AXB and BXA set of recombinant inbred mouse strains. *Mamm Genome* 3: 669-680, 1992.
35. Mattson DL. Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *Am J Hypertens* 14: 405-408, 2001.

36. Nadeau JH, Burrage LC, Restivo J, Pao YH, Churchill G, and Hoit BD. Pleiotropy, homeostasis, and functional networks based on assays of cardiovascular traits in genetically randomized populations. *Genome Res* 13: 2082-2091, 2003.
37. Nagamine CM, Nishioka Y, Moriwaki K, Boursot P, Bonhomme F, and Lau YF. The musculus-type Y chromosome of the laboratory mouse is of Asian origin. *Mamm Genome* 3: 84-91, 1992.
38. Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, and Olson EN. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J* 20: 2757-2767, 2001.
39. Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, Lu S, Akerstrom B, and Holmdahl R. Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet* 33: 25-32, 2003.
40. Rasband, W. S. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006.
41. Schillaci G, Verdecchia P, Porcellati C, Cuccurullo O, Cosco C, and Perticone F. Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension* 35: 580-586, 2000.
42. Sebkhi A, Zhao L, Lu L, Haley CS, Nunez DJR, and Wilkins MR. Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats. Results from an F344xWKY cross. *Hypertension* 33: 949-953, 1999.
43. Sen S and Churchill GA. A statistical framework for quantitative trait mapping. *Genetics* 159: 371-387, 2001.
44. Shankar RR, Charchar FJ, Eckert GJ, Saha C, Tu W, Dominiczak AF, and Pratt JH. Studies of an association in boys of blood pressure and the Y chromosome. *Am J Hypertens* 20: 27-31, 2007.
45. Teuscher C, Noubaude R, Spach K, McElvany B, Bunn JY, Fillmore PD, Zachary JF, and Blankenhorn EP. Evidence that the Y chromosome influences autoimmune disease in male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8024-8029, 2006.

46. Tsujita Y, Iwai N, Tamaki S, Nakamura Y, Nishimura M, and Kinoshita M. Genetic mapping of quantitative trait loci influencing left ventricular mass in rats. Am J Physiol 279: H2062-H2067, 2000.
47. Zhou Y-Y, Wang S-Q, Zhu W-Z, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, and Xiao R-P. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. Am J Physiol 279: H429-H436, 2000.

## Tables

**Table 1:** Phenotypic values in parental strains and F1s

Trait	Males				Females			
	A/J	C57BL/6J	AB6F1	B6AF1	A/J	C57BL/6J	AB6F1	B6AF1
<i>BW</i> (g)	23.6 (2.1)	22.9 (2.0)	28.5 (2.4)	24.6 (0.8)	17.6 (1.1)	18.6 (0.9)	21.9 (0.8)	19.9 (1.6)
<i>LW/BW</i>	2.69 (0.33)	3.41 (0.31)***	3.46 (0.16)	3.51 (0.22)	3.05 (0.12)	3.39 (0.16)***	3.70 (0.20)	4.04 (0.30)
<i>RW/BW</i>	0.87 (0.14)	0.81 (0.17)	0.84 (0.10)	0.91 (0.11)	0.92 (0.14)	0.84 (0.13)	0.90 (0.10)	1.10 (0.10)
<i>CM area</i> ( $\mu\text{m}^2$ )	2825 (87)	3682 (121)***	3105 (55)	2737 (122)***	2599 (54)	2826 (51)*	2602 (68)	2757 (62)
<i>CM length</i> ( $\mu\text{m}$ )	133.2 (2.0)	160.1 (1.6)***	144.7 (2.1)	132.9 (1.8)***	125.8 (0.9)	136.4 (1.2)***	132.5 (1.1)	135.1 (1.8)
<i>CM width</i> ( $\mu\text{m}$ )	21.1 (0.5)	22.9 (0.6)**	21.3 (0.1)	20.5 (0.7)	20.7 (0.3)	20.6 (0.3)	19.6 (0.4)	20.4 (0.3)
<i>MAP</i> (mmHg)	105.4 (2.6)	115.6 (5.1)*	115.8 (7.5)	100.0 (5.0)*	114.2 (2.9)	108.2 (2.8)	103.5 (2.0)	105.5 (4.7)
<i>DBP</i> (mmHg)	90.2 (3.3)	101.7 (7.7)	106.7 (7.3)	89.5 (3.4)*	98.8 (4.4)	90.7 (2.8)	87.3 (2.1)	87.8 (5.9)
<i>SBP</i> (mmHg)	118.4 (2.0)	128.6 (2.9)*	124.8 (8.6)	110.9 (5.5)	128.0 (3.4)	123.7 (3.5)	117.8 (1.9)	121.6 (3.0)
<i>PP</i> (mmHg)	27.7 (0.9)	26.8 (4.8)	17.8 (1.2)	21.1 (5.5)	27.2 (8.0)	33.0 (2.9)	30.5 (2.0)	33.7 (4.7)
<i>HR</i> (bpm)	580 (43)	586 (43)	536 (9)	537 (15)	671 (31)	606 (29)	577 (21)	584 (48)

For all traits, differences are between parental strains or between reciprocal F1s in each sex. Results correspond to mean (SD). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001.

**Table 2:** Summary of all QTLs detected by single-locus scans

QTL	Trait	Sex	Chr	Peak, cM (Mb)	1.5-LOD CI, cM	Peak Marker	LOD	AA	BB
<i>Lvm1</i>	LW/LBW	F	13	31.0 (57.8)	25.1-40.1	mCV22624058	4.97	3.65 (0.14)	3.29 (0.22) ***
<i>Lvm1</i>	LW/LBW	M	13	31.0 (57.8)	25.1-36.0	mCV22624058	4.99	3.54 (0.20)	3.14 (0.15) ***
<i>Cms1</i>	CM area	F	14	54.4 (93.9)	52.1-55.9	rs13482334	4.07	2552 (176)	2929 (186) ***
<i>Cms1</i>	CM length	F	14	54.4 (93.9)	48.7-61.7	rs13482334	3.70	127.8 (6.25)	138.7 (4.4) ***
<i>Cms2</i>	CM width	F	5	52.4 (64.9)	48.7-59.7	gnf05.060.451	3.96	20.0 (0.6)	21.1 (1.0) **
<i>Cms3</i>	CM area	M	5	83.6 (103.5)	66.0-98.0	rs3663200	3.70 <sup>a</sup>	2923 (203)	3406 (305) ***
<i>Cms3</i>	CM width	M	5	83.6 (103.5)	83.0-95.7	rs3663200	4.37 <sup>a</sup>	21.3 (0.7)	23.3 (1.1) ***
<i>Cms4</i>	CM area	M	10	37 (63.9)	35.6-41.5	rs13480623	5.40 <sup>b</sup>	-	-
<i>Cms4</i>	CM width	M	10	37 (63.9)	36.0-41.5	rs13480623	7.06 <sup>b</sup>	-	-
<i>Cms5</i>	CM length	M	4	2.9 (20.6)	0.0-4.4	rs13477595	4.55 <sup>b</sup>	-	-

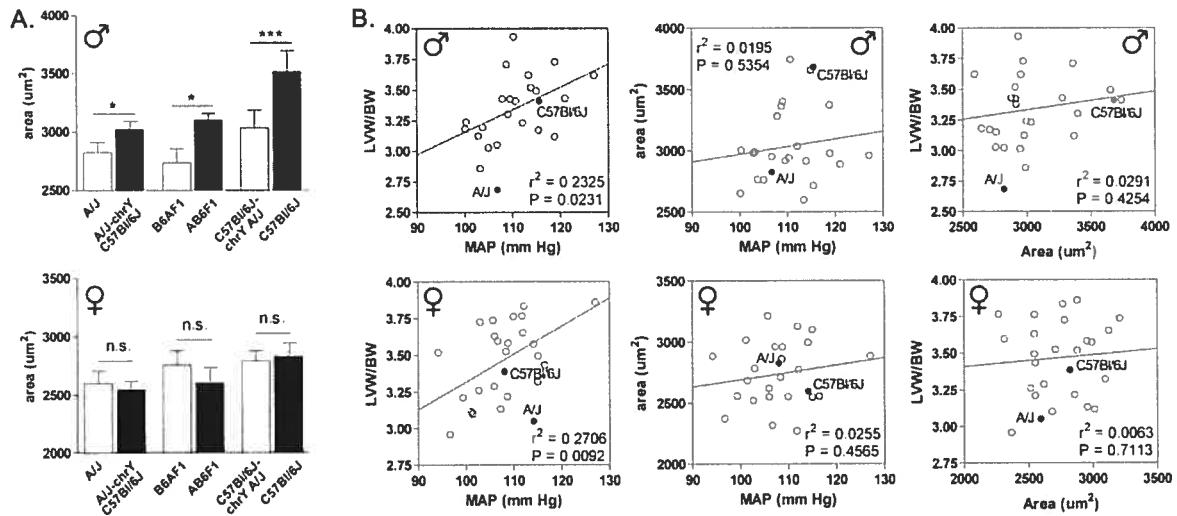
The names of peak markers correspond to SNP identifiers. AA and BB are phenotypic values according to the genotype of the peak marker, shown as mean (SD). \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001. <sup>a</sup>LOD scores calculated with chrY as an additive covariate; <sup>b</sup>LOD scores calculated with origin of chrY as an interactive covariate (see Fig. 4B for illustration of the interactive effect of chr Y with *Cms4* and *Cms5*).

**Table 3:** Multiple regression analysis of QTLs and other loci

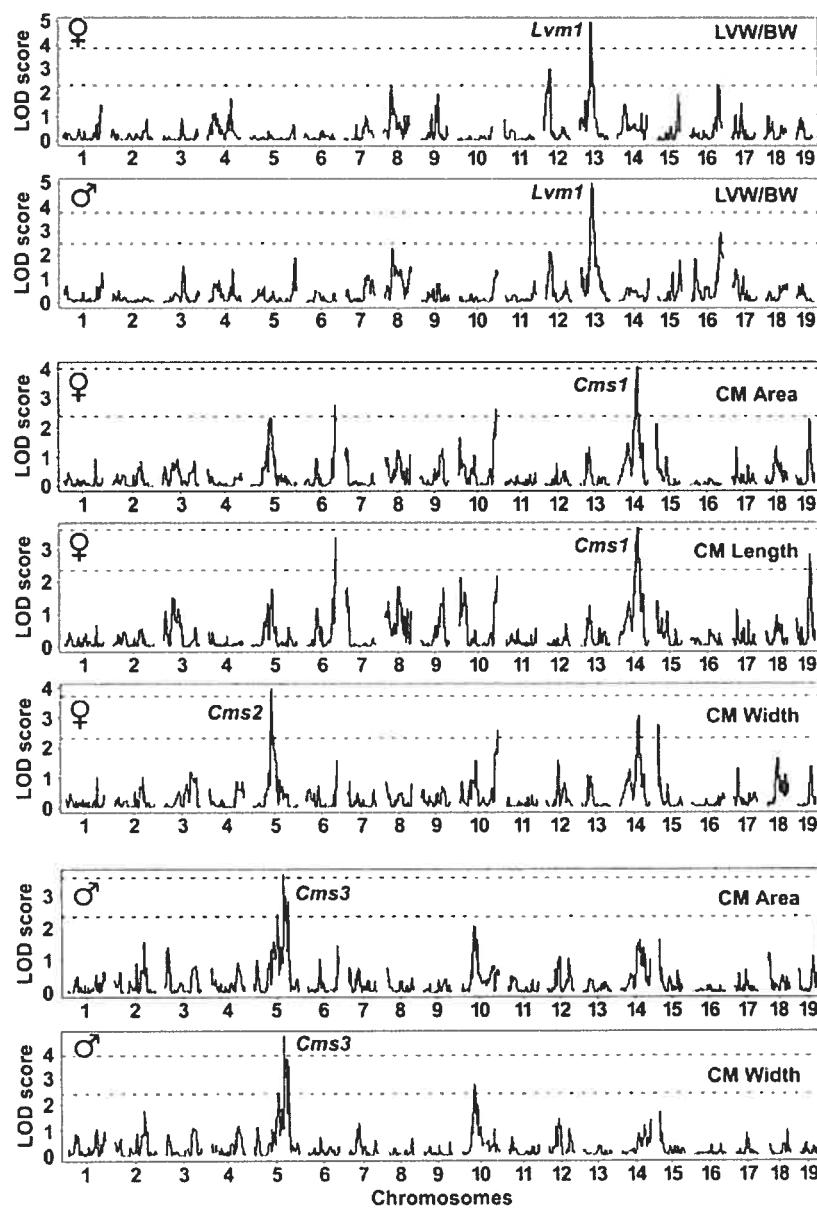
Trait	Sex	Locus	DF	% var	P
LV/BW	F	<i>Lvm1</i>	1	32.6	0.000114
		Chr16@78.5	1	7.9	0.029921
LV/BW	M	<i>Lvm1</i>	1	30.2	8.25 x 10 <sup>-5</sup>
		Chr16@83.1	1	12.7	0.00476
CM area	F	<i>Cms1</i>	1	36.5	1.28 x 10 <sup>-5</sup>
		Chr10@105.8	1	21.9	0.000256
CM length	F	<i>Cms1</i>	1	32.7	3.71 x 10 <sup>-5</sup>
		Chr19@37.0	1	23.9	0.000219
CM width	F	<i>Cms2</i>	1	20.0	0.00291
		<i>Cms1</i>	1	9.7	0.029
CM area	M	<i>Cms3</i>	1	6.8	0.03386
		<i>Cms4</i>	2	20.9	0.00292
		ChrY	2	24.7	0.00137
		<i>Cms4</i> x ChrY	1	14.8	0.00319
CM length	M	<i>Cms1</i>	1	8.1	0.0031996
		<i>Cms2</i>	2	26.7	0.001988
		ChrY	2	32.6	0.000764
		<i>Cms5</i> x ChrY	1	23.0	0.000991
CM width	M	<i>Cms3</i>	1	8.6	0.004257
		<i>Cms4</i>	2	23.1	0.000169
		ChrY	2	21.6	0.000246
		<i>Cms4</i> x ChrY	1	15.4	0.000342

DF: degrees of freedom. The percent variances are based on adjusted (type III) sums of squares (SS). Loci other than named QTLs are identified on the basis of their chromosome and position on the chromosome (in CentiMorgans). For all traits, the calculated contribution of all combined loci to the total variance averaged 73.2% (SD 6%) (ranging from 63 to 84.5%).

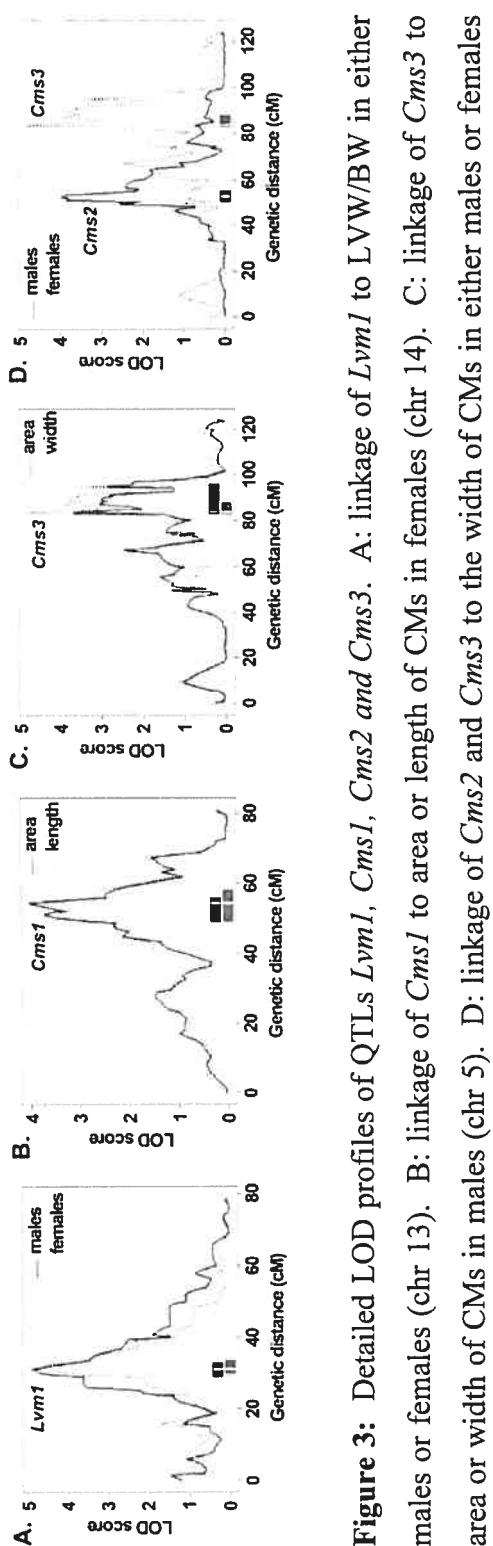
## Figures



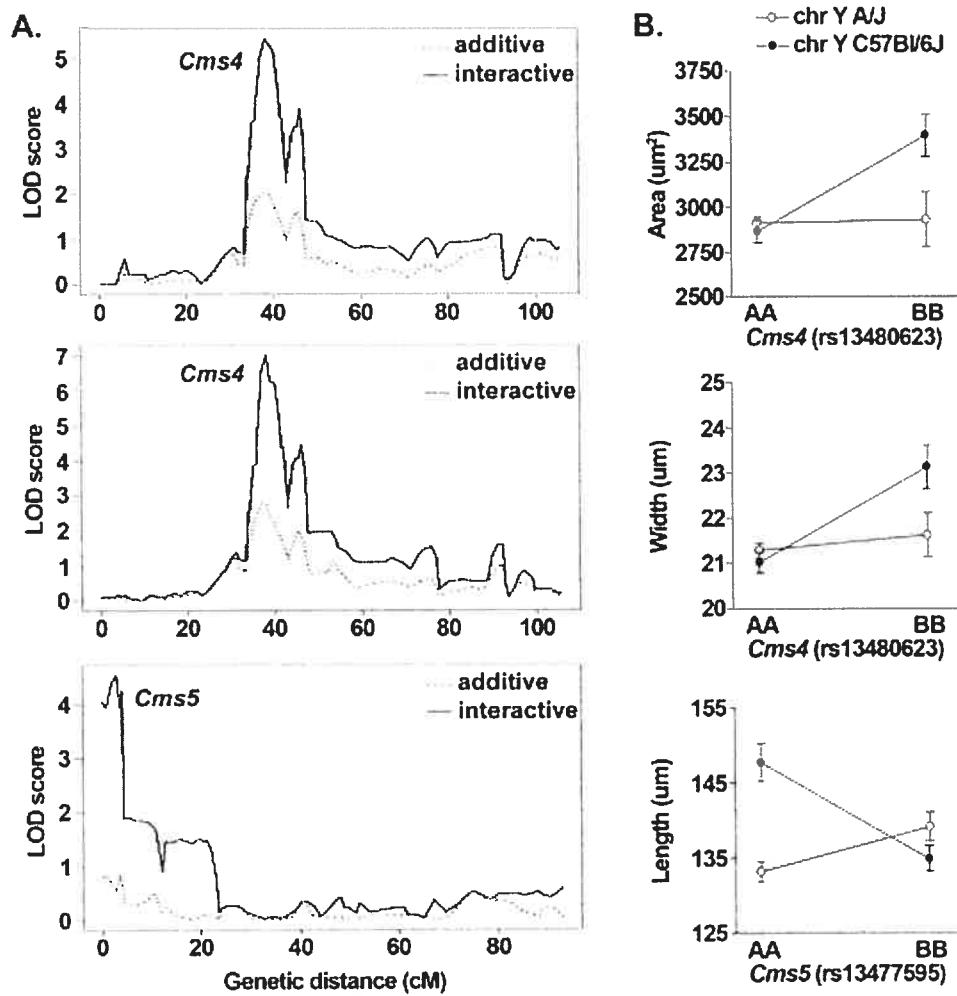
**Figure 1:** Phenotype analysis of consomic and RI strains. A: Each pair of black and white bars represent the CM area of two strains which differ genetically only for the chrY. Results are mean (SD). \*, p < 0.05; \*\*\*, p < 0.001; n.s.: not significant. B: Correlations between the values of LVW/BW, MAP and area of CMS. Correlations were calculated considering all RI strains (empty circles); parental strains are shown (black circles) but were not included in the calculations.



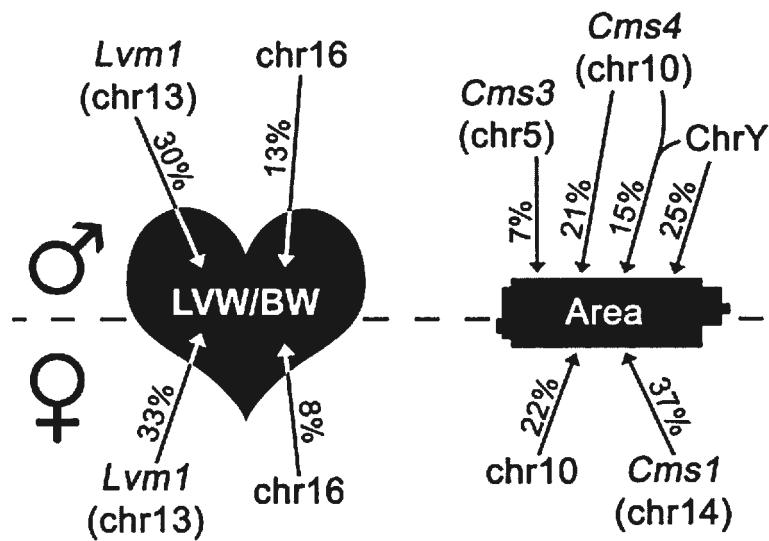
**Figure 2:** Single-locus genome-wide scans in males and females. Only peaks showing significant linkage ( $p < 0.05$ ) have been identified by a QTL name. For females, chr X is not shown since there was no QTL mapped on it. Analyses were done separately in both sexes. For CM area and width in males, analyses were done with the origin of chrY as an additive covariate. Lower and upper dotted lines represent suggestive ( $p = 0.63$ ) and significant ( $p = 0.05$ ) thresholds respectively.



**Figure 3:** Detailed LOD profiles of QTLs *Lvm1*, *Cms1*, *Cms2* and *Cms3*. A: linkage of *Lvm1* to LVW/BW in either males or females (chr 13). B: linkage of *Cms1* to area or length of CMs in females (chr 14). C: linkage of *Cms3* to area or width of CMs in males (chr 5). D: linkage of *Cms2* and *Cms3* to the width of CMs in either males or females (chr 5).



**Figure 4:** Interactive effects of chr Y with QTLs *Cms4* and *Cms5*. A: linkage profile of *Cms4* to either surface area or width of CMs (chr 10), and of *Cms5* to the length of CMs (chr 4), setting the origin of chr Y as a covariate using the additive (stippled line) or interactive (plain line) fashion. In each case, the increase in LOD score obtained when using the interactive model is  $> 2$ . B: phenotypic effects of chr Y alleles as a function of the genotypes of peak markers corresponding to QTLs *Cms4* and *Cms5*.



**Figure 5:** Summary of main phenotypic effects and respective contributions of loci to corresponding traits. The same loci account for a significant part of the variance of LVW/BW in both males and females, but show no overlap with loci contributing to the variance of the surface area of CMs in either males or females. In males, Chr Y accounts for a significant part of the variance of the surface area of CMs, either by itself or by interacting with *Cms4*. Loci identified solely by their chromosomal location correspond to those that were not significant after the single-locus scan but were identified after multiple regression analysis. Other contributions of loci to either width or length of CMs are detailed in Table 3.

## Supplemental data

**Table S1:** Phenotypic values in males from parental and RI strains and F1s

males	CM area	CM length	CM width	BW	LW/ BW	RW/ BW	TW/ BW	AW/ BW	KW/ BW	DBP	SBP	MAP	PP	HR
AJ	2825.32 (87.01)	133.21 (2.02)	21.12 (0.47)	23.63 (2.14)	2.685 (0.328)	0.868 (0.137)	1.543 (0.473)	0.167 (0.061)	13.12 (0.86)	90.17 (3.30)	118.36 (2.03)	105.36 (2.63)	27.70 (2.63)	579.82 (0.92)
C57BL/6J	3681.77 (121.15)	160.11 (1.64)	22.94 (0.56)	22.91 (2.03)	3.408 (0.312)	0.812 (0.165)	1.068 (0.284)	0.314 (0.069)	9.38 (0.88)	101.74 (7.66)	128.57 (2.94)	115.63 (5.05)	26.80 (4.78)	586.28 (43.43)
AB6F1	3105.21 (55.23)	144.74 (2.07)	21.32 (0.11)	28.54 (2.35)	3.463 (0.157)	0.841 (0.097)	1.380 (0.452)	0.126 (0.047)	15.19 (1.11)	106.75 (7.29)	124.76 (8.57)	115.77 (7.48)	17.77 (1.24)	536.14 (9.41)
B6AF1	2736.81 (121.82)	132.92 (1.76)	20.50 (0.69)	24.58 (0.81)	3.507 (0.223)	0.906 (0.109)	1.552 (0.373)	0.134 (0.044)	13.96 (1.11)	89.52 (3.43)	110.93 (5.46)	100.04 (5.03)	21.14 (5.48)	536.65 (15.3)
AXB1	3656.25 (165.82)	152.44 (5.93)	23.99 (0.72)	24.64 (1.17)	3.492 (0.127)	0.816 (0.088)	1.460 (0.221)	0.114 (0.045)	14.03 (0.63)	99.82 (0.53)	128.66 (2.88)	115.08 (1.49)	28.81 (2.52)	644.51 (31.23)
AXB2	2647.56 (40.27)	130.21 (1.08)	20.24 (0.41)	24.96 (2.10)	3.180 (0.151)	0.843 (0.125)	1.630 (0.235)	0.111 (0.036)	15.38 (1.09)	84.89 (1.57)	113.89 (1.79)	100.17 (1.48)	29.00 (1.42)	579.82 (8.63)
AXB4	3281.37 (128.60)	135.02 (3.63)	24.19 (0.53)	18.68 (2.64)	3.427 (0.115)	0.843 (0.278)	1.212 (0.036)	0.142 (0.036)	11.89 (0.76)	90.94 (1.99)	124.05 (2.05)	107.95 (1.94)	33.10 (0.48)	596.87 (30.46)
AXB5	2999.32 (62.45)	139.41 (2.46)	21.46 (0.59)	23.65 (1.37)	3.238 (0.157)	0.793 (0.114)	1.372 (0.213)	0.151 (0.027)	15.51 (1.36)	85.09 (3.21)	113.79 (2.90)	100.37 (2.84)	28.66 (1.05)	631.53 (54.64)
AXB6	3364.92 (121.42)	149.74 (2.58)	22.48 (0.58)	24.93 (2.57)	3.705 (0.319)	0.691 (0.076)	0.902 (0.121)	0.118 (0.020)	13.29 (0.72)	93.48 (4.69)	122.83 (8.64)	108.81 (6.22)	29.33 (4.21)	576.78 (21.61)
AXB8	3740.60 (131.78)	155.81 (0.99)	23.92 (2.81)	22.18 (0.171)	3.408 (0.092)	0.817 (0.299)	0.816 (0.036)	0.086 (0.036)	12.31 (0.71)	91.74 (2.73)	128.31 (2.63)	110.74 (2.71)	36.53 (1.21)	604.21 (2.21)
AXB10	2911.91 (111.76)	139.76 (1.85)	20.78 (0.59)	24.36 (1.44)	3.517 (0.101)	0.828 (0.056)	1.926 (0.343)	0.106 (0.012)	10.23 (0.71)	97.53 (3.70)	128.18 (0.99)	113.96 (2.17)	30.61 (3.06)	626.80 (25.66)
AXB12	3399.38 (92.01)	146.19 (2.65)	23.13 (0.54)	25.13 (0.128)	3.301 (0.079)	0.658 (0.175)	1.687 (0.031)	0.125 (0.031)	11.31 (0.70)	94.24 (4.47)	122.88 (3.66)	109.14 (4.21)	28.62 (1.11)	566.32 (42.45)
AXB13	2594.47 (54.07)	127.82 (2.81)	20.28 (0.50)	21.57 (0.174)	3.618 (0.079)	0.795 (0.127)	1.203 (0.040)	0.107 (0.040)	13.00 (0.83)	97.39 (5.74)	128.83 (1.89)	113.50 (3.29)	31.41 (3.88)	612.82 (16.48)

	<b>males</b>	<b>CM</b>	<b>CM</b>	<b>CM</b>	<b>BW</b>	<b>LW/</b>	<b>RW/</b>	<b>TW/</b>	<b>AW/</b>	<b>KW/</b>	<b>DBP</b>	<b>SBP</b>	<b>MAP</b>	<b>PP</b>	<b>HR</b>
		<b>area</b>	<b>length</b>	<b>width</b>	<b>BW</b>	<b>BW</b>	<b>BW</b>	<b>BW</b>	<b>BW</b>	<b>BW</b>					
<b>AXB15</b>	2938.14	139.32	21.05	24.87	3.929	0.840	1.221	0.093	13.47	97.23	122.50	110.37	25.20	555.45	
	(103.87)	(1.95)	(0.57)	(1.67)	(0.301)	(0.074)	(0.119)	(0.040)	(1.10)	(5.00)	(4.50)	(1.87)	(8.74)	(36.08)	
<b>AXB18</b>	2956.47	134.63	21.90	25.06	3.616	0.863	1.555	0.106	14.82	108.23	146.02	127.14	37.75	594.84	
	(123.70)	(2.75)	(0.60)	(2.12)	(0.157)	(0.085)	(0.293)	(0.038)	(1.27)	(4.75)	(3.51)	(3.64)	(1.70)	(45.47)	
<b>AXB23</b>	3034.08	142.61	21.20	24.24	3.230	0.719	1.248	0.129	14.20	98.21	124.27	112.19	26.01	608.18	
	(14.18)	(2.32)	(0.36)	(1.37)	(0.222)	(0.059)	(0.336)	(0.023)	(1.37)	(3.91)	(5.31)	(4.52)	(1.54)	(17.34)	
<b>AXB24</b>	2917.00	137.67	21.22	22.04	3.424	0.871	1.330	0.098	11.18	97.18	121.70	109.63	24.50	616.12	
	(142.73)	(2.71)	(1.04)	(1.17)	(0.169)	(0.119)	(0.244)	(0.027)	(0.94)	(4.95)	(4.25)	(3.08)	(6.59)	(33.93)	
<b>BXA1</b>	2989.38	137.40	21.77	28.50	2.858	0.629	1.019	0.134	13.67	88.36	116.27	103.29	27.86	589.62	
	(108.66)	(3.30)	(0.26)	(2.82)	(0.186)	(0.070)	(0.186)	(0.023)	(0.91)	(2.68)	(5.21)	(3.97)	(2.68)	(40.54)	
<b>BXA2</b>	2948.25	137.18	21.41	27.62	3.050	0.885	1.142	0.107	14.17	91.82	119.51	106.78	27.69	651.67	
	(114.87)	(2.08)	(0.63)	(2.74)	(0.264)	(0.131)	(0.423)	(0.032)	(1.02)	(0.99)	(3.09)	(1.74)	(2.90)	(27.91)	
<b>BXA4</b>	2974.51	138.94	21.39	24.49	3.725	0.943	1.261	0.104	14.18	101.70	134.53	118.98	32.80	593.26	
	(141.91)	(2.04)	(1.00)	(1.70)	(0.128)	(0.124)	(0.279)	(0.018)	(0.81)	(4.76)	(1.12)	(3.02)	(3.66)	(16.51)	
<b>BXA11</b>	3371.20	146.61	22.93	25.46	3.117	0.784	1.321	0.119	13.05	100.13	135.97	118.87	35.78	606.39	
	(168.66)	(1.70)	(0.86)	(2.21)	(0.292)	(0.069)	(0.120)	(0.023)	(0.74)	(4.99)	(5.14)	(4.93)	(3.47)	(43.29)	
<b>BXA12</b>	2885.26	132.96	21.70	19.50	3.430	0.840	1.383	0.156	12.41	102.65	138.51	121.07	35.79	680.31	
	(101.40)	(3.16)	(1.06)	(1.44)	(0.367)	(0.151)	(0.230)	(0.038)	(0.49)	(7.57)	(5.24)	(6.28)	(2.48)	(24.51)	
<b>BXA13</b>	2979.87	137.71	21.58	22.67	3.122	0.769	1.180	0.150	15.83	90.78	114.54	102.90	23.65	543.78	
	(54.58)	(2.58)	(0.46)	(1.60)	(0.198)	(0.117)	(0.142)	(0.030)	(0.63)	(3.43)	(1.12)	(1.11)	(4.33)	(30.11)	
<b>BXA14</b>	2921.64	136.29	21.43	30.88	3.380	0.805	1.107	0.109	10.80	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	
	(129.40)	(3.16)	(0.55)	(2.25)	(0.334)	(0.061)	(0.283)	(0.016)	(0.90)						
<b>BXA16</b>	2757.99	131.20	20.89	24.25	3.026	0.694	1.491	0.115	13.91	93.59	115.64	105.02	22.08	634.50	
	(71.22)	(1.16)	(0.37)	(2.57)	(0.119)	(0.045)	(0.353)	(0.032)	(0.56)	(6.47)	(3.84)	(5.13)	(2.92)	(18.76)	
<b>BXA17</b>	2711.25	130.37	20.70	23.90	3.170	0.749	1.532	0.095	9.85	99.76	130.13	115.47	30.33	599.84	
	(88.31)	(2.09)	(0.48)	(1.68)	(0.184)	(0.127)	(0.168)	(0.035)	(0.73)	(8.44)	(4.17)	(4.64)	(9.40)	(39.99)	
<b>BXA24</b>	2823.87	137.10	20.49	27.28	3.021	0.702	1.507	0.104	12.00	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	
	(162.18)	(2.80)	(0.81)	(1.19)	(0.140)	(0.052)	(0.209)	(0.017)	(0.92)						
<b>BXA25</b>	2761.14	130.29	21.14	25.26	3.194	0.793	1.192	0.111	13.59	88.85	117.02	103.80	28.14	607.40	
	(107.63)	(3.18)	(0.46)	(2.77)	(0.228)	(0.087)	(0.142)	(0.028)	(0.93)	(0.55)	(1.81)	(0.96)	(2.24)	(24.97)	

Results are mean (SD).

**Table S2:** Phenotypic values in females from parental and RI strains and F1s

<b>males</b>	<b>CM area</b>	<b>CM length</b>	<b>CM width</b>	<b>LW/BW</b>	<b>RW/BW</b>	<b>TW/BW</b>	<b>KW/BW</b>	<b>AW/BW</b>	<b>DBP</b>	<b>SBP</b>	<b>MAP</b>	<b>PP</b>	<b>HR</b>	
<b>A/J</b>	2599.36 (53.56)	125.83 (0.95)	20.70 (0.28)	17.63 (1.08)	3.053 (0.115)	0.922 (0.136)	2.374 (0.479)	0.312 (0.070)	12.90 (0.67)	98.83 (4.37)	127.99 (3.36)	114.24 (2.95)	27.17 (3.36)	670.95 (30.51)
<b>C57BL/6J</b>	2826.36 (51.28)	136.43 (1.18)	20.61 (0.26)	18.57 (0.88)	3.387 (0.155)	0.837 (0.133)	2.248 (0.511)	0.270 (0.095)	12.33 (0.53)	90.70 (2.85)	123.71 (3.52)	108.16 (2.76)	32.98 (2.76)	606.20 (28.46)
<b>AB6F1</b>	2601.61 (67.80)	132.52 (1.07)	19.55 (0.41)	21.89 (0.78)	3.695 (0.203)	0.895 (0.101)	1.840 (0.276)	0.274 (0.070)	14.17 (0.84)	87.30 (2.07)	117.85 (1.90)	103.51 (1.97)	30.53 (1.97)	576.81 (20.71)
<b>B6AF1</b>	2756.94 (62.07)	135.06 (1.76)	20.36 (0.30)	19.90 (1.60)	4.037 (0.303)	1.101 (0.098)	2.133 (0.507)	0.314 (0.043)	13.91 (0.85)	87.83 (5.85)	121.57 (3.04)	105.45 (4.70)	33.72 (3.57)	584.30 (48.20)
<b>AXB1</b>	3126.06 (91.22)	141.52 (1.72)	21.90 (0.50)	19.89 (1.08)	3.651 (0.299)	0.739 (0.113)	2.267 (0.280)	0.213 (0.066)	11.99 (0.58)	97.82 (2.29)	124.91 (0.70)	111.97 (1.54)	27.13 (1.54)	662.92 (25.32)
<b>AXB2</b>	2554.65 (47.68)	125.66 (2.10)	20.22 (0.36)	20.13 (1.67)	3.209 (0.234)	0.881 (0.116)	2.062 (0.440)	0.215 (0.066)	14.21 (0.99)	85.86 (1.41)	111.03 (2.90)	99.39 (0.95)	25.13 (2.90)	601.48 (42.27)
<b>AXB4</b>	2548.94 (57.24)	125.06 (0.72)	20.21 (0.36)	14.00 (1.51)	3.628 (0.340)	0.821 (0.113)	1.781 (0.411)	0.314 (0.076)	9.91 (1.07)	94.16 (6.90)	118.26 (7.52)	106.06 (6.60)	24.07 (8.75)	615.79 (35.16)
<b>AXB5</b>	2880.76 (52.39)	137.55 (1.52)	20.88 (0.23)	18.87 (1.76)	3.516 (0.185)	0.900 (0.092)	1.994 (0.256)	0.338 (0.040)	14.71 (0.68)	83.99 (2.88)	104.83 (7.70)	94.28 (6.22)	20.79 (4.95)	657.25 (31.69)
<b>AXB6</b>	2993.01 (33.38)	141.59 (0.86)	21.04 (0.27)	19.14 (1.45)	3.572 (0.185)	0.795 (0.113)	1.269 (0.200)	0.287 (0.046)	12.78 (1.35)	99.05 (0.96)	128.03 (1.96)	114.18 (0.73)	28.97 (2.69)	606.06 (18.83)
<b>AXB8</b>	3211.25 (80.26)	144.80 (2.25)	22.07 (0.31)	19.09 (1.40)	3.735 (0.189)	0.882 (0.078)	1.718 (0.646)	0.288 (0.126)	12.68 (0.87)	89.70 (2.50)	120.58 (1.84)	105.75 (2.91)	30.86 (2.95)	583.84 (49.45)
<b>AXB10</b>	2549.94 (63.19)	132.39 (0.76)	19.17 (0.39)	20.35 (1.79)	3.761 (0.148)	0.896 (0.083)	2.642 (0.529)	0.202 (0.036)	10.44 (0.63)	94.37 (1.40)	123.71 (0.29)	110.03 (0.76)	29.30 (1.30)	604.05 (9.17)
<b>AXB12</b>	2956.89 (54.43)	141.48 (0.47)	20.81 (0.35)	20.19 (2.86)	3.580 (0.332)	0.735 (0.086)	2.375 (0.344)	0.282 (0.032)	12.27 (1.80)	94.60 (1.80)	121.62 (3.89)	108.88 (7.11)	27.03 (5.25)	569.92 (40.05)
<b>AXB13</b>	2268.84 (67.03)	116.28 (2.15)	19.47 (0.22)	17.36 (1.18)	3.764 (0.157)	0.820 (0.070)	1.295 (0.324)	0.243 (0.057)	12.70 (0.45)	95.23 (4.98)	126.91 (1.99)	111.83 (3.13)	31.64 (4.31)	659.96 (40.25)
<b>AXB15</b>	2770.42 (29.89)	133.87 (0.89)	20.66 (0.21)	21.95 (1.09)	3.832 (0.179)	0.816 (0.107)	1.893 (0.233)	0.275 (0.040)	13.08 (0.80)	95.25 (0.58)	127.14 (0.24)	112.19 (0.36)	31.88 (0.62)	646.32 (44.50)

Results are mean (SD).

## Chapitre 5 : Le chromosome Y influence la réponse des cardiomycocytes aux androgènes chez la souris

*Any conclusion [...] has a wider inductive basis when inferred from an experiment in which the quantities of other ingredients have been varied.*

Sir Ronald Aylmer Fisher (The design of experiments)

## Introduction

Les chromosomes sexuels humains n'ont été complètement séquencés que récemment (Skaletsky et al, 2003; Ross et al, 2005). Le chr Y est le troisième plus petit avec une taille de 58 Mb (devant les chr 21, long de 47 Mb, et 22, long de 50 Mb). Les chr X et Y des mammifères placentaires partagent une petite région pseudoautosomale dont l'homologie est maintenue par recombinaison homologue obligatoire au moment de la méiose (Graves et al, 2006). Chez la souris, cette région pseudoautosomale est réduite à 720 kb, au niveau du télomère du bras long du chr Y (Yq) (Perry et al, 2001), et ne contient que le gène *Sts* (*Steroid sulfatase*) (Graves, 2006). Le reste du chromosome, spécifique des mâles, est une mosaïque de séquences répétées hétérochromatiques et de séquences euchromatiques qui ne subissent pas la recombinaison homologue. Les régions euchromatiques comportent de grandes structures palindromiques, qui permettraient de préserver certains gènes de la dégradation au cours de l'évolution par conversion génique (recombinaison non homologue) (Skaletsky et al, 2003; Rozen et al, 2003). Malgré ces observations, certains avancent l'hypothèse controversée que le chr Y humain disparaîtra d'ici 5 à 10 millions d'années (Marshall Graves, 2002).

La partie non recombinante du chr Y, spécifique des mâles, est celle à laquelle je ferai référence en parlant du chr Y dans le reste de la présente thèse. Elle inclut le bras court (Yp), et Yq sans la région pseudoautosomale. On dénombre seulement 10 gènes sur Yp, ordonnés du centromère vers le télomère de la façon suivante (Rohozinski et al, 2002) :

- *Rbmy1a1* : *RNA binding motif protein 1a1 on chr Y*; aussi appelé *Rbm*, *Rbm1*. Ce gène est présent en ~50 copies (Toure et al, 2005).
- *Sry* : *sex determining region of chr Y*; aussi appelé *Tdf*, *Tdy*.
- *Zfy2* : *zinc finger transcription factor 2 on chr Y*.
- *Usp9y* : *ubiquitin specific peptidase 9 on chr Y*; aussi appelé *Dffry*, *Faf12*.

- *Ddx3y* : DEAD box polypeptide 3 on chr Y; aussi appelé *Dby*, *DIPas1-rs1*.
- *Uty* : ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on chr Y; aussi appelé *Hydb*.
- *Eif2s3y* : eukaryotic translation initiation factor 2s3 on chr Y; aussi appelé *Spy*, *Tfy*, *Eif-2gy*.
- *Jarid1d* : jumonji, AT rich interactive domain 1D; aussi appelé *Smcy*.
- *Ubely1* : ubiquitin-activating enzyme E1 on chr Y; aussi appelé *Sby*, *Ube-2*, *Ubely*, *Als9Y-1*.
- *Zfy 1* : zinc finger transcription factor 2 on chr Y. Les gènes *Zfy1* et *Zfy2* sont issus d'une duplication récente chez la souris et présentent une très forte homologie de séquence (Johnston et al, 1998).

Yq porte quant à lui un grand nombre de copies (> 50 chacun) de 3 autres gènes distincts (Toure et al, 2004a; Toure et al, 2005) :

- *Ssty1* : spermiogenesis specific transcript 1 on chr Y; aussi appelé *Smy*.
- *Ssty2* : spermiogenesis specific transcript 2 on chr Y.
- *Sly* : *Sycp3 like Y-linked*.

Chez la souris, les seules fonctions élucidées des gènes du chr Y sont restreintes à la détermination du sexe mâle et à la reproduction (Polanco & Koopman, 2006; Graves et al, 2006). La fonction des gènes du chr Y en dehors des gonades est peu connue et essentiellement limitée aux rôles de quelques noyaux neuronaux (Arnold, 2004), du système mineur d'histocompatibilité (Simpson et al, 1997a) et aux maladies autoimmunes (Teuscher et al, 2006). Cependant, des polymorphismes du chr Y sont associés avec des caractères cardiovasculaires, incluant la PA et les niveaux de lipides plasmatiques chez

l'humain (Charchar et al, 2003; Jobling & Tyler-Smith, 2003; Charchar et al, 2004) et la PA chez le rat (Ely et al, 1997; Negrin et al, 2001; Kren et al, 2001).

L'identification d'effets phénotypiques de gènes du chr Y dans des cellules cardiovasculaires constituerait un bon point de départ pour élucider leurs mécanismes d'action, mais aucun n'a été identifié à ce jour. Dans le chapitre précédent, j'ai rapporté les effets du chr Y sur la régulation de la taille des cardiomyocytes, dans un ensemble de lignées recombinantes consanguines et de lignées consomiques dérivées des souches de souris A/J et C57BL/6J.

Pour expliquer ces résultats, l'hypothèse la plus parcimonieuse était que l'expression différentielle d'un ou plusieurs gènes du chr Y dans les cardiomyocytes aurait un impact sur leur morphologie, selon l'origine C57BL/6J ou A/J du chromosome. J'ai donc vérifié si un ou plusieurs gènes avaient une expression différentielle au cours du développement dans le VG de souris mâles C57BL/6J et consomiques C57BL/6J-chrY A/J. Un séquençage des gènes qui correspondaient à ces critères a été effectué sans aboutir à l'identification d'un polymorphisme.

Par la suite, je me suis intéressé à d'éventuels effets indirects des gènes du chr Y sur les cardiomyocytes, via les hormones sexuelles mâles. En effet, les cardiomyocytes contiennent des récepteurs aux androgènes fonctionnels qui médient l'hypertrophie cellulaire (Marsh et al, 1998). Des expériences de castration prépubertaire et de supplémentation en testostérone ont permis de suggérer que le chr Y des C57BL/6J sensibilise les cardiomyocytes aux effets de la testostérone.

Afin de mieux comprendre les différences observées lors des castrations et supplémentations en androgènes, j'ai finalement vérifié si l'origine du chr Y pouvait être liée à la régulation de la testostérone et/ou de son récepteur. Ainsi, la testostérone plasmatique a été dosée chez des mâles adultes des souches parentales et consomiques. J'ai aussi mesuré la distance ano-génitale chez des souriceaux de 4 jours. Cette distance, qui résulte de la croissance du périnée, est sensible à l'exposition aux androgènes durant la

gestation (Vom Saal, 1979). La distance ano-génitale renseigne donc sur la production fœtale de testosterone testiculaire, critique pour le développement du tractus génital sous contrôle androgénique. Enfin, j'ai mesuré l'expression du messager et de la protéine du récepteur aux androgènes.

## Matériel et méthodes

### *Animaux expérimentaux*

Toutes les expériences sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) et effectuées en accord avec les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux. Des trios de reproducteurs des souches de souris consanguines C57BL/6J, A/J et consomiques (C57BL/6J-chrY A/J et A/J-chrY C57BL/6J) ont été fournis par le Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Les reproductions ont ensuite été effectuées dans l'animalerie SPF (*specific pathogen-free*) de l'IRCM.

### *Amplifications génomiques par PCR*

Les cœurs de deux mâles C57BL/6J âgés de 12 semaines ont été prélevés. Les VG ont été rapidement disséqués, épongéss sur du papier absorbant, plongé dans de l'azote liquide puis réduits en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon. L'ADN génomique a été extrait et purifié à l'aide d'un kit commercial *DNeasy blood & tissue* (Qiagen Canada, Mississauga, ON). Après resuspension des échantillons dans du tampon T<sub>10</sub>E<sub>0.01</sub> (pH = 7.4), l'ADN a été quantifié par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 280 nm.

Une liste des gènes du chr Y a été établie à partir des versions successives *build 34*, *35* et *36* de la séquence du génome de souris, disponibles dans la base de données publique *Genome Bioinformatics* de l'Université de Californie à San Diego (UCSC, <http://www.genome.ucsc.edu>). Des paires d'oligonucléotides ont été conçues de telle sorte que l'amplicon soit localisé dans un intron (Tableau 3, page 195). Le gène *Sry* n'étant composé que d'un unique exon, l'oligonucléotide antisens est ancré dans la région 3' extra-génique. Les gènes *Zfy1* et *Zfy2* sont issus d'une récente duplication dans le génome de souris et présentent une trop forte homologie de séquence pour les discriminer par PCR

(Johnston et al, 1998). Une unique paire d'oligonucléotides a donc été utilisée pour les deux *Zfy*.

Pour les amplifications des gènes *Ddx3y* et *Eif2s3y* qui ont été ensuite séquencées, les séquences des paires d'oligonucléotides sont fournies dans le Tableau 4, page 196 et le Tableau 5, page 197.

Chaque réaction de PCR a été effectuée dans 20 µl de mélange réactionnel contenant 2.5 unités de *Taq* polymérase (Qiagen Canada, Mississauga, ON), 1x de tampon, 1x de solution Q, 200 µM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 0.5 µM d'oligonucléotide sens, 0.5 µM d'oligonucléotide antisens, 100 ng d'ADN, H<sub>2</sub>O distillée stérile. Les réactions ont été effectuées avec un thermocycleur PTC-225 DNA Engine Tetrad (MJ Research, Waltham, MA) de la façon suivante : 5 min de dénaturation à 95°C suivies de 30 cycles de 1 min de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et 30 sec (1 min pour les amplicons de plus de 500 pb) d'elongation à 72°C. Les produits d'amplification ont été visualisés sous lumière UV, après électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% contenant du bromure d'éthydium.

### ***Synthèse d'ADNc à partir d'ARN total***

Les cœurs, les quadriiceps, les cerveaux, les thymus, les poumons, les rates, les foies, les estomacs, les intestins grêles, les gros intestins, les reins, les pancréas, les glandes surrénales, les testicules, du gras péritonéal et les vessies de 2 mâles C57BL/6J âgés de 12 semaines ont été prélevés. Les VG ont été disséqués et les estomacs, pancréas, intestins et vessies ont été nettoyés dans du tampon phosphate 100 mM. Tous les tissus ont été rapidement épongés sur du papier absorbant, coupés en petits morceaux, puis plongés dans de l'azote liquide.

Pour l'expression ontogénique des gènes du chr Y, les cœurs de mâles C57BL/6J et C57BL/6J-chrY A/J ont été prélevés. Les groupes étaient composés dans chaque souche de

5 fœtus (E17.5), 5 nouveaux-nés, 5 juvéniles âgés de 1 semaine, 5 juvéniles âgés de 2 semaines et 5 adultes (12 semaines). Les VG ont été rapidement disséqués, épongés sur du papier absorbant, coupés en petits morceaux puis plongés dans de l'azote liquide.

L'ARN total a été extrait et purifié à l'aide d'un kit commercial *RNeasy minikit* (Qiagen Canada, Mississauga, ON), avec une étape de digestion de l'ADN afin d'éliminer tout contaminant génomique. Après resuspension des échantillons dans du tampon TE (pH = 8.0), l'ARN a été quantifié par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 260 nm. La pureté de l'ARN a été estimée avec le ratio des absorbances à 260 nm et 280 nm. L'ADNc a finalement été synthétisé à partir de 2 µg d'ARN total en utilisant le protocole standard fourni avec l'enzyme *Superscript II reverse transcriptase* (Invitrogen Canada, Burlington, ON).

### ***Amplification de l'ADNc par PCR***

Les paires d'oligonucléotides ont été conçues pour chevaucher au moins une jonction exon-exon (Tableau 6, page 198). Le gène *Sry* n'étant composé que d'un unique exon, une réaction de PCR a été effectuée à partir d'ARN total afin de contrôler pour une contamination génomique.

Chaque réaction de PCR a été effectuée dans 20 µl de mélange réactionnel contenant 2.5 unités de *Taq* polymérase (Qiagen Canada, Mississauga, ON), 1x de tampon, 1x de solution Q, 200 µM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 0.5 µM d'oligonucléotide sens, 0.5 µM d'oligonucléotide antisens, 100 ng d'ADN, H<sub>2</sub>O traitée au DEPC. Les réactions ont été effectuées avec un thermocycleur PTC-225 DNA Engine Tetrad (MJ Research, Waltham, MA) de la façon suivante : 5 min de dénaturation à 95°C suivies de 30 cycles d'amplification (1 min de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et 30 sec d'elongation à 72°C). Les produits d'amplification ont été visualisés sous

lumière UV, après électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% contenant du bromure d'éthydium.

#### ***Amplification de l'ADNc par PCR en temps réel avec la technologie SYBR green***

Le gène *Rps16*, codant pour la sous-unité ribosomale 16S, a été utilisé comme référence (sens : 5'-CATGGTCCAGCTCACACC-3'; antisens : 5'-CCACAATGCGGTAAAAAGG-3'). L'expression du gène du récepteur aux androgènes (*Ar*) a été testée avec les oligonucléotides suivants : sens : 5'-CTCACCAAGCTCCTGGATTC-3'; antisens : 5'-AGGAAAGTCCACGCTCACC-3'. Ces deux paires d'oligonucléotides chevauchent au moins une jonction exon-exon.

Pour chaque paire d'oligonucléotides, une courbe standard a été effectuée afin de déterminer quelle dilution de la solution d'ADNc serait nécessaire pour la quantification subséquente. Chaque réaction de PCR en temps réel a été effectuée dans 20 µl de mélange réactionnel contenant 1x de mélange PCR QuantiTect SYBR green 2x (Qiagen Canada, Mississauga, ON), 0.25 µM d'oligonucléotide sens, 0.25 µM d'oligonucléotide antisens, 2 µl d'ADNc dilué (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 ou 1/640), H<sub>2</sub>O traitée au DEPC. Les réactions ont été effectuées avec un thermocycleur Mx3005P (Stratagene, La Jolla, CA) de la façon suivante : 15 min de dénaturation à 95°C, 40 cycles d'amplification (45 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 58°C et 30 sec d'elongation à 72°C) et finalement une incrémentation de la température de 55°C à 95°C. Cette dernière étape permet de construire une courbe de dissociation qui renseigne sur la spécificité des oligonucléotides. Afin de confirmer les résultats de la courbe de dissociation, les produits d'amplification ont été visualisés sous lumière UV, après électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% contenant du bromure d'éthydium. Dans tous les cas, l'analyse de la courbe standard a montré qu'une dilution de travail 1/100 des ADNc était adéquate. Des PCR en temps réel ont de nouveau été effectuées avec cette dilution, et le rapport de l'expression de chaque gène sur l'expression de *Rps16* a été calculé.

### *Séquençage des gènes *Ddx3y* et *Eif2s3y**

Environ 1 kb du promoteur, les exons (incluant 30 pb des introns flanquants) et la région 3'UTR des gènes *Ddx3y* et *Eif2s3y* ont été séquencés à partir des amplifications par PCR décrites plus haut. Le séquençage a été effectué par le Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill (Montréal, QC).

### *Castration des souris males*

Les chirurgies ont été effectuées par Sonia Bélanger, technicienne en santé animale employée dans mon laboratoire au moment de l'expérience.

Des mâles A/J, C57BL/6J, C57Bl/6-chrY A/J et A/J-chrY C57BL/6J âgés de 4 semaines ont été castrés. Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane gazeux en utilisant un vaporisateur de table. L'anesthésie a été induite dans une chambre de contention avec 5% d'isoflurane dans de l'O<sub>2</sub> à 100%, puis maintenue par l'intermédiaire d'un cône nasal avec un flux de 0.8 l/min d'isoflurane à 1.5-2% dans de l'O<sub>2</sub> à 100%. Pour éviter une hypothermie pendant la procédure, les animaux reposaient sur un tapis chauffant à 37°C. Les testicules ont été exposés à travers une petite incision, ligaturés avec une suture simple puis excisés. L'incision a ensuite été refermée avec du fil à suture absorbable. Les animaux du groupe contrôle ont subi une chirurgie simulée, c'est-à-dire sans exposition et excision des testicules. Les animaux ont pu récupérer de l'opération pendant 30 min sous une lampe chauffante, puis ils ont été mis dans une cage propre avec un accès libre et illimité à l'eau et à la nourriture.

### *Supplémentation en testostérone*

Les mâles A/J, C57BL/6J, C57Bl/6-chrY A/J et A/J-chrY C57BL/6J castrés ont été utilisés à l'âge de 8 semaines. Tous les deux jours, les animaux ont reçu des injections

sous-cutanées de soit 0.2 mg/kg, soit 0.8 mg/kg de cypionate de testostérone (Sandoz Canada, Boucherville, QC) dilué dans de l'huile de maïs. Les animaux contrôle ont reçu uniquement le véhicule. Le traitement a été suivi pendant 4 semaines.

### ***Poids des vésicules séminales***

Les mâles ayant été castrés puis injectés (contrôle, 0.5 mg/kg et 2.0 mg/kg de cypionate de testostérone) ont été utilisés à l'âge de 12 semaines. Les vésicules séminales ont été prélevées, épongées sur du papier absorbant et pesées. Les tibias gauches ont été prélevés, autoradiographiés, puis les images de tibia ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. Le rapport du poids des vésicules séminales sur la longueur du tibia a ensuite été calculé. J'ai choisi la longueur du tibia car le poids corporel différait significativement entre les animaux traités à la testostérone et ceux ayant reçu le véhicule.

### ***Isolation des cardiomycocytes et vidéo-microscopie***

Les souris ayant subi la chirurgie simulée et ceux qui ont été castrés puis injectés (contrôle, 0.5 mg/kg et 2.0 mg/kg de cypionate de testostérone) ont été utilisés à l'âge de 12 semaines. Les animaux sous anesthésie ont été pesés puis le cœur a rapidement été prélevé. Les cardiomycocytes ont ensuite été isolés par perfusion aortique rétrograde comme décrit précédemment (Zhou et al, 2000) et dans le chapitre 4.

### ***Dosage de la testostérone plasmatique***

Des souris mâles A/J, C57BL/6J et C57Bl/6-chrY A/J âgées de 12 semaines ont été utilisées. Un volume de 150 µl de sang a été prélevé par la veine sous-mandibulaire, sur les animaux non anesthésiés, dans des tubes eppendorf contenant de l'EDTA (6 µM final). Le

plasma a été récolté après centrifugation à 1500 rpm pendant 15 min, puis conservé à – 80°C.

La testostérone plasmatique a été dosée par une méthode immunologique enzymatique à l'aide du *testosterone EIA kit* de Cayman Chemical (Ann Harbor, MI). Cet essai est basé sur la compétition entre la testostérone libre plasmatique et une molécule conjuguée de testostérone-acétylcholinestérase, pour un nombre limité d'anticorps de lapin dirigés contre la testostérone. Le produit de la réaction de l'acétylcholiestérase avec son substrat a une couleur jaune caractéristique et absorbe à 412 nm. L'intensité de la couleur, mesurée par spectrophotométrie, est inversement proportionnelle à la quantité de testostérone libre d'origine plasmatique. Les échantillons ont été purifiés au préalable avec une extraction à l'éther, tel que précisé dans le protocole du fabricant.

### ***Mesure de la distance ano-génitale***

La distance ano-génitale mesurée chez des souriceaux est un reflet de l'ampleur du pic de tesostérone testiculaire prénatal (Vom Saal, 1979). Des souriceaux mâles et femelles A/J, C57BL/6J, C57Bl/6-chrY A/J et A/J-chrY C57BL/6J âgés de 4 jours ont été utilisés. Après décapitation, les souriceaux entiers ont été fixés pendant 1 à 2 jours dans une solution tampon de phosphate (80 mM) contenant 1.5% de glutaraldéhyde. Les animaux ont ensuite été placés sur le plateau d'un stéréoscope à dissection MZ12 (Leica Microsystems Canada, Richmond Hill, ON) et les images de la région ano-génitale ont été acquises à l'aide d'une caméra MicroPublisher 3.3 RTV (Qimaging, Surrey, BC) et du logiciel Northern Eclipse v.7.0 (Empix, Mississauga, ON). La distance ano-génitale, correspondant à la distance entre la partie caudale de la papille génitale et la partie rostrale de l'orifice anal, a été mesurée à partir des images à l'aide du logiciel Northern Eclipse v.7.0.

### *Immunobuvardage de type Western du récepteur aux androgènes*

J'ai effectué cette expérience avec l'aide de Sylvie Picard, assistante de recherche au laboratoire.

Des souris mâles A/J, C57BL/6J, C57Bl/6-chrY A/J et A/J-chrY C57BL/6J âgées de 12 semaines ont été utilisées. Les VG ont été rapidement disséqués puis épongés sur du papier absorbant. L'extraction des protéines et l'immunobuvardage de type Western des récepteurs aux androgènes ont été effectués comme décrit précédemment (Monks et al, 2006). Après buvardage, les membranes de transfert ont été coupées à 75 kDa afin de permettre des incubations en parallèle avec les anticorps primaires anti-AR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; dilution 1/500; AR = 108 kDa) et anti-actine  $\alpha$  (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO; dilution 1/10 000; actine  $\alpha$  = 43 kDa). Le rapport de l'immunoréactivité de AR sur celle de l'actine  $\alpha$  a été calculé.

### *Analyses statistiques*

Les résultats du dosage de la testostérone plasmatique ont été évalués par des ANOVA non paramétriques à un facteur contrôlé (test de Kruskal-Wallis), suivies d'un test de comparaison multiple de Newmann-Keuls. Les mesures de la distance ano-génitale et les résultats de l'immunobuvardage de type Western ont été évalués par des ANOVA à un facteur contrôlé, suivies d'un test de comparaison multiple de Tukey. Pour toutes les autres mesures, des ANOVA à deux facteurs contrôlés ont été effectuées, suivies d'un test post-hoc de Bonferroni. Toutes les analyses ont été faites à l'aide du logiciel GraphPad Prism v.4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## Résultats

### *Expression des gènes du chr Y dans le cœur*

J'ai vérifié dans un premier temps que les gènes localisés sur le chr Y (d'après les bases de données génomiques) étaient bien spécifiques des mâles. En effet, les révisions successives des assemblages du génome de la souris depuis 2005 ont mené à l'identification de plusieurs erreurs dans la composition en gène du chr Y, notamment des gènes supposément dupliqués à partir des autosomes. À l'époque où j'ai débuté ce projet, il y avait, par exemple, une duplication possible du gène *Sgcb* (codant pour le sarcoglycan β) du chr 5 vers Yq. Or les mutations des protéines structurales sarcoglycans ont un impact majeur dans la dystrophie musculaire et les cardiomyopathies (Zhu et al, 2002). En particulier le sarcoglycan β a un rôle central dans l'assemblage du complexe dystrophine-sarcoglycans (Shi et al, 2004) et des mutations dans *Sgcb* ont été reliées à une forme sévère de cardiomyopathie (Barresi et al, 2000). Ce gène représentait donc un candidat idéal pour expliquer les différences observées entre les souris A/J et C57BL/6J. Cependant, une analyse des chromosomes en métaphase par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) a révélé que le gène *Sgcb* avait une localisation exclusivement autosomale (résultats non montrés).

Finalement, seuls les 13 gènes cités en introduction du présent chapitre ont été retenus : *Rbmy1a1*, *Sry*, *Zfy2*, *Usp9y*, *Ddx3y*, *Uty*, *Eif2s3y*, *Jarid1d*, *Ubely1*, *Zfy 1*, *Ssty1*, *Ssty2* et *Sly*. Les amplifications par PCR de ces gènes à partir d'ADN génomique ont permis de conclure qu'ils étaient tous présents dans le génome des mâles et absents de celui des femelles (Tableau 7, page 199).

Cinq de ces 13 gènes étaient exprimés dans le cœur de souris mâles adultes (mais pas dans le cœur de souris femelles adultes) : *Ddx3y*, *Uty*, *Eif2s3y*, *Jarid1d* et *Sly* (Tableau 7, page 199). Une analyse au niveau d'autres tissus a par ailleurs révélé que l'expression de ces 5 gènes était largement ubiquiste (Figure 9, page 200). J'ai finalement étudié l'expression de ces gènes au cours du développement chez des souris mâles possédant un

chr Y d'origine C57BL/6J ou A/J dans un contexte génomique identique C57BL/6J (souche parentale C57BL/6J et lignée consomique C57BL/6J-chr Y A/J respectivement). Les résultats des PCR en temps réel montrent une légère différence uniquement à la naissance pour *Ddx3y* ( $P < 0.001$ ) et *Eif2s3y* ( $P < 0.001$ ) (Figure 10, page 201).

J'ai alors séquencé environ 1 kb du promoteur, les exons (incluant au moins 30 pb introniques en 3' et en 5' des exons) et la région 3'UTR des gènes *Ddx3y* et *Eif2s3y* d'origine C57BL/6J ou A/J. Aucun polymorphisme n'a été détecté.

### ***Effets combinés du chr Y et de la castration sur la taille des cardiomyocytes***

Une castration prépubertaire chez les mâles C57BL/6J a induit une diminution de la taille des cardiomyocytes à l'âge adulte ( $P < 0.001$ ). Cependant, la castration n'a pas eu d'effet sur la taille des cellules chez les souris consomiques C57BL/6J-chrY A/J, pour lesquelles le chr Y d'origine C57BL/6J est substitué par celui des A/J. De manière inverse, la castration n'a eu aucun impact sur les cellules des mâles A/J castrés, alors qu'une diminution de leur taille était observable chez les consomiques A/J-chrY C57BL/6J ( $P < 0.001$ ) (Figure 11, page 202). Une explication possible était que l'origine du chr Y influence la réponse des cellules cardiaques à la testostérone.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai vérifié si l'origine du chr Y était associée avec un effet de la testostérone lorsqu'administrée à des souris adultes castrées avant la puberté. Le traitement à la testostérone a augmenté la taille des cardiomyocytes des souris adultes C57BL/6J de manière dose-dépendante (comparaison avec les animaux ayant reçu le véhicule :  $P < 0.05$  pour 0.2 mg/kg de testostérone;  $P < 0.001$  pour 0.8 mg/kg de testostérone), mais aucun effet n'a été observé chez les C57BL/6J-chr Y A/J. D'un autre côté, les cellules des souris adultes A/J-chr Y C57BL/6J ont répondu à la testostérone (comparaison avec les animaux ayant reçu le véhicule :  $P < 0.01$  pour 0.2 mg/kg de

testostérone;  $P < 0.001$  pour 0.8 mg/kg de testostérone), d'une manière similaire aux C57BL/6J (Figure 12, page 203).

Il est à noter que la réponse aux androgènes n'a pas été affectée de cette façon dans toutes les cellules somatiques puisque le traitement à la testostérone a eu un impact comparable sur le poids des vésicules séminales dans les 3 souches (Figure 13, page 204).

### **Niveaux de testostérone et expression des récepteurs aux androgènes**

À l'âge adulte, les mâles C57BL/6J présentaient des niveaux de testostérone plasmatique plus bas que les A/J et les consomiques C57BL/6J-chrY A/J. Ainsi la substitution du chr Y d'origine C57BL/6J par celui des A/J, dans le fonds C57BL/6J, s'accompagne d'une augmentation de la concentration plasmatique de testostérone (Figure 14, page 205).

La distance ano-génitale ne présentait aucune différence entre les femelles A/J, C57BL/6J, C57BL/6J-chrY A/J et A/J-chrY C57BL/6J. Chez les mâles, les C57BL/6J présentaient une distance ano-génitale plus grande que les A/J ou les lignées consomiques ( $P < 0.01$  lorsque comparés aux A/J;  $P < 0.01$  lorsque comparés aux A/J-chrY C57BL/6J;  $P < 0.001$  lorsque comparés aux C57BL/6J-chrY A/J). De façon intéressante, la substitution du chr Y d'origine C57BL/6J par celui des A/J, dans le fonds C57BL/6J, était reliée à une diminution marquée de la distance ano-génitale ( $P < 0.001$ ). Quant à la substitution du chr Y dans le fonds A/J, elle n'a pas semblé avoir d'effets (Figure 15, page 206).

Enfin, l'analyse de l'expression ontogénique du messager du récepteur aux androgènes n'a pas montré de différences entre les lignées C57BL/6J et C57BL/6J-chrY A/J, qui possèdent le même gène *Ar* (localisé sur le chr X et codant pour le récepteur aux androgènes), mais qui diffèrent pour le chr Y (Figure 16A, page 207). De façon similaire, l'expression protéique du récepteur était comparable dans les 2 souches parentales et les 2 lignées consomiques (Figure 16B, page 207).

### Résumé des résultats

Une expression différentielle a été observée pour les gènes *Ddx3y* et *Eif2s3y* dans le VG de souris mâles C57BL/6J et consomiques C57BL/6J-chrY A/J, uniquement à la naissance. Cependant, le séquençage de ces gènes n'a pas mené à l'identification d'un polymorphisme.

Des expériences de castration prépubertaire et de traitement chronique à la testostérone ont suggéré que le chr Y des C57BL/6J sensibilise les cardiomyocytes aux effets de la testostérone.

L'expression du récepteur aux androgènes ne varie pas en fonction du chr Y C57BL/6J ou A/J, tant au niveau du messager que de la protéine.

Les niveaux de testostérone circulante à l'âge adulte sont plus bas chez les mâles C57BL/6J que chez les A/J. Par contraste, le pic de testostérone prénatal (estimé à partir de la distance ano-génitale chez les sourceaux) est plus important chez les C57BL/6J que chez les A/J. Enfin, dans le fonds C57BL/6J, le chr Y semble jouer un rôle dans les niveaux de testostérone pendant la période périnatale ainsi qu'à l'âge adulte.

## Tableaux

**Tableau 3 :** Oligonucléotides pour les amplifications génomiques des gènes du chr Y.

Gène	Séquence de référence	Sens (5' → 3')	Antisens (5' → 3')	Taille (pb)
<i>Ddx3y</i>	BC021453	GCCATGGCGCAGTATTAAC	TTTGAAGAAACTCCGGTTCG	200
<i>Eif2s3y</i>	NM_012011	GGAACATTGGCAAAGGCTTA	CCTGGAAGCACTCACTAGGC	194
<i>Jarid1d</i>	NM_011419	AGCCATCCAGATTCCCTGTG	AAGGATCCCACACCCTTTC	223
<i>Rbmy1al</i>	NM_011253	TGCATTGCTATTTGCCTCT	CACGCAATACTGGCCTCTAA	185
<i>Sly</i>	NM_201530	GTCATTGGGGATGGATTCTG	GAAGCCGAGGATTCAAACA	199
<i>Sry</i>	NM_011564	GCCTGTTGATATCCCCACTG	TGGTGGTGGTCATGAAACTG	189
<i>Ssty1</i>	NM_009220	CTGCCCTGGAACACTCACTTG	GAGAGAATGCAGGACCAAGG	221
<i>Ssty2</i>	AK006494	AATGCCAAAGCTCCTGTTG	TATCTTCCCAGGGACACAGC	185
<i>Ubel1y1</i>	AF150963	GGCCTAGAACGAAATGTCCAG	TAAGCAAGCACACAGGCATC	197
<i>Usp9y</i>	NM_148943	TTGAAGAGGCCAACCTTG	AGGCCACCTGGTACATA	192
<i>Uty</i>	AF057367	TTCAGTGGCTTGAACCTAA	GGAGTGGTGGTGGAACAAAT	189
<i>Zfy1/2</i>	X14382	CCCCTGTGTAGGCTGTGATT	GCTTCCTGTCTGGGTGTGT	234

**Tableau 4 :** Oligonucléotides pour amplifier partiellement le gène *Ddx3y* à des fins de séquençage.

Séquence	Sens (5' → 3')	Antisens (5' → 3')	Taille (pb)
<b>Prom</b>	GCAAGAAACTCTTAGGGGATG	TCAGTTAATTATCCGGCTTCC	649
<b>Prom + ex1</b>	CCTAAATGAGTGGGCTGAAAC	TGGCCAAGTTAAAACAAAGG	690
<b>Ex2</b>	GGTATCCAGCGTGGTTTG	TTTCAGCTCAGGGTGGTTTC	273
<b>Ex3</b>	TTAGGCCTTCATTCCCAC TG	CAAAGACTCCTGAAGGGATG	607
<b>Ex4</b>	CATTGTAGCTCCCTTTGG	CACTGGATAGCCATTGTTGG	613
<b>Ex5</b>	CCATCACAGGAGAACAGTGG	GACCCAGATGCCCTAACAGGC	602
<b>Ex6</b>	AGGGTCAGAAGGATGGCTTAG	TCCCCTCACAAAGTTGTCCTC	548
<b>Ex7</b>	CTCAGGTCCAATGCAAAAGC	GGGGAACAAAAGAGTTGCTG	579
<b>Ex8</b>	CCTTTGAGACCTTGCTTCAC	AAGCCAGAAAGTACCCTGGAG	534
<b>Ex9 &amp; 10</b>	GGGTACTTCTGGCTTTGC	TGGGAAGGATAAGGGTGGAC	662
<b>Ex11 &amp; 12</b>	CCCTTATCCTTCCCATTCTG	CAGACAGAGACACACACAAAACC	742
<b>Ex13 &amp; 14</b>	AGTCAGCCTTGCAAATCCTC	TTTGAGGTCCCAAGATCCAG	578
<b>Ex15 &amp; 16</b>	TTCTAGGCCCATGGTCTAC	CCACCAAATCCTCTGTTGTG	625
<b>Ex16 &amp; 17</b>	GCAGATTCAAGTGGAGGATTG	GGTACAACCAAGCAGGAAGTG	638
<b>3'UTR1</b>	TTCATGAGAGCTAAAGTCACAA	AAAGCCTGCTGCTGCATAAT	791
<b>3'UTR2</b>	TATGCAGCAGCAGGCTTAC	CGTGTGCCACCACTTCAG	693
<b>3'UTR3</b>	TGTGTCAAGAACCTGGTTCAGA	TTCCAATTGCCCTTCATT TG	560

Prom : promoteur; Ex : exon; 3'UTR : région 3' transcrive non traduite. Lorsque 2 exons sont mentionnés, cela signifie que l'intron intercalé est aussi amplifié.

**Tableau 5 :** Oligonucléotides pour amplifier partiellement le gène *Eif2s3y* à des fins de séquençage.

Séquence	Sens (5' → 3')	Antisens (5' → 3')	Taille (pb)
<b>Prom</b>	CTCGCCAGTTTGAGATTG	CAGCTACTTGCATGGACTTC	476
<b>Prom + ex1</b>	TTGGGATGGAGGTTAGGATG	CAGTCGGTATCACCGGTCTC	499
<b>Ex2</b>	TTTCTCGACCGCTAAAATCC	ACACCCAAGTCTCGAGGATG	501
<b>Ex3 &amp; 4</b>	AGTGTCTCAGGCTCACAGAGG	GGCTACTAAGCAACTGTCACATC	728
<b>Ex5</b>	GATCATCCCCTTCCACCTC	AACCAAGTTCAATGCTTCTGG	486
<b>Ex6</b>	TCTTGGGTCTTGGTTTCACC	CACCATAAATTCTGTGTTGGATG	457
<b>Ex7</b>	GTCAGTGCACTCAACCCTCA	GTGGTGCATGCCCTTAATCC	502
<b>Ex8</b>	GCTGGCCTCAAACCTCTGAAA	CCAGAGAGATCCAACCTCTGGTA	510
<b>Ex9</b>	GCTTGTGCACCAATACCATC	TGGACAAATAGCCCTTGAATAC	531
<b>Ex10</b>	TCTACAGGGGACCAAATGAG	AGAGCACCGACTGTTCTCC	524
<b>Ex11</b>	CGTGGATCCATACACCAGAC	CCAGATTGCAAAGTGAAGACC	587
<b>Ex12</b>	CCTTCTTCTGGCCTCTACCG	TGAGGCAAAATTGAATCCAG	663

Prom : promoteur; Ex : exon. Lorsque 2 exons sont mentionnés, cela signifie que l'intron intercalé est aussi amplifié.

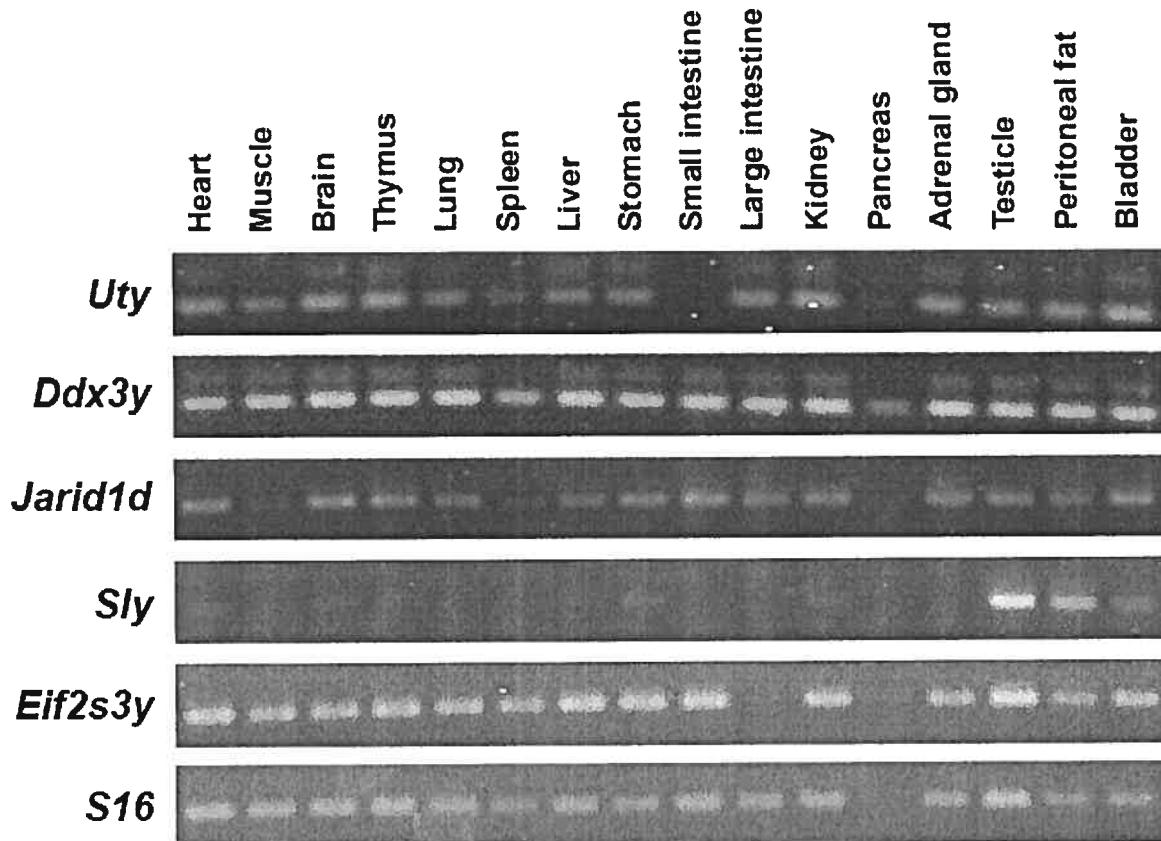
**Tableau 6 :** Oligonucléotides pour amplifier les messagers des gènes du chr Y.

Gène	Séquence de référence	Sens (5' → 3')	Antisens (5' → 3')	Taille (pb)
<i>Ddx3y</i>	BC021453	GTGCCTTCTGGTTGGAAAG	AATCCAGCATTGCAGAAC	137
<i>Eif2s3y</i>	BC043656	AGGAGGCAGAGTTAGTCAG	CTTCTTATCTGGCCCCAAC	144
<i>Jarid1d</i>	AF127244	TCCCAATCTAGAGCGCATTC	GAACCACCTTTGCCTCCTC	116
<i>Rbmy1a1</i>	NM_011253	AGCCAGGAGACCATCATCAC	TGCAAAGTGTCTCCCAGAAG	202
<i>Sly</i>	BC049626	CGAACGAACGAGAGAGGAAG	TCCCCAAGTTCATCAAAACC	234
<i>Sry</i>	NM_011564	TTATGGTGTGGTCCCGTGGT	GGCCTTTTCGGCTCTGT	124
<i>Ssty1</i>	X05260	GTGGTCTGTGAAAGGCAAGC	CCAGCCTCAGGATTATTGG	200
<i>Ssty2</i>	AK006494	TGGTGCCTGGTCTCTATCAG	CGTTTACGCCAGACACAATG	205
<i>Ubel1y1</i>	AF150963	TGTCCAAGAACGCAAAGTG	ACACTGGAAGCCTGGAGATG	206
<i>Usp9y</i>	NM_148943	GGAATGGCTTGGAGATGAAC	TCTTGGTCATCAGGGTCCTC	192
<i>Uty</i>	AF057367	ATGGAGAAGGGCATGAGAAC	AGTTGGTGGCTTGGAGGTG	203
<i>Zfy1/2</i>	X14382	AGGTGTTCTGGGTTTCAGG	TGCATCAGCTCCTATTCCATC	201

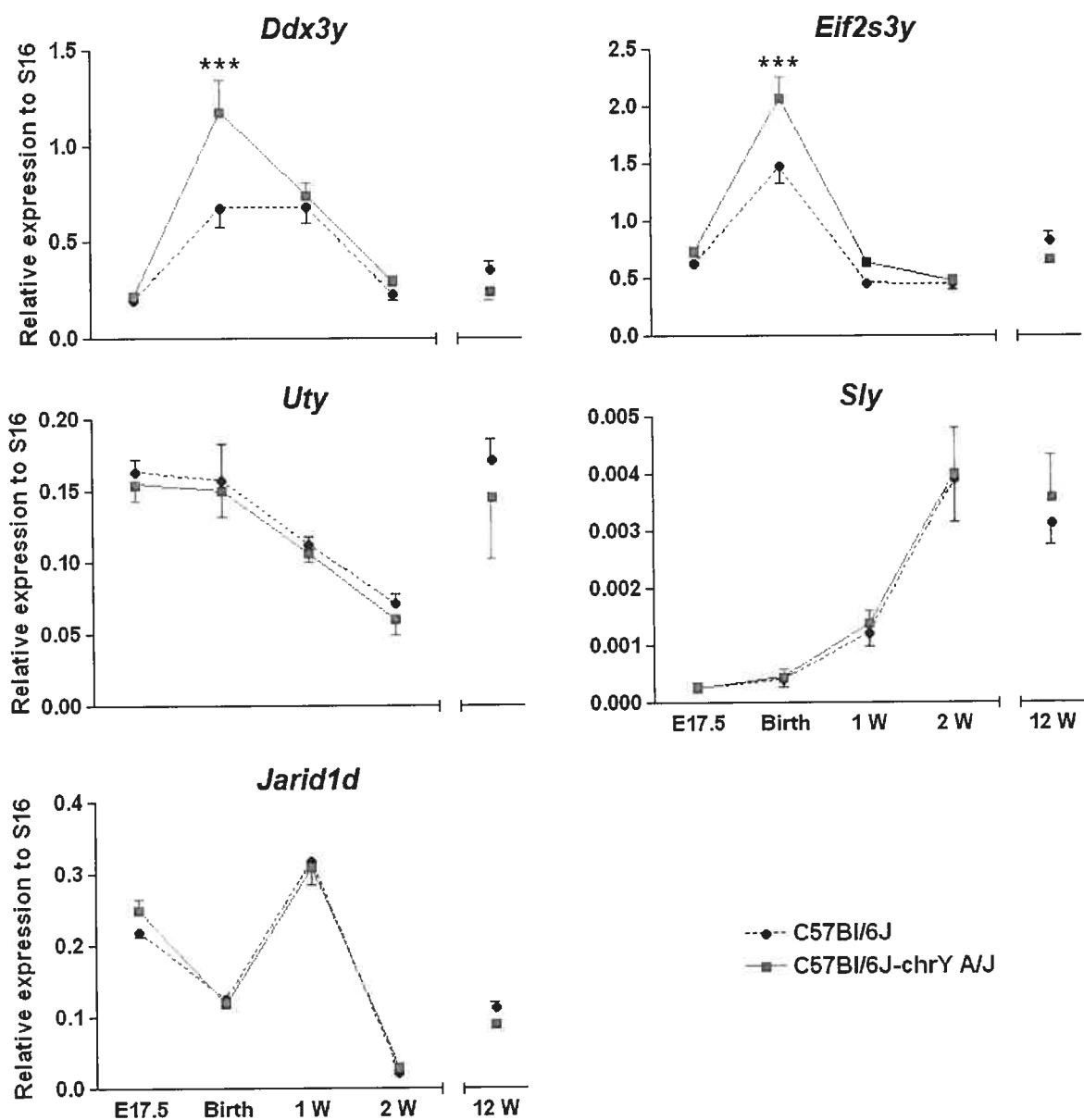
**Tableau 7 :** Expression des gènes du chr Y dans les cœurs de souris C57BL/6J adultes.

Gène	Présence génomique		Expression cardiaque	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
<b>Gènes du chr Y exprimés dans le cœur</b>				
<i>Uty</i>	+	-	+	-
<i>Ddx3y</i>	+	-	+	-
<i>Jarid1d</i>	+	-	+	-
<i>Sly</i>	+	-	+	-
<i>Eif2s3Y</i>	+	-	+	-
<b>Gènes du chr Y non exprimés dans le cœur</b>				
<i>Usp9y</i>	+	-	-	-
<i>Rbmy1a1</i>	+	-	-	-
<i>Sry</i>	+	-	-	-
<i>Zfy1/2</i>	+	-	-	-
<i>Ssty1</i>	+	-	-	-
<i>Ssty2</i>	+	-	-	-
<i>Ube1y1</i>	+	-	-	-

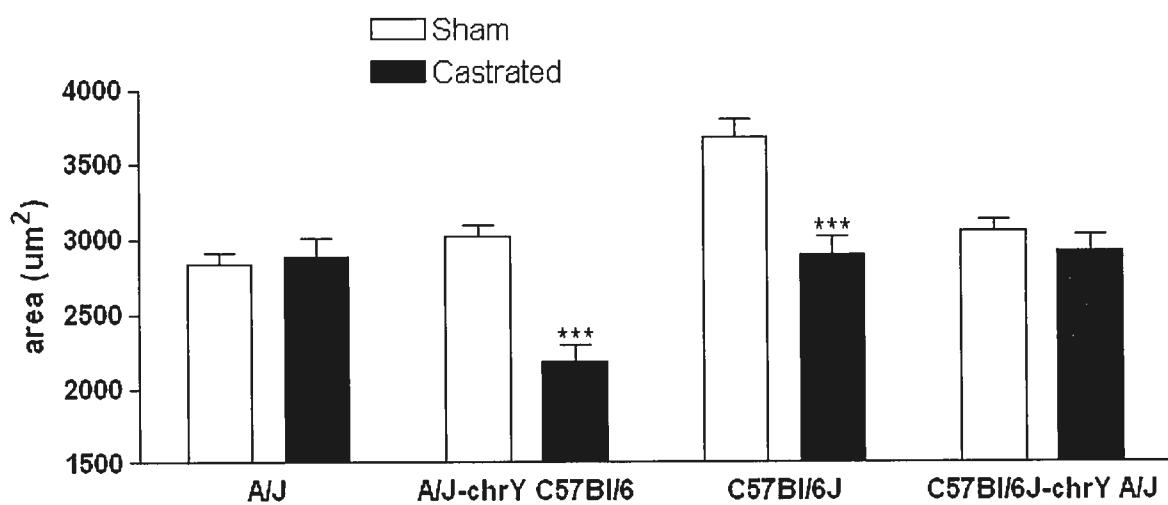
## Figures



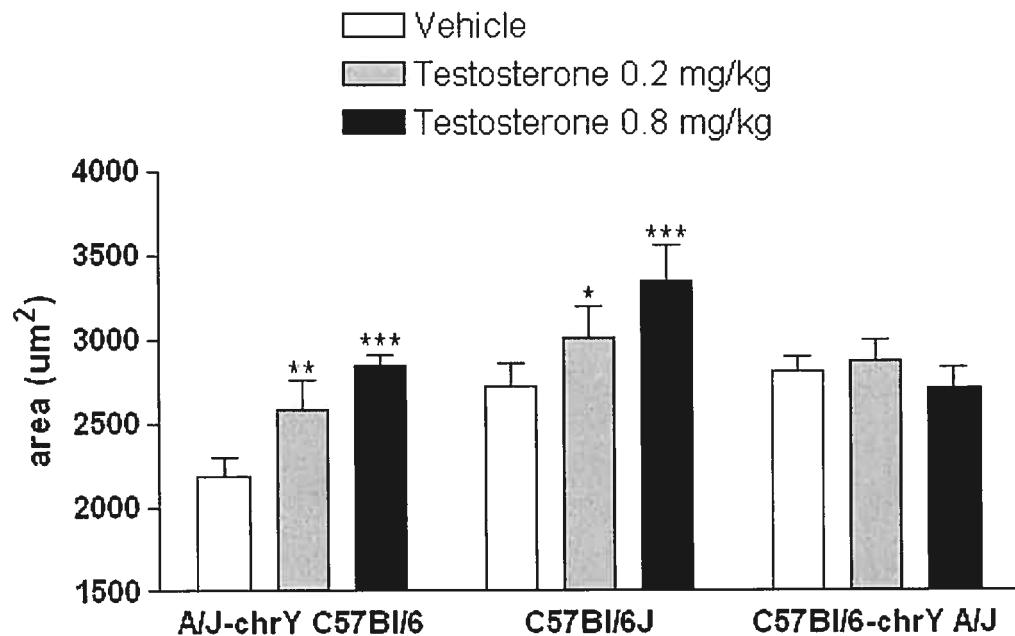
**Figure 9 :** Expression ubiquiste des gènes du chr Y exprimés dans le VG. Aucune bande n'était visible en regardant le gel directement sous lumière UV pour *Sly* dans la rate et le pancréas. Dans tous les autres cas, une bande était visible.



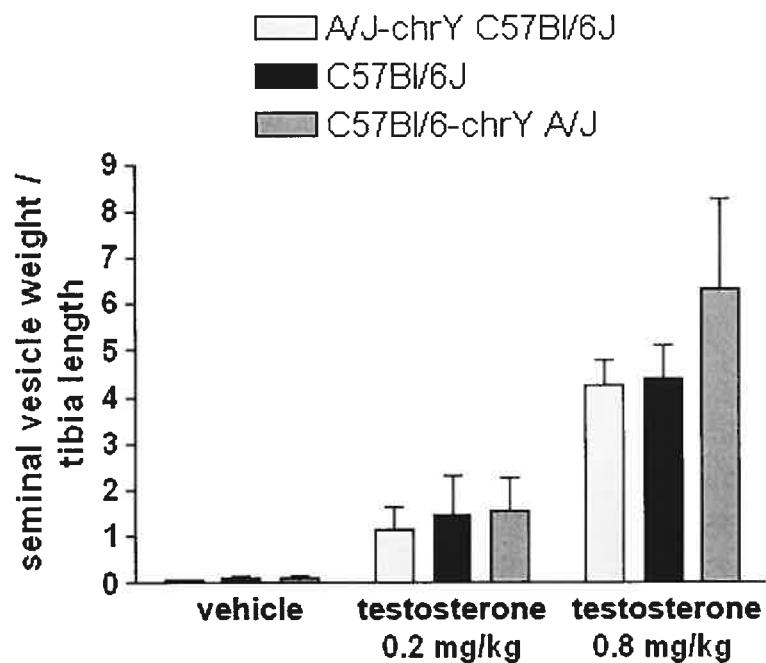
**Figure 10 :** Quantification de l'expression des gènes du chr Y dans le VG. Des PCR en temps réel ont été effectuées avec la technologie *SYBR green*, à partir d'ADNc de VG. Le rapport de l'expression de chaque gène sur l'expression du gène de référence 16S a été calculé à différents moments du développement (jour embryonnaire E17.5, naissance, 1 semaine, 2 semaines et 12 semaines). \*\*\* p < 0.001.



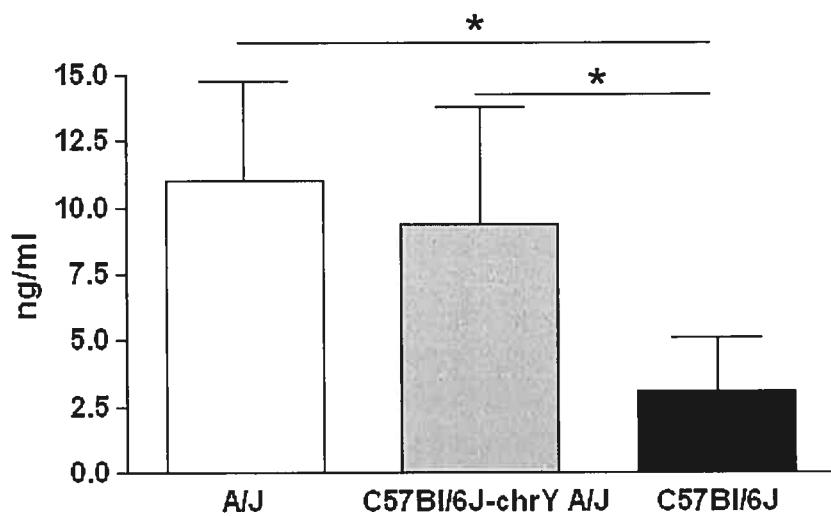
**Figure 11 :** Effets d'une castration sur la taille des cardiomyocytes isolés. La surface des cardiomyocytes, isolés à partir de cœurs de souris mâles âgés de 12 semaines, a été mesurée. Les animaux ont été castrés avant la puberté, à l'âge de 4 semaines. \*\*\* p < 0.001.



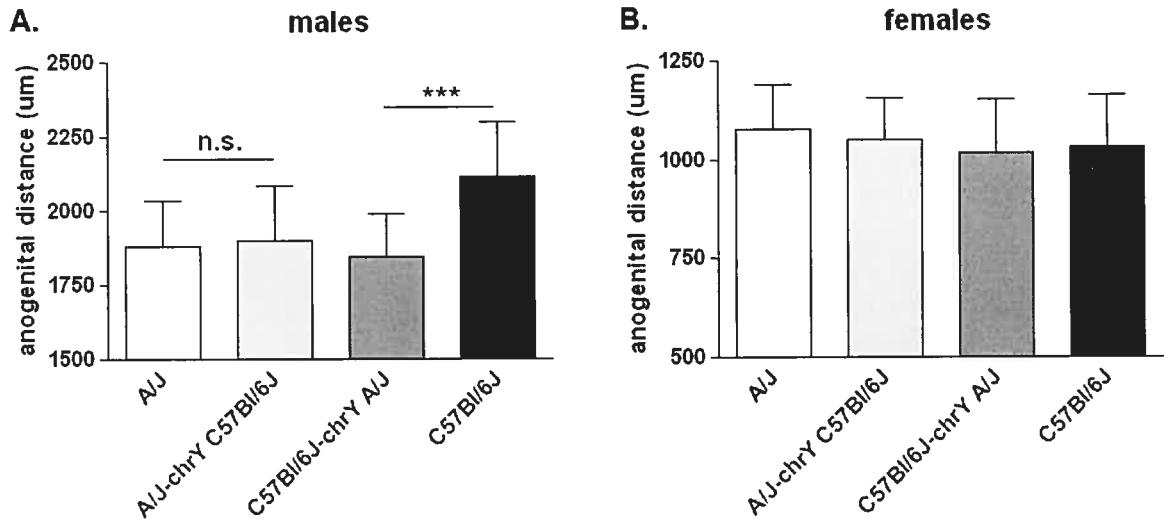
**Figure 12 :** Effets de la testostérone sur la taille des cardiomyocytes isolés. La surface des cardiomyocytes, isolés à partir de cœurs de souris mâles âgés de 12 semaines, a été mesurée. Les animaux ont été castrés avant la puberté (à l'âge de 4 semaines), puis ils ont reçu des injections sous-cutanées de cypionate de testostérone tous les deux jours, entre les âges de 8 et 12 semaines. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.



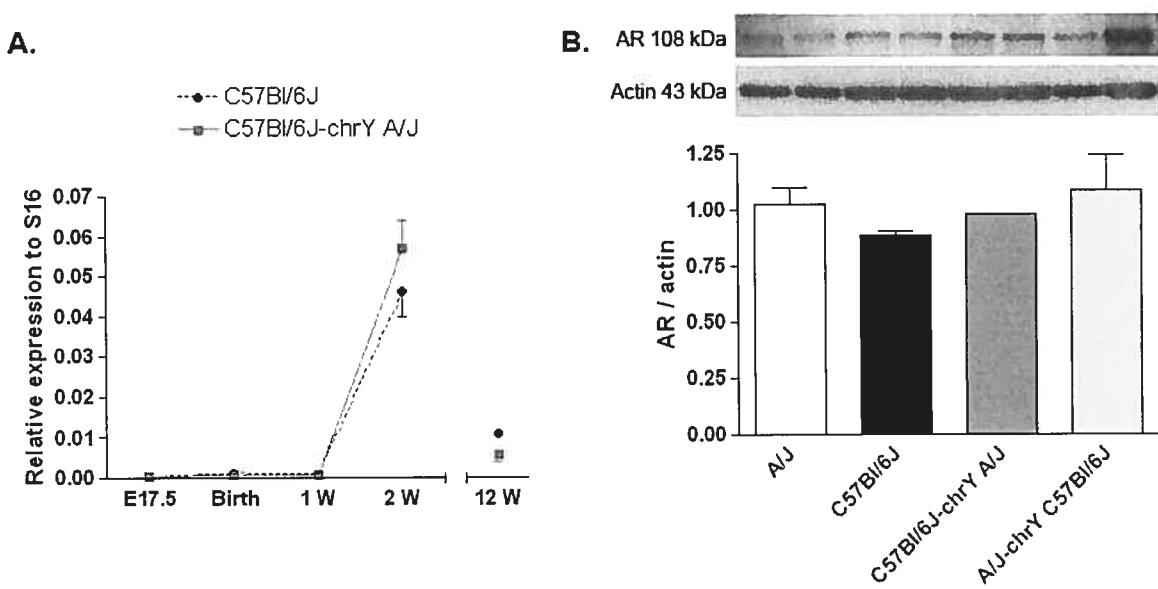
**Figure 13 :** Effets de la testostérone sur la taille des vésicules séminales. Le rapport du poids des vésicules séminales sur la longueur du tibia gauche a été calculé chez des souris mâles âgées de 12 semaines. Les animaux ont été castrés avant la puberté (à l'âge de 4 semaines), puis ils ont reçu des injections sous-cutanées de cypionate de testostérone tous les deux jours, entre les âges de 8 et 12 semaines.



**Figure 14 :** Niveaux de testostérone plasmatique chez des mâles adultes. \* : p < 0.05.



**Figure 15 :** Distances ano-génitales mesurées chez des souriceaux âgés de 4 jours. La distance entre la partie caudale de la papille génitale et la partie rostrale de l'orifice anal a été mesurée sur des souriceaux mâles et femelles âgés de 4 jours. n.s. : non significatif; \*\*\* p < 0.001.



**Figure 16 :** Expression des récepteurs aux androgènes dans le VG. A : expression ontogénique du messager du gène *Ar*, mesurée par PCR en temps réel avec la technologie *SYBR green*, à partir d'ADNc de VG. Le rapport de l'expression de *Ar* sur l'expression du gène de référence 16S a été calculé. B : expression protéique du récepteur aux androgènes mesurée par immunobuvardage de type Western, dans des VG de souris mâles âgées de 12 semaines. Le rapport de l'immunoréactivité de AR sur celle de l'actine  $\alpha$  a été calculé.

## Chapitre 6 : Discussion

*Our belief in a hypothesis can have no stronger basis than our repeated unsuccessful critical attempts to refute it.*

Karl Popper (The logic of scientific discovery)

## Mieux comprendre les bases génétiques d'un caractère complexe

L'héritabilité de la MVG indépendamment de la PA a été démontrée à la fois chez l'humain (Maron et al, 1984; Greaves et al, 1987; Verhaaren et al, 1991; Gardin et al, 1995a; Gardin et al, 1995b; Post et al, 1997; Garner et al, 2000) et chez le rat (Tanase et al, 1982). Il en ressort que la variabilité de la masse cardiaque est attribuable dans une grande proportion aux facteurs génétiques. L'étiologie de l'HVG de cause non mendélienne dans la population générale est donc le résultat des effets de nombreux gènes, de l'environnement et de l'interaction entre ces différents facteurs. À ce titre, on peut qualifier l'HVG de maladie complexe (Deschepper et al, 2002a).

Quelques études d'association avec l'HVG chez l'humain ont mené à l'identification de polymorphismes morbides dans plusieurs gènes candidats (Tableau 2, page 52), incluant principalement des gènes reliés au système rénine-Ang II-aldostérone (ACE, ACE2, AT2, AS). L'accumulation de connaissances sur la régulation de la MVG a permis de tester aussi des gènes impliqués dans le tonus vasculaire (NPPA, NPR1, ADD1, eNOS et  $\beta$ 2BKR), le métabolisme énergétique (GHSR) ou l'activation sympathique (TH). Malgré ces résultats encourageants, l'approche par gène candidat présente les limitations suivantes (MacRae, 2000; Cardon & Bell, 2001) :

1. La connaissance des mécanismes moléculaires qui contrôlent le phénotype est fragmentaire, et donc le nombre de candidats à tester est restreint.
2. La stratification insoupçonnée des populations humaines, due aux différences entre groupes ethniques, ne permet pas de généraliser les résultats d'une association.
3. La petite taille des populations étudiées diminue la probabilité de détecter un déséquilibre de liaison avec les gènes testés.

4. La validité de chaque étude doit être testée par réPLICATION des résultats dans des populations indépendantes, et peut requérir de façon ultime des méta-analyses.

La cartographie de QTL par criblage de génomes entiers est une approche radicalement différente. Elle permet de disséquer un caractère quantitatif en un certain nombre de loci génétiques sans faire d'hypothèse préalable sur leur position ou leur fonction (Lander & Schork, 1994). Dans un second temps, ces unités génétiques discrètes sont analysées par des méthodes classiques, telles que le clonage positionnel, afin d'identifier les polymorphismes morbides (Lander & Botstein, 1989; Altmuller et al, 2001). Cependant, la cartographie de QTL est une entreprise difficile dans des populations humaines pour les raisons suivantes (Schork, 1997) :

1. Les facteurs environnementaux sont difficilement contrôlables.
2. L'expression des gènes impliqués dans la mise en place du caractère complexe évolue au cours du développement d'un individu.
3. Les populations humaines manquent d'homogénéité génétique.

La cartographie génétique chez les modèles animaux, notamment les rongeurs de laboratoire, offre une alternative intéressante. Avant tout, la synténie est très forte entre les différentes espèces animales, à plus forte raison dans un même clade. Ainsi, le rat, la souris et l'humain, tous mammifères euthériens, partagent plus de 90% de leurs gènes (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). D'autre part, le développement du cœur est extrêmement semblable. La septation, qui est la partition des chambres cardiaques, suit la même séquence d'évènements, alors que la maturation des valves et du myocarde est très similaire (Wessels & Sedmera, 2003). La physiologie cardiovasculaire de ces trois espèces présente aussi des similitudes intéressantes. Initialement, le rat a d'ailleurs été un modèle de choix pour les physiologistes et les pharmacologistes, alors que les généticiens lui ont préféré la souris (Jacob & Kwitek, 2002). Le récent séquençage des trois génomes, couplé aux progrès technologiques qui entraînent le développement d'instruments de mesure

performants sur des petits animaux, permettent maintenant de compiler les données génétiques et physiologiques acquises dans les deux modèles de rongeur, et d'en tirer des conclusions pertinentes pour la santé humaine (Hasenfuss, 1998; Hoit & Nadeau, 2001; Jacob & Kwitek, 2002).

Toutefois, il faut garder en tête que des variations physiologiques propres à chaque espèce sont documentées. Par exemple, le cœur d'un rat au repos bat 5 fois plus vite que celui d'un humain, la relation force-fréquence est inversée, et la récupération du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est principalement médiée par les pompes du réticulum sarcoplasmique, alors que les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ont un rôle plus important chez l'humain (Hasenfuss, 1998). Quant à la souris, son cœur au repos bat 10 fois plus vite que celui d'un humain (Chu et al, 2002). À l'âge adulte, le VG des deux espèces de rongeurs exprime principalement l'isoforme  $\alpha$  de la chaîne lourde de myosine, tandis que celui d'un humain exprime l'isoforme  $\beta$ . Une transition vers l'expression de l'isoforme  $\beta$  s'effectue seulement en cas de surcharge hémodynamique chez les rongeurs (Swynghedauw, 1986).

Outre le séquençage de leur génome et la remarquable densité en marqueurs des cartes génétiques, le rat et la souris offrent des ressources de premier choix d'un point de vue génétique. Leur petite taille, leur maturité sexuelle rapide (4 à 6 semaines) et leur période de gestation courte (3 semaines) permettent de créer et de maintenir des colonies importantes en milieu contrôlé. Ce dernier point est capital, car la maîtrise des facteurs environnementaux permet de réduire les variations phénotypiques aux seuls effets génétiques. Au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses lignées consanguines ont été développées. Ces ressources offrent une homogénéité génétique idéale au sein de chaque souche, tout en présentant une variété de phénotypes pertinents en terme de maladies humaines d'une lignée à l'autre. De plus, la généalogie de ces lignées est bien connue. Chez le rat, 63 souches consanguines et 214 souches dérivées ont été analysées afin d'établir la phylogénie des rats de laboratoire (Canzian, 1997). Chez la souris, l'histoire de plus de 450 lignées a été déterminée avec précision sur des bases moléculaires et historiques (Beck et al, 2000; Petkov et al, 2004). La souris étant le modèle de choix pour la mutagénèse dirigée,

la variabilité génétique de certaines sous-lignées, comme celles dérivées de la souche 129, a été particulièrement investiguée (Simpson et al, 1997b).

## Cartographie de QTL liés à la masse cardiaque

### Étude chez le rat

À partir de croisements entre les souches consanguines SHR (hypertendue et présentant une MVG élevée) et WKY (PA et MVG normales), il a été possible de séparer l'HVG et l'hypertension par sélections successives chez le rat (Hendley & Ohlsson, 1991). Ceci a mené à la création de la nouvelle lignée consanguine WKHA, qui présente toutes les caractéristiques d'une HVG concentrique bien que la PA soit normale (Descheppe et al, 2002b).

Avant mon arrivée au laboratoire, l'analyse partielle des mâles issus d'un croisement F2 entre les rats consanguins WKY et WKHA avait conduit à l'identification d'un QTL majeur lié à la MVG sur le chr 5 (*Cm24*) (Descheppe et al, 2001). J'ai ensuite poursuivi l'analyse du même croisement F2 entre les souches de rats consanguins WKY et WKHA, en étendant la cartographie à la totalité du génome dans les deux sexes (voir article 1, chapitre 2). Les QTL sont maintenant répertoriés dans la banque de données publique *Rat Genome Database* (<http://rgd.mcw.edu/>), avec un changement de nomenclature par rapport à l'article 1 (Chapitre 2) détaillé dans le Tableau 8, page 214.

Afin de maximiser les chances de cartographier un QTL, il est recommandé de sélectionner des souches parentales qui contrastent pour le phénotype d'intérêt, mais qui présentent aussi un degré élevé de polymorphisme génétique. En effet, seules les portions de génome polymorphes sont détectables dans la population ségrégante après recombinaison méiotique, et ce sont donc elles qui apportent l'information nécessaire pour construire une carte de liaison des marqueurs, et finalement cartographier des QTL. Or les

souches WKHA dérivent d'un croisement entre les rats WKY et SHR. L'analyse d'empreintes génétiques a montré que ces deux dernières lignées sont apparentées à ~65%, alors que les WKHA présentent ~85% de similarité génétique avec les deux souches parentales. Le problème majeur du génotypage des individus F2 issus du croisement entre les WKY et les WKHA a donc résidé dans l'obtention de marqueurs polymorphes. Une étude précédente avait déjà établi une carte avec 58 marqueurs microsatellites répartis sur 15 des 20 autosomes du rat (Courvoisier et al, 1997). Dans mon étude, j'ai pu construire une carte contenant 78 marqueurs répartis sur 18 des 20 autosomes, espacés d'environ 18 cM. La densité en marqueurs était donc adéquate pour effectuer une étude de liaison, d'autant plus qu'augmenter le nombre de marqueur n'aurait pas permis d'accéder aux régions communes entre les WKY et les WKHA (régions de toute façon non informatives d'un point de vue de la cartographie de QTL).

L'analyse m'a permis de localiser 2 loci sur les chr 5 et 12 (respectivement *Lvm8/Cm54* et *Lvm10/Cm56*) et 2 loci sur le chr 17 (*Lvm9/Cm55* et *Lvm13/Cm57*) chez les mâles, et 2 loci sur les chr 3 et 15 (respectivement *Lvm12/Cm58* et *Lvm11/Cm59*) chez les femelles. Même si le but ultime est l'identification d'un polymorphisme causal dans un gène candidat, une cartographie de QTL peut permettre de mieux comprendre l'architecture génétique d'un caractère complexe. Les résultats de cette étude montrent que la masse cardiaque, dans le contexte génétique particulier des souches WKY et WKHA, est régulée principalement par 7 loci (incluant *Cm24* identifié avant mon arrivée au laboratoire) répartis sur 5 autosomes. En avril 2007, 16 des 20 autosomes présents chez le rat portent au moins un QTL lié à la MVG (Tableau 8, page 214). Cependant, beaucoup de loci ont été cartographiés dans des croisements utilisant au moins une souche de rats hypertendus. Si on s'intéresse tout particulièrement aux QTL liés à la MVG indépendamment de la PA, ces derniers sont quand-même répartis sur 14 des 20 autosomes. Aucun QTL n'a été localisé sur les chromosomes sexuels, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des études n'ont considéré que les mâles dans leurs analyses. De façon intrigante, aucun investigator n'a rapporté d'éventuelles interactions épistatiques entre QTL liés à la masse

**Tableau 8 :** Mise à jour du tableau 1, article 1, chapitre 2.

<b>QTL</b>	<b>Alias</b>	<b>Souches parentales</b>	<b>Chr</b>	<b>Référence</b>
<b><i>QTL liés à la fois à la MVG et à la PA</i></b>				
<i>Cm1</i>	<i>Bp158</i>	SR/Jr, SS/Jr	7	(Cicila et al, 1997)
<i>Cm2</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	8	(Moreno et al, 2003)
<i>Cm4</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	9	(Moreno et al, 2003)
<i>Cm5</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	12	(Moreno et al, 2003)
<i>Cm10</i>	<i>Bp112</i>	SS/JrRkb, SHR/FubRkb	3	(Siegel et al, 2003)
<i>Cm11</i>	<i>Bp113</i>	SS/JrRkb, SHR/FubRkb	9	(Siegel et al, 2003)
<i>Cm12</i>	<i>Bp114</i>	SS/JrRkb, SHR/FubRkb	19	(Siegel et al, 2003)
<i>Cm13</i>	<i>Bp162</i>	SR/Jr, SS/Jr	3	(Cicila et al, 1999)
<i>Cm14</i>	<i>Bp51</i>	SR/Jr, SS/Jr	3	(Cicila et al, 1999)
<i>Cm16</i>	<i>Hw1</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	1	(Garrett et al, 2003)
<i>Cm23</i>	<i>Lvm2</i>	DRY, SHR	1	(Innes et al, 1998)
<i>Cm27</i>	<i>Lvm7</i>	LEW/Crj, SHR/Izm	7	(Tsujita et al, 2000)
<i>Cm28</i>	<i>Bp53</i>	SS/Jr, SHR	9	(Garrett et al, 2000)
<i>Cm29</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	2	(Stoll et al, 2001)
<i>Cm30</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	8	(Stoll et al, 2001)
<i>Cm31</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	10	(Stoll et al, 2001)
<i>Cm34</i>		LH/Mav, LN/Mav	17	(Bilusic et al, 2004)
<i>Cm50</i>	<i>Cmi1</i>	SS/Jr, BN	10	(Kato et al, 1999)
<i>Cm51</i>	<i>Cmi2</i>	SS/Jr, BN	10	(Kato et al, 1999)
<i>Cm61</i>	<i>RHW-m1</i>	SR/JrHsd, SS/JrHsd	20	(Herrera et al, 2006)

QTL	Alias	Souches parentales	Chr	Référence
<i>Cm62</i>	<i>RHW-m2</i>	SR/JrHsd, SS/JrHsd	5	(Herrera et al, 2006)
<i>Cm64</i>	<i>RHW-f1</i>	SR/JrHsd, SS/JrHsd	5	(Herrera et al, 2006)
<i>Cm66</i>	<i>RHW-f3</i>	SR/JrHsd, SS/JrHsd	5	(Herrera et al, 2006)
<b><i>QTL liés à la MVG indépendamment de la PA, avec au moins une souche parentale hypertendue</i></b>				
<i>Cm3</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	8	(Moreno et al, 2003)
<i>Cm6</i>		BN/SsNHsd, SS/JrHsdMcwi	7	(Moreno et al, 2003)
<i>Cm17</i>	<i>Hw2</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	3	(Garrett et al, 2003)
<i>Cm18</i>	<i>Hw3</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	4	(Garrett et al, 2003)
<i>Cm19</i>	<i>Hw4</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	8	(Garrett et al, 2003)
<i>Cm20</i>	<i>Hw5</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	9	(Garrett et al, 2003)
<i>Cm21</i>	<i>Hw6</i>	SS/JrMco, SHR/NHsd	9	(Garrett et al, 2003)
<i>Cm22</i>	<i>Lvm1</i>	DRY, SHR	2	(Innes et al, 1998)
<i>Cm26</i>	<i>Lvm6</i>	LEW/Crj, SHR/Izm	17	(Tsujita et al, 2000)
<i>Cm32</i>		LH/Mav, LN/Mav	1	(Bilusic et al, 2004)
<i>Cm33</i>		LH/Mav, LN/Mav	10	(Bilusic et al, 2004)
<i>Cm35</i>		LH/Mav, LN/Mav	1	(Bilusic et al, 2004)
<i>Cm36</i>		LH/Mav, LN/Mav	1	(Bilusic et al, 2004)
<i>Cm38</i>		LEW, HTG	2	(Ueno et al, 2003)
<i>Cm39</i>		LEW, HTG	2	(Ueno et al, 2003)
<i>Cm41</i>		LEW, HTG	8	(Ueno et al, 2003)
<i>Cm42</i>		LEW, HTG	2	(Ueno et al, 2003)

QTL	Alias	Souches parentales	Chr	Référence
<i>Cm43</i>		SHRSP/Tkyo, WKY/Tkyo	3	(Inomata et al, 2005)
<i>Cm44</i>		SHRSP/Tkyo, WKY/Tkyo	10	(Inomata et al, 2005)
<i>Cm45</i>		SHRSP/Tkyo, WKY/Tkyo	13	(Inomata et al, 2005)
<i>Cm46</i>		SHRSP/Tkyo, WKY/Tkyo	3	(Inomata et al, 2005)
<i>Cm47</i>		SHRSP/Tkyo, WKY/Tkyo	6	(Inomata et al, 2005)
<i>Cm48</i>		WKY/Tkyo, SHR/Tkyo	3	(Inomata et al, 2005)
<i>Cm49</i>		F344, SHR/Kyo	2	(Di Nicolantonio et al, 2006)
<i>Cm52</i>		SS/Jr, SHR/NHsd	1	(Garrett et al, 2006)
<i>Cm53</i>		SS/Jr, SHR/NHsd	9	(Garrett et al, 2006)
<i>Cm60</i>		PD/Cub, BN/Cub	2	(Seda et al, 2005)
<i>Cm63</i>	<i>RHW-m3</i>	SR/JrHsd, SS/JrHsd	6	(Herrera et al, 2006)
<i>Cm65</i>	<i>RHW-f2</i>	SR/JrHsd, SS/JrHsd	2	(Herrera et al, 2006)
<b><i>QTL liés à la MVG, avec les 2 souches parentales normotendues</i></b>				
<i>Cm24</i>	<i>Lvm3</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	5	(Deschepper et al, 2001)
<i>Cm25</i>	<i>Lvm4</i>	WKY, F344/N	3	(Sebkhi et al, 1999)
<i>Cm37</i>	<i>Cmi1</i>	BN, LOU/Ins	1	(Gauguier et al, 2005)
<i>Cm54</i>	<i>Lvm8</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	5	(Llamas et al, 2005b)
<i>Cm55</i>	<i>Lvm9</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	17	(Llamas et al, 2005b)
<i>Cm56</i>	<i>Lvm10</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	12	(Llamas et al, 2005b)
<i>Cm57</i>	<i>Lvm13</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	17	(Llamas et al, 2005b)
<i>Cm58</i>	<i>Lvm12</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	3	(Llamas et al, 2005b)
<i>Cm59</i>	<i>Lvm11</i>	WKY/Cfd, WKHA/Cfd	15	(Llamas et al, 2005b)

cardiaque. Ces résultats, dans leur ensemble, confirment la nature polygénique du déterminisme génétique de la MVG.

La cartographie de QTL est basée sur la distribution du phénotype dans la population ségrégeante et non sur les différences entre les souches parentales. Il est donc possible qu'une souche ayant un phénotype élevé soit en fait porteuse d'un ou plusieurs loci liés à un phénotype bas. Le caractère complexe, observé au niveau de l'animal, est la résultante homéostatique de plusieurs gènes dont les effets ne sont pas forcément orientés dans la même direction, d'où l'existence de ces QTL, qu'on qualifie de transgressifs (ou cryptiques). Cette situation est bien illustrée dans le croisement F2 que j'ai analysé, où 4 QTL étaient transgressifs (*Lvm9/Cm55*, *Lvm10/Cm56*, *Lvm12/Cm58* et *Lvm13/Cm57*). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les cœurs des WKY ont certaines caractéristiques de cardiomyopathie hypertrophique lorsqu'ils sont comparés à d'autres souches (Kuribayashi, 1987; Kuribayashi et al, 1988; Aiello et al, 2004). D'ailleurs, la lignée WKY a été considérée comme présentant une MVG élevée dans un croisement avec les rats F344 (Sebkhi et al, 1999). Ces caractéristiques hypertrophiques ont été considérées comme étant indépendantes de l'hypertrophie biventriculaire observée dans des sous-populations de WKY, et qui serait due à un défaut de septation (Pfeffer et al, 1979; Slama et al, 2002).

### Étude chez la souris

Chez la souris, de nombreuses manipulations génétiques *in vivo* (inactivations de gène ou surexpressions) ciblent des gènes candidats afin de disséquer les médiateurs moléculaires et biochimiques de l'HVG (Chu et al, 2002). L'altération des gènes est le plus souvent limitée aux seuls tissus cardiaques grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques du cœur. Cependant, il n'existe pas à proprement parlé de modèles consanguins sélectionnés pour une masse cardiaque élevée. Une étude récente a mis en évidence la variabilité, en conditions basales, de la MVG, de la PA et d'autres phénotypes quantitatifs à travers l'analyse systématique de 13 souches de souris consanguines (Deschépfer et al,

2004). Ainsi, la souche A/J présentait une MVG inférieure de 27% aux C57BL/6J en présence d'une pression systolique (mesurée par sphygmomanométrie à la queue, ou « *tail-cuff* ») normale et comparable (Hoit et al, 2002; Deschepper et al, 2004), ce qui concordait avec les comparaisons effectuées par d'autres entre les mêmes souches (Hoit et al, 2002; Deschepper et al, 2004). Comme ces deux lignées de souris sont éloignées d'un point de vue phylogénétique (Beck et al, 2000; Petkov et al, 2004), il était permis de présager que l'étude d'une population ségrégeante issue des A/J et des C57BL/6J mènerait à l'identification de QTL liés à la MVG.

Toutefois, l'analyse de la population F2 de rats avait mis en évidence quelques faiblesses au niveau du phénotypage. Même si la mesure par pesée directe de la MVG sur chaque animal est robuste, elle ne tient pas compte de la variabilité individuelle induite par les facteurs environnementaux. D'autre part, la PA n'avait pas été mesurée sur les rats F2. En conséquence, je n'ai pas pu écarter le fait que les QTL liés à la MVG ne soient pas aussi liés à la PA, bien que les souches parentales ne contrastent pas pour ce caractère. Enfin, le succès d'une cartographie de QTL réside dans l'analyse de phénotypes intermédiaires, qui seraient sous le contrôle d'un plus petit nombre de gènes que le caractère complexe lui-même (Rapp, 1991; Deschepper et al, 2002a). La morphologie des cardiomyocytes récapitule certaines altérations de la géométrie cardiaque lors d'une HVG chez le rat, le hamster, le chien et l'humain. Notamment, la largeur des cellules est corrélée à un remodelage concentrique du cœur, alors que leur allongement est associé à une dilatation (Gerdes, 2002). Cependant, il est impossible d'avoir accès à la fois à la MVG et aux dimensions des cardiomyocytes à partir d'un même cœur, pour des raisons expérimentales. Or, le phénotypage complet de tous les individus F2 est nécessaire car ils possèdent chacun une combinaison unique des allèles parentaux.

Les souris A/J et C57BL/6J ont servi à générer un ensemble de lignées recombinantes consanguines AXB/BXA. Dans cette population ségrégeante, chaque lignée détient une combinaison unique des allèles parentaux, et plusieurs individus génétiquement identiques peuvent être phénotypés dans une même souche. La limite importante de cette

ressource est le petit nombre de lignées disponibles, et donc le petit nombre de méioses informatives à analyser. Cependant, dans le cadre particulier d'une étude sur la MVG, les lignées recombinantes m'ont offert les bénéfices suivants :

1. Je n'ai eu à me concentrer que sur les mesures phénotypiques, le génotype des différentes lignées étant disponible dans des bases de données publiques. Les données de séquençage de plusieurs génomes de souris de laboratoire et la recherche intensive de SNP ont permis ces dernières années d'obtenir des cartes à haute résolution (Williams et al, 2001). J'ai compilé les données de génotypage (SNP et marqueurs microsatellites) afin de supprimer les loci redondants, et j'ai obtenu une carte composée de 965 marqueurs autosomaux, séparés en moyenne de 1.71 cM, et de 29 marqueurs sur le chr X, séparés en moyenne de 1.76 cM.
2. L'effet des facteurs environnementaux sur la variabilité des phénotypes a pu être minimisé, en effectuant la moyenne des mesures effectuées sur plusieurs animaux génétiquement identiques. Le petit nombre de lignées analysées est donc compensé par la qualité et la robustesse des données phénotypiques.
3. Dans une même lignée recombinante, j'ai pu évaluer plusieurs caractères connexes : la MVG, les dimensions des cardiomyocytes isolés et les différentes composantes de la PA mesurées par télémétrie. Le but était de pouvoir analyser la coségrégation de ces phénotypes.

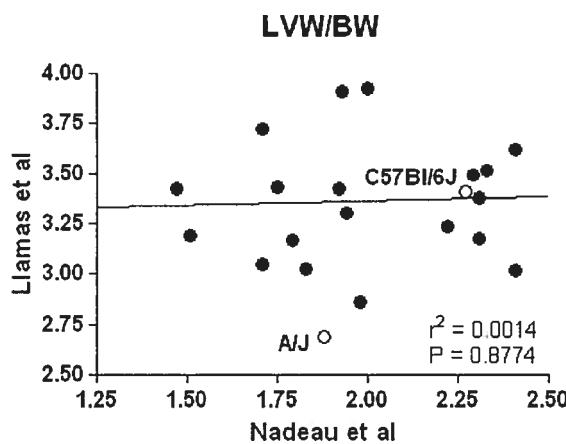
L'analyse de liaison à partir des lignées recombinantes a permis de détecter 2 QTL liés à la masse cardiaque sur les chr 13 (*Lvm1*) et 16 (suggestif, donc non nommé), à la fois chez les mâles et les femelles. Un total de 14 QTL liés à la MVG, répartis sur 10 des 19 autosomes, avaient préalablement été cartographiés dans des croisements entre des souris normotendues (Moody et al, 1999; Sugiyama et al, 2002; Leamy et al, 2002; Rocha et al, 2004). Les 2 QTL que j'ai identifiés allongent donc la liste à 16 QTL répartis sur 12 des 19 autosomes. Contrairement aux résultats obtenus chez le rat, plusieurs interactions entre QTL ont été notées (Sugiyama et al, 2002), incluant celles que j'ai décrites dans l'article 3

(chapitre 4). Enfin, aucune différence entre les sexes n'a été rapportée concernant la MVG, bien que deux études en plus de la mienne aient considéré des mâles et des femelles dans leurs analyses (Moody et al, 1999; Leamy et al, 2002). Le nombre d'analyses effectuées avec le modèle de souris est bien moins important que chez le rat, ce qui explique probablement que peu de QTL soient liés à la MVG chez la souris.

Comme dans l'analyse de la F2 de rats, j'ai constaté la présence d'un QTL transgressif. En effet, les lignées qui possèdent l'allèle A/J pour *Lvm1* ont une MVG plus élevée que celles qui ont l'allèle C57BL/6J, à l'inverse de ce qu'on observe chez les souches parentales. Ce résultat est troublant, car *Lvm1* est le seul QTL majeur lié à la MVG dans l'ensemble de lignées recombinantes AXB/BXA. Il est possible qu'un grand nombre de loci à effets modestes n'aient pas été détectés au cours de l'analyse.

### **De l'importance d'une mesure phénotypique fiable et robuste**

Le phénotypage est la pierre angulaire de toute bonne cartographie de QTL. Dans le cas particulier des caractères cardiovasculaires, le développement de méthodes fiables, reproductibles, à faible coût et de préférence non invasives représente un défi (Hoit & Nadeau, 2001). L'échocardiographie est une méthode simple qui permet une évaluation répétée et non invasive de la morphologie et des performances du VG, spécialement si elle est couplée à l'utilisation d'un transducteur à hautes fréquences (Rottman et al, 2007). Cette méthode est maintenant considérée comme un outil puissant pour phénotyper des souris modifiées génétiquement, chez lesquelles les différences entre les animaux contrôles et les mutants sont très prononcées (Collins et al, 2003). Cependant, les approches par imagerie peuvent avoir de sérieuses limitations lorsqu'un investigateur souhaite évaluer des variations naturelles parmi des souches de souris consanguines, ou des effets non pathologiques dans une condition expérimentale donnée.



**Figure 17 :** Comparaison des mesures de la MVG par pesée directe ou par échocardiographie dans l'ensemble de lignées recombinantes AXB/BXA. Les données en abscisse sont les estimations d'après les images obtenues par échocardiographie en mode M (Nadeau et al, 2003), les données en ordonnées ont été obtenues par pesée directe (tableau S1, article 3, chapitre 4). Tous les animaux sont des mâles adultes. Les souches parentales sont représentées par les cercles vides et n'ont pas été considérées dans l'analyse de corrélation.

En fait, les MVG des différentes lignées recombinantes AXB/BXA, que j'ai mesurées par pesée directe à l'aide d'une balance de précision, diffèrent énormément de celles estimées par analyse d'images échocardiographiques en mode M, et rapportées précédemment (Nadeau et al, 2003). J'ai constaté une complète absence de corrélation (0.14%) entre les 2 ensembles de données (Figure 17, ci-dessus). L'utilisation d'anesthésiants (Yang et al, 1999; Chaves et al, 2001; Takuma et al, 2001) et l'acquisition des images en mode M ou 2D (Kiatchoosakun et al, 2002) sont des sources de limitation clairement identifiées. Une cause d'erreur plus importante est due à l'extrapolation des mesures effectuées en 2 dimensions à un VG à géométrie spatiale (Kiatchoosakun et al, 2002). En effet, le postulat que le VG a grossièrement une forme ovoïde n'est pas vérifié

chez tous les individus. De plus, les 3 dimensions (épaisseurs du septum et de la paroi postérieure, et diamètre de la cavité) sont élevées au cube dans l'équation qui permet de calculer la MVG, ce qui peut amplifier les erreurs de mesure de façon dramatique. L'imagerie par résonnance magnétique est la seule méthode non invasive fiable pour mesurer la MVG, mais son application aux modèles de rongeurs est encore peu répandue et relativement coûteuse (Epstein, 2007).

En conclusion, malgré son utilité pour évaluer les différences contrastées entre les souches parentales A/J et C57BL/6J (Hoit et al, 2002), l'échocardiographie n'a apparemment pas une résolution suffisante pour détecter des variations plus subtiles au sein de l'ensemble de lignées recombinantes AXB/BXA.

## Cartographie de QTL liés à la morphologie des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes de rats néonataux ont été le premier modèle pour analyser les mécanismes de croissance du cœur. En fait, la plupart des effecteurs humoraux impliqués dans l'HVG ont été identifiés grâce à leurs effets trophiques sur les cardiomyocytes (Heineke & Molkentin, 2006). Dans un cœur adulte, les cardiomyocytes ressemblent à des cylindres à base elliptique. Ils sont arrangés dans la paroi myocardique de manière que leur longueur soit tangentielle et que leur axe transverse soit transmural. En conséquence, il a été proposé qu'un changement dans la longueur des cardiomyocytes pourrait contribuer à une dilatation ventriculaire, alors qu'un changement dans la largeur entraînerait un épaississement du myocarde. De nombreuses évidences chez le rat, le chien, le hamster et l'humain ont confirmé que les changements de morphologie des cardiomyocytes sont corrélés avec les remodelages hypertrophiques prédis (Gerdes, 2002). Il est même possible de caractériser les formes d'HVG physiologiques (qui s'observent chez les athlètes de haut niveau et les femmes enceintes) et les formes pathologiques (concentrique ou dilatée) sur la seule base de la croissance des cardiomyocytes (Heineke & Molkentin, 2006) :

1. l'hypertrophie physiologique s'accompagne à la fois d'un allongement et d'un élargissement modérés des cellules.
2. l'hypertrophie pathologique (de type concentrique) dans sa phase compensée est caractérisée par un léger allongement et par un élargissement prononcé des cardiomyocytes.
3. la dilatation cardiaque résulte d'un allongement anormal des cellules.

Ceci a mené à la pratique désormais courante de mesurer la taille des cardiomyocytes dans les modèles de souris modifiées génétiquement, afin de déterminer si l'augmentation de la masse cardiaque correspond vraiment à une HVG (Dorn et al, 2003). En corollaire, il est admis que les déterminants génétiques qui régulent l'HVG sont les mêmes que ceux qui affectent la taille des cardiomyocytes.

L'élargissement des cardiomyocytes résulte de l'ajout d'unités sarcomériques en parallèle, alors que l'allongement est dû à une sarcomogénèse en série (Grossman et al, 1975). Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'ajout des sarcomères en série, en parallèle, ou dans une combinaison des deux, ne sont pas encore complètement compris (Aoki et al, 2000; Nicol et al, 2001). Il était donc pertinent de prendre en considération la morphologie des cardiomyocytes de façon systématique dans une étude de cartographie génétique.

Les mâles C57BL/6J sont caractérisés à la fois par une taille des cardiomyocytes et par une MVG plus élevées que chez les A/J. Chez les femelles, le contraste est moins prononcé bien que significatif. En se basant sur les hypothèses et conclusions détaillées ci-dessus, il était légitime de s'attendre à une coségrégation des deux caractères dans l'ensemble de lignées recombinantes consanguines. Pourtant, l'analyse des phénotypes dans la population recombinante a montré, dans les deux sexes, une absence de coségrégation de la taille des cardiomyocytes et de la MVG.

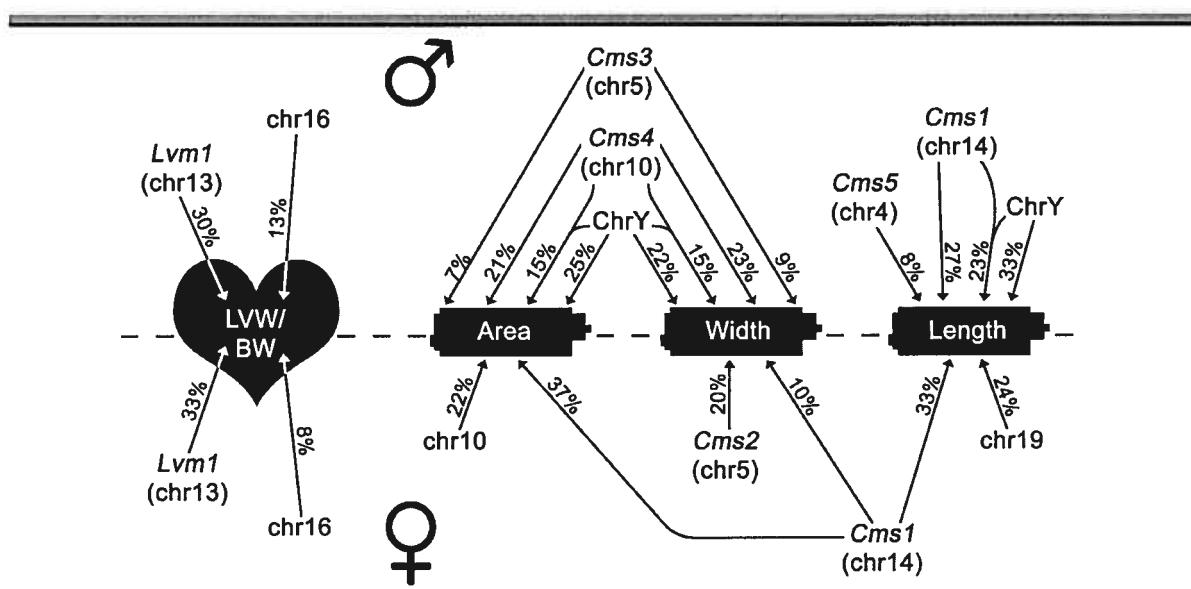
Le criblage du génome entier des 24 lignées recombinantes consanguines a permis d'identifier 7 QTL autosomaux liés aux dimensions des cardiomyocytes. Seul un locus (*Cms1* sur le chr 14) était commun aux mâles et aux femelles. *Cms3*, *Cms4* et *Cms5* (respectivement sur les chr 5, 10 et 4) étaient spécifiques des mâles, alors que *Cms2* (chr 5) et deux locis mineurs sur les chr 10 et 19 n'ont été cartographiés que chez les femelles. Comme le laissait suggérer l'analyse de coségrégation des phénotypes, aucun de ces QTL n'était commun avec ceux liés à la MVG (Figure 18, page 225). En analysant les effets alléliques des QTL, on constate que cette dichotomie est encore plus prononcée. En effet, j'ai mentionné plus haut la nature transgressive de *Lvm1*, locus majeur lié à une MVG élevée, qui est pourtant d'origine A/J. Dans le cas des QTL liés à la taille des cardiomyocytes, j'ai observé au contraire que les effets alléliques de tous les loci étaient orientés dans la direction indiquée par les souches parentales, à savoir une augmentation de la taille des cellules lorsque le QTL vient des C57BL/6J.

Les résultats de l'analyse de liaison au niveau des autosomes semblent corroborer les observations qui montrent que l'élargissement et l'allongement des cardiomyocytes correspondent à des mécanismes moléculaires différents, à la fois à l'intérieur d'un même sexe et entre les sexes. En effet, chez les femelles j'ai remarqué que *Cms1* est lié à toutes les composantes de la taille des cardiomyocytes (longueur, largeur et surface), alors que *Cms2*, le locus sur le chr 19 et celui sur le chr 10 sont chacun uniquement liés à la largeur, la longueur et la surface, respectivement (Figure 18, page 225). Chez les mâles, la longueur est régulée par *Cms1* et *Cms5*. Par contre, la largeur et la surface sont sous le contrôle commun de *Cms3* et *Cms4*, qui ne sont pas liés à la longueur (Figure 18, page 225). Il semble donc que la régulation de la surface des cardiomyocytes s'opère principalement via un élargissement des cellules chez les mâles, et via un allongement chez les femelles.

Cette étude est la première à considérer la morphologie des cardiomyocytes comme étant un caractère quantitatif intermédiaire de la MVG. De façon surprenante, une augmentation de la taille des cellules ne conduit pas nécessairement à une augmentation de la MVG. De plus, des loci différents peuvent influencer les deux phénotypes de façon

indépendante. En conséquence, il est risqué d'admettre que des modifications génétiques vont altérer automatiquement à la fois la MVG et la taille des cardiomycocytes, surtout si le fonds génétique est C57BL/6J. Il semble que les conclusions tirées à partir des observations faites dans d'autres modèles animaux et chez l'humain ne soient pas applicables dans le cas particulier d'une population dérivée des C57BL/6J et A/J.

Une hypothèse intéressante pour expliquer l'absence de corrélation génétique entre la masse cardiaque et la taille des cardiomyocytes serait que le nombre de cellules est différent entre les C57BL/6J et les A/J. Ce phénotype pourrait en plus être l'objet d'une cartographie génétique puisqu'il est quantitatif, et probablement sous contrôle polygénique. Cependant, des limitations techniques empêchent de déterminer efficacement le nombre de cardiomyocytes dans un cœur de souris. La mise au point d'une méthode de comptage des différents types de cellules cardiaques fait partie des objectifs à court ou moyen terme de mon laboratoire.



**Figure 18 :** Schéma récapitulatif des QTL cartographiés lors de l'analyse des lignées recombinantes consanguines de souris.

## Cartographie de QTL liés à la pression artérielle

### Étude chez le rat

Plusieurs maladies augmentent le risque de développer une HVG, incluant l'hypertension artérielle. Certaines formes d'hypertension sont monogéniques mais la plupart des humains souffrent surtout d'hypertension essentielle (polygénique) considérée alors comme une maladie complexe (Hamet et al, 1998). Afin d'identifier des QTL liés à la PA, un très grand nombre d'études ont utilisé soit des croisements expérimentaux entre des souches de rat consanguins, soit des populations dérivées, comme par exemple les lignées recombinantes consanguines de rats BXH/HXB. Près de 300 QTL liés à la PA sont aujourd'hui recensés dans la base de données publique *Rat Genome Database* (<http://rgd.mcw.edu>).

Dans toutes les études, les investigateurs ont utilisé une souche parentale qui développe une hypertension soit spontanément (par exemple SHR, SHRSP, *Lyon Hypertensive*), soit à la suite d'une induction (par exemple avec l'ingestion de sel chez les rats *Dahl Sensitive* et *Sabra Sensitive*). De plus, la plupart des QTL sont liés essentiellement à la pression systolique (PS) car les investigateurs ont effectué les mesures par sphygmomanométrie à la queue. C'est une méthode qui a le mérite d'être non invasive et peu coûteuse, mais la précision de la mesure dépend en grande partie de l'expérimentateur et du confort de l'animal. En effet, le niveau de stress augmente facilement chez ce dernier puisque la mesure requiert son immobilisation dans un tube de contention. D'autre part, les variables de pression diastolique (PD) et de pression pulsatile (PP) ne sont pas mesurables par sphygmomanométrie à la queue. Seules 5 études, incluant celle que j'ai effectuée, ont utilisé un dispositif intra-artériel qui mesure en continu la PA pendant plusieurs jours, sur des animaux libres de tout mouvement (Dubay et al, 1993; Clark et al, 1996; Llamas et al, 2006; Herrera et al, 2006; Soler et al, 2006). La télémétrie nécessite une chirurgie et un délai de récupération des animaux implantés avec le dispositif, mais elle permet d'accéder à toutes les composantes de la PA de manière très précise.

La PP est la différence entre la PS et la PD. Cette variable quantitative dépend à la fois de la force d'éjection ventriculaire et des propriétés intrinsèques du système vasculaire. En particulier, la rigidité des grosses artères gouverne leur capacité à amortir le flux sanguin, ainsi que la synchronisation et l'intensité des ondes de réflections (Laurent et al, 2005). Or ces phénomènes ont un impact direct sur la PP (Safar et al, 2003). La PP, tout comme la MVG, est un prédicteur puissant de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires, en particulier chez les patients âgés (Verdecchia et al, 1998; Khattar et al, 2001; Franklin et al, 2001; Asmar et al, 2001; Van Popele et al, 2001; Herrington et al, 2003; Verhave et al, 2005; Lekakis et al, 2006). De plus, sa valeur prédictive est indépendante des autres facteurs de risque, ce qui lui confère un intérêt particulier en comparaison des pressions diastolique et systolique. Pourtant, aucun modèle animal n'a permis d'isoler des QTL spécifiques de la PP, alors que chez l'humain 4 loci ont été rapportés dans une seule étude (DeStefano et al, 2004).

Au cours d'une collaboration, j'ai effectué l'analyse d'un croisement F2 entre deux souches de rats normotendus, afin de mettre en évidence des QTL liés aux différentes composantes de la PA (voir article 2, chapitre 3). Les rats BN présentent une PD, une PS et une PP plus basses que les rats WKY, bien que les valeurs dans les 2 lignées se situent dans des limites considérées comme normales. J'ai donc analysé une population de mâles F2 afin de savoir comment les trois variables pourraient ségrégner. L'analyse de coségrégation des phénotypes a révélé une corrélation modeste mais significative entre la PP et la PS (34.5%), et aucune corrélation entre la PP et la PD (0.1%). Ceci suggérait l'existence de déterminants génétiques communs entre la PP et la PS, en même temps qu'une indépendance génétique de la PP et de la PD. Deux QTL majeurs liés à la PP ont été identifiés, sur les chr 4 et 16 (respectivement *Pp1* et *Pp2*). Les autres QTL, tous suggestifs, étaient liés soit à la PP, soit à la PS. Aucun QTL n'a été détecté en analysant la PD.

*Pp1*, sur le chr 4, colocalise avec un QTL suggestif lié à la PS. Il n'est pas impossible que les deux QTL soient distincts, bien que très proches, mais les profils des courbes de LOD score et le fait qu'il y ait une certaine coségrégation des 2 phénotypes dans

la population F2 suggèrent une liaison simultanée. Des résultats similaires ont déjà été rapportés auparavant avec d'autres croisements expérimentaux. Par exemple, l'étude d'une population F2, issue du croisement entre les 2 souches Lyon normotendue et hypertendue, a montré une liaison simultanée à la PP et à la PS sur le chr 13 (Dubay et al, 1993). De façon intéressante, les auteurs ont aussi observé une absence complète de coségrégation en analysant les phénotypes PP et PD. D'autre part, l'analyse d'un croisement F2 entre les lignées SHRSP et WKY a indiqué une colocalisation de QTL liés aux trois composantes de la PA, uniquement lorsque les animaux avaient été mis sur un régime riche en sel (Clark et al, 1996).

*Pp2*, sur le chr 16, est le premier QTL lié à la PP indépendamment de la PA dans un modèle animal. Ce résultat est important car les mécanismes moléculaires à la base de la PP et de la rigidité artérielle sont encore méconnus. On sait que de nombreux facteurs sont impliqués, incluant les propriétés de la matrice extracellulaire, les propriétés des cellules vasculaires et les effets de quelques hormones sur la fonction endothéliale (Zieman et al, 2005; Laurent et al, 2005). Le développement de lignées congéniques pour *Pp2* permettrait d'envisager d'aller plus loin dans l'identification du ou des gènes impliqués spécifiquement dans la régulation de la PP.

Enfin, la rigidité des grosses artères altère la dynamique pulsatile du flux sanguin, créant ainsi une surcharge de travail pour le cœur. Or ce phénomène est la principale cause d'HVG chez les patients atteints d'insuffisance rénale terminale, chez qui on observe une calcification vasculaire importante (Nitta et al, 2004; Guerin et al, 2006). La mise en évidence d'un locus qui régule de façon distincte la PP est intéressante, car ce locus pourrait aussi être impliqué dans la régulation de la MVG indépendamment de la PA.

## Étude chez la souris

Comme mentionné plus haut, j'ai mesuré la PA par télémétrie dans les souches parentales et les 24 lignées recombinantes AXB/BXA. Le but était de vérifier si les loci liés à la MVG ou aux dimensions des cardiomycocytes pouvaient aussi être liés à la PA.

Les A/J et les C57BL/6J avaient des valeurs de PS, PD et PP semblables dans chaque sexe. Ce manque de contraste entre les souches parentales laissait penser qu'aucun QTL ne serait détecté en relation avec ces phénotypes. Cependant, la distribution assez étendue des valeurs dans les lignées recombinantes a justifié l'analyse de liaison. De plus, au moins 2 études ont été menées avec succès bien que les souches parentales ne présentaient pas de différences phénotypiques majeures (Sugiyama et al, 2002; Llamas et al, 2005a).

Dans les deux sexes, les analyses de corrélation des phénotypes dans la population recombinante ont montré une absence de coségrégation de la PA et de la taille des cardiomycocytes (~2%), et une corrélation relativement peu élevée de la PA et de la MVG (~25%). Le criblage génomique n'a révélé, quant à lui, aucun QTL lié à l'une ou l'autre variable de la PA.

Ces résultats montrent que les C57BL/6J et les A/J partagent des allèles communs pour réguler la PA. D'autre part, les résultats impliquent qu'aucune composante de la PA ne peut être responsable des différences observées au niveau de la MVG et de la taille des cardiomycocytes.

## Du QTL au gène causal

### Cumuler les évidences expérimentales pour prouver la causalité

L'analyse partielle du croisement F2 entre les rats consanguins WKY et WKHA, avant mon arrivée au laboratoire, avait conduit à l'identification du QTL majeur *Cm24* lié à la MVG, sur le chr 5 et uniquement chez les mâles (Deschepper et al, 2001). Du fait que l'ANF était fortement et inversement corrélée à la MVG dans cette population (Masciotra et al, 1999), et que le gène *Nppa* codant pour l'ANF se trouvait dans la région de *Cm24*, l'analyse de liaison s'est révélée encore plus significative en considérant les variations quantitatives de l'ANF ventriculaire, à la fois chez les mâles et les femelles (Deschepper et al, 2001; Boutin-Ganache et al, 2002). Une fois de plus, cet exemple illustre l'intérêt de favoriser l'utilisation de phénotypes intermédiaires qui peuvent augmenter la puissance de la liaison, parce qu'ils sont selon toute vraisemblance sous le contrôle d'un nombre restreint de gènes par rapport au phénotype complexe.

L'analyse détaillée des effets du locus, dans des lignées de rats congéniques, a mené ensuite à considérer la morphologie des cardiomycocytes comme un autre phénotype intermédiaire intéressant à analyser, plus robuste et sensible que la MVG. En effet, la largeur des cardiomycocytes, classiquement associée au remodelage concentrique chez le rat, était clairement affectée par *Cm24* dans les souches congéniques. Les effets du locus au niveau de la MVG étaient, quant à eux, beaucoup plus modérés dans les mêmes lignées congéniques (Boutin-Ganache et al, 2002). D'autre part, j'ai participé à une étude montrant l'impact d'une surcharge de volume, induite par une fistule aorto-cavale, sur les rats congéniques. Les résultats ont démontré que *Cm24* induit un remodelage concentrique du VG modeste dans des conditions basales, alors qu'il est associé à une dilatation prononcée et à un dysfonctionnement du VG lorsque le cœur est soumis à un stress hémodynamique. Les effets étaient visibles à la fois au niveau cellulaire et au niveau de la géométrie cardiaque (Souzeau et al, 2006). La conclusion majeure de cette étude est que les effets

d'un locus génétique sur le remodelage cardiaque peuvent être fortement modulés par les conditions environnementales.

L'identification d'un polymorphisme ayant un impact sur l'expression de *Nppa* a permis de considérer ce gène comme un candidat sérieux dans l'HVG. Les rats WKHA, qui présentent une HVG concentrique et qui ont des niveaux bas d'ANF ventriculaire, ont un allèle hypomorphe de *Nppa* (Deschepper et al, 2001). De nombreux modèles de souris modifiées génétiquement ont d'ailleurs confirmé la validité de ces résultats. En particulier, les inactivations géniques de *Nppa* et de *Npr1* (codant pour le récepteur à l'ANF) sont associées à la fois à un remodelage concentrique et à une hypertension en conditions basales (John et al, 1995; Lopez et al, 1995; Oliver et al, 1997; Chusho et al, 2000; Kishimoto et al, 2001; Kuhn et al, 2002). L'augmentation de la PA, qui s'explique par le fait que l'ANF systémique est connu pour ses effets natriurétiques et vasodilatateurs, peut cependant influencer le développement d'un remodelage cardiaque. Le contrôle de la PA par des moyens pharmacologiques, ou la restriction de l'inactivation de *Npr1* aux seuls cardiomycocytes, ont permis de montrer que l'absence de signalisation de l'ANF induit bien une HVG basale indépendamment des facteurs hémodynamiques. Dans ces mêmes conditions de PA normale, le cœur est l'objet d'une hypertrophie prononcée, accompagnée d'une perte de fonction, en réponse à une surcharge de travail (Knowles et al, 2001; Holtwick et al, 2003). À l'inverse, deux études (dont une effectuée dans mon laboratoire d'accueil) ont montré que l'activation de la voie de signalisation de l'ANF, par surexpression d'un de ses effecteurs dans les cardiomycocytes, a des effets protecteurs lorsque le cœur est soumis à une surcharge de travail (Kishimoto et al, 2001; Zahabi et al, 2003). Ces effets sont particulièrement visibles au niveau des cardiomycocytes.

L'ensemble de ces travaux illustre la pertinence d'exploiter la cartographie génétique dans des modèles animaux. Sans faire d'hypothèse préalable, il a été possible de mettre en évidence un gène dont le polymorphisme explique des variations quantitatives à la fois au niveau de l'organe (MVG), au niveau cellulaire (morphologie des cardiomycocytes) et au niveau moléculaire (concentration ventriculaire en ANF).

Finalement, cette étude de liaison pionnière a pavé la voie à une récente étude d'association chez l'humain, dans laquelle des variants alléliques du gène NPPA et de NPR1 ont été impliqués dans la modulation de la masse cardiaque (Rubattu et al, 2006).

Toutefois, le bilan des gènes identifiés depuis le début des années 90 révèle que le succès de l'approche de cartographie des caractères complexes dans les modèles animaux est très modéré. Les bases de données génomiques de la souris (*Mouse Genome Informatics*, <http://www.informatics.jax.org>) et du rat (*Rat Genome Database*, <http://rgd.mcw.edu>) recensent, en avril 2007, près de 4750 QTL cartographiés dans les deux espèces. Malgré ce nombre important de loci, moins de 1% ont été caractérisés au niveau moléculaire et ont mené à la validation de gènes candidats, incluant *Nppa* (Korstanje & Paigen, 2002; Glazier et al, 2002; Flint et al, 2005). En comparaison, la base de données sur les maladies mendéliennes humaines (OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contenait, en janvier 2007, 2048 phénotypes caractérisés au niveau moléculaire, pour un total de 11 224 gènes mutés (McKusick, 2007).

La cartographie de QTL dans les modèles murins n'a donc pas encore tenu ses promesses d'identification de gènes impliqués dans les maladies complexes humaines (Moore & Nagle, 2000). Toutefois, l'importance des QTL dans l'amélioration des connaissances des mécanismes pathologiques ne doit pas être sous-estimée. L'ensemble des résultats accumulés à ce jour montre qu'effectivement, l'architecture génétique des maladies complexes est subtile. Le récent séquençage des génomes du rat, de la souris et de l'humain a entraîné le développement d'outils et de méthodes bioinformatiques pour analyser les QTL (DiPetrillo et al, 2005). En conséquence, la communauté internationale des généticiens des caractères complexes (*Complex Trait Consortium*) affirme que la combinaison des approches expérimentales et bioinformatiques permettra, dans un avenir proche, d'élucider les bases moléculaires de la susceptibilité et de la sévérité des maladies humaines les plus fréquentes (Complex Trait Consortium, 2003; Complex Trait Consortium et al, 2004).

## Affiner et confirmer la localisation d'un QTL

### Analyses bioinformatiques

Le génome des souches de rats ou de souris consanguins est un mélange de différentes sous-espèces qui ont été hybridées en animalerie ou dans les laboratoires. Il en résulte une structure en mosaïque composée de segments ancestraux, dans lesquels les combinaisons alléliques des SNPs se retrouvent sous forme de blocs d'haplotypes (Cuppen, 2005; Yang et al, 2007). En conséquence, la variation génétique entre les souches d'animaux de laboratoire est ancestrale, ce qui signifie que l'allèle de susceptibilité d'un QTL provient d'une source ancestrale et que l'allèle de résistance provient d'une autre source ancestrale. Si un QTL est localisé à la même position dans plusieurs croisements, on peut assumer que toutes les souches qui portent l'allèle de susceptibilité partagent le même allèle ancestral du gène causal, de même que pour les souches qui portent l'allèle de résistance.

L'analyse de croisements combinés est basée sur cette hypothèse d'un gène causal ancestral (DiPetrillo et al, 2005). C'est une méthode qui permet de diminuer l'intervalle de confiance de façon statistique, sans expériences supplémentaires. La colocalisation des loci *Lvm13/Cm57* (article 1, chapitre 2) et *Cm26* (Tsujita et al, 2000) à l'extrémité télomérique du chr 17 permettrait ce genre d'analyse, d'autant plus que la méthode de phénotypage est identique dans les deux études. En admettant que j'obtienne les données de Tsujita et al, il faudrait recoder les génotypes des souches qui portent l'allèle du QTL lié à une masse cardiaque élevée (SHR et WKY) par un allèle arbitraire H (pour « High »), et ceux des souches qui portent l'allèle du QTL lié à une MVG faible (LEW et WKHA) par un allèle arbitraire L (pour « Low »). Ainsi je pourrais effectuer une nouvelle analyse de liaison à partir de cette population combinée. Le résultat de la cartographie devrait mener à une réduction de l'intervalle de confiance, et donc du nombre de gènes candidats présents dans la région (DiPetrillo et al, 2004; Li et al, 2005; Ishimori et al, 2006).

Cette stratégie ne peut pas s'appliquer au QTL *Lvm12/Cm58* (article 1, chapitre 2) localisé à la même position que *Lvm4/Cm25* (Sebkhi et al, 1999). En effet, l'analyse de croisements combinés est basée sur le recodage allélique de multiples souches. Dans le cas présent, la souche WKY est commune aux deux croisements expérimentaux et porte l'allèle lié à une MVG élevée, ce qui devrait diminuer le pouvoir statistique de l'analyse.

Une autre méthode bioinformatique pour affiner la cartographie d'un QTL est l'analyse d'haplotypes dans un intervalle spécifique (Cuppen, 2005). Étant donné qu'environ 95% de la variation génétique entre deux souches consanguines est d'origine ancestrale (Frazer et al, 2004; Yang et al, 2007), les régions d'identité par descendance entre deux souches utilisées pour cartographier un QTL ne contiennent probablement pas le polymorphisme causal (Wiltshire et al, 2003). On peut donc assumer que les segments de sources ancestrales différentes contiennent le gène causal, et limiter la recherche de gènes candidats à ces régions. Les loci *Lvm13/Cm57* (article 1, chapitre 2) et *Cm26* (Tsujita et al, 2000) à l'extrémité télosomique du chr 17 se prêteraient bien à ce genre d'analyse. Toujours à condition d'obtenir les données de Tsujita et al, je pourrais grouper les données génotypiques dans l'intervalle du QTL en souches qui portent l'allèle lié à une MVG élevée (« *High* ») d'une part, et en souches qui portent l'allèle lié à une faible MVG (« *Low* ») d'autre part. Les régions dont le génotype est à la fois partagé parmi les souches « *High* » et « *Low* » séparément et différent entre les groupes « *High* » et « *Low* », seraient considérées comme un bloc d'haplotype susceptible de contenir le polymorphisme causal. Cependant, les ressources publiques en SNP sont encore peu développées chez le rat (Zimdahl et al, 2004). D'autre part, la souche WKHA n'est pas une lignée communément utilisée et ne fera probablement pas l'objet d'un génotypage intensif. L'analyse d'haplotypes ne semble donc pas envisageable dans le cas particulier de cette étude.

Ces stratégies bioinformatiques ne peuvent être appliquées à l'étude que j'ai effectuée chez la souris. En effet, aucun des QTL identifiés n'a révélé de colocalisation avec un autre QTL cartographié précédemment chez la souris ou dans des régions synténiques chez le rat. Il est toutefois possible que d'autres études soient effectuées dans

l'avenir, d'où l'intérêt de mettre les données à la disposition de la communauté (tableaux supplémentaires de l'article 3, chapitre 4). En particulier, le projet « *Collaborative Cross* » a pour objectif de créer un millier de souches de souris recombinantes consanguines à partir de 8 souches parentales. Cet ensemble de lignées de référence permettra d'exploiter l'analyse d'haplotypes à l'échelle des génomes entiers, et plus particulièrement au niveau des intervalles spécifiques que sont les QTL que j'ai identifié.

### Cartographie physique

La possibilité de comparer les résultats de plusieurs analyses de cartographie indépendantes, utilisant des souches parentales différentes, offre l'avantage de pouvoir confirmer la position d'un QTL (Lander & Kruglyak, 1995). En effet, l'identification et l'impact d'un QTL dépendent entièrement du fonds génétique dans lequel il se trouve (Lander & Schork, 1994). Le fait de cartographier un QTL lié à un caractère particulier dans plusieurs fonds génétiques permet de s'assurer de sa robustesse, et augmente les chances de succès d'une cartographie fine. Ainsi, l'intervalle de confiance de *Lvm13/Cm57*, à l'extrémité télomérique de la bande q12.3 du chr 17, coïncide parfaitement avec celui de *Cm26* détecté auparavant dans un croisement F2 entre les souches de rats consanguins LEW et SHR (Tsujita et al, 2000). La région génomique, restreinte à 10 Mb, contient une cinquantaine de gènes présumés et 10 gènes connus, parmi lesquels certains peuvent avoir un impact cardiaque.

J'ai donc entrepris de développer des lignées congéniques réciproques pour *Lvm13/Cm57*. Ces lignées sont obtenues par croisements en retour successifs entre la souche donneuse qui possède le locus d'intérêt (dont la présence est contrôlée par génotypage à chaque génération) et la souche receveuse (Snell, 1948). Dix générations de croisements en retour permettent d'obtenir des animaux hétérozygotes pour le locus d'intérêt, et qui possèdent 99.9% du génome de la souche receveuse. Un inter-croisement est alors nécessaire pour générer les individus homozygotes de la lignée congénique. Afin

d'obtenir de telles lignées plus rapidement, il est possible de sélectionner, à chaque génération, le mâle qui présente le plus grand enrichissement en génome de la souche receveuse, et de le croiser avec une femelle de cette souche (Lander & Schork, 1994). Cette méthode des congéniques rapides (« *speed congenics* ») est basée à la fois sur le génotypage du locus d'intérêt et sur le criblage du génome entier. Elle permet d'obtenir des lignées congéniques en seulement 5 générations, incluant l'inter-croisement (Markel et al, 1997; Wakeland et al, 1997). Au moment de la rédaction de la présente thèse, les animaux congéniques réciproques pour *Lvm13/Cm57* sont générés. Il reste maintenant à vérifier que le locus a un impact sur la MVG et/ou la morphologie des cardiomyocytes dans ces lignées, avant de s'intéresser précisément aux gènes présents dans la région.

La cartographie génétique que j'ai effectuée chez la souris est basée sur une forte densité de marqueurs, ce qui a permis d'obtenir des intervalles de confiance restreints par comparaison avec les études chez le rat. Cependant, aucun gène candidat flagrant n'a pu être identifié sur la base d'une fonction avérée dans l'HVG. Cette stratégie fondée sur l'évidence souffre toutefois de limitations, car elle peut nous éloigner du gène qui est réellement lié au caractère d'intérêt mais qui n'aurait pu être suspecté à partir de sa fonction connue (Olofsson et al, 2003). L'identification d'un gène responsable repose donc sur le développement de lignées congéniques, ce qui sera facilité par la disponibilité de lignées substituées pour tous les chromosomes, issues des souris C57BL/6J et A/J. En particulier, le QTL *Lvm1* se prête particulièrement bien au développement de lignées congéniques car il est commun aux 2 sexes et l'intervalle de confiance fait moins de 4 cM.

## Les différences génétiques entre les sexes

### Des loci autosomaux différents entre les sexes

Les résultats les plus marquants de l'article 1 (chapitre 2) et de l'article 3 (chapitre 4) concernent les différences sexuelles dans la régulation de la MVG, ou de la taille des

cardiomyocytes, par des loci autosomaux. Comme je l'ai détaillé en introduction (voir aussi la revue en annexe 2), le sexe est un puissant modulateur des maladies cardiovasculaires chez l'humain et les animaux de laboratoire. En particulier, le sexe affecte la morphologie et la fonction cardiaques, et joue un rôle déterminant dans l'évolution pathologique du remodelage hypertrophique (Leinwand, 2003; Du, 2004; Czubryt et al, 2006; Du et al, 2006; Deschepper & Llamas, 2007).

Pourtant, la plupart des études de liaison à la MVG chez le rat ont été effectuées uniquement chez les mâles (Innes et al, 1998; Sebkhi et al, 1999; Tsujita et al, 2000; Garrett et al, 2000; Deschepper et al, 2001; Stoll et al, 2001; Siegel et al, 2003; Garrett et al, 2003; Bilusic et al, 2004; Seda et al, 2005; Di Nicolantonio et al, 2006; Garrett et al, 2006). Une seule étude s'est intéressée spécifiquement aux femelles (Moreno et al, 2003). La raison principale, bien qu'elle n'ait pas toujours été formulée clairement, est que les femelles sont soumises à un cycle hormonal qui peut entraîner une variabilité phénotypique individuelle importante. Or, comme je l'ai mentionné en introduction, les valeurs mesurées chez un animal F2 ou N2 doivent être fiables, afin de ne pas introduire d'erreurs de type I ou II dans l'analyse de liaison. Par ailleurs, les quelques études qui ont examiné à la fois les mâles et les femelles dans leurs croisements n'ont pas forcément considéré le sexe comme une covariable dans les analyses de liaison. Certains ont plutôt choisi de normaliser les données pour les différences observées entre mâles et femelles, alors que d'autres ont simplement analysé les deux sexes ensemble (Cicila et al, 1997; Cicila et al, 1999; Kato et al, 1999; Gauguier et al, 2005). En fait, ce n'est que récemment que les investigateurs ont pris en compte le sexe dans les analyses (Boutin-Ganache et al, 2002; Ueno et al, 2003; Inomata et al, 2005; Llamas et al, 2005b; Herrera et al, 2006), ce qui a permis de constater qu'au moins un locus autosomal était systématiquement spécifique d'un sexe dans chaque étude. Chez la souris, deux études de liaison à la MVG ont considéré uniquement des mâles (Sugiyama et al, 2002; Rocha et al, 2004) et deux autres ont normalisé les différences observées entre mâles et femelles (Moody et al, 1999; Leamy et al, 2002). L'étude des lignées recombinantes que j'ai effectuée est donc la seule, chez la souris, à avoir considéré l'effet du sexe dans une analyse de liaison. L'ensemble de ces observations suggère très

fortement que les réseaux génétiques à la base de la régulation de la MVG sont (au moins en partie) différents en fonction du sexe, ce qui ajoute un degré de complexité supplémentaire au déterminisme génétique de la masse cardiaque.

Les modèles de mutagénèse dirigée chez la souris ont d'ailleurs montré des résultats similaires. Certaines mutations n'ont d'effets que chez les mâles. Par exemple, l'inactivation du gène codant pour FKBP2.6, une protéine membranaire du reticulum sarcoplasmique impliquée dans le contrôle du flux de  $\text{Ca}^{2+}$ , induit une hypertrophie seulement chez les mâles (Xin et al, 2002). La même chose s'observe avec l'inactivation de CD38, une enzyme impliquée dans la signalisation du  $\text{Ca}^{2+}$  (Takahashi et al, 2003). D'une manière générale, il semble que les mâles soient plus sensibles que les femelles aux modifications génétiques qui mènent à une hypertrophie. Ainsi le cœur des mâles est l'objet d'un remodelage plus sévère que celui des femelles lors de la surexpression du phospholamban (Dash et al, 2003), du TNF $\alpha$  (Kadokami et al, 2000; Funakoshi et al, 2002) et du récepteur adrénnergique  $\beta 2$  (Gao et al, 2003), ou lors de l'inactivation de *Npr1* (Oliver et al, 1997) et de eNOS (Li et al, 2004a).

Toutes ces différences pourraient être dues aux hormones sexuelles. Par exemple, j'ai montré dans l'article 1 (chapitre 2) que la largeur des cardiomyocytes chez les WKHA et les WKY est identique avant la puberté, et que les cellules deviennent progressivement plus larges chez les WKHA avec la maturité sexuelle. Dans ce modèle, l'élargissement des cardiomyocytes est clairement associé à une HVG concentrique chez les mâles (Boutin-Ganache et al, 2002; Deschepper et al, 2002b). D'autre part, la seule différence moléculaire évidente réside dans l'allèle hypomorphe de *Nppa* chez les WKHA, qui n'a été lié à l'HVG que chez les mâles (Deschepper et al, 2001). Or, il a été montré que les hormones sexuelles interagissent avec la signalisation de l'ANF. En fait, les différences de remodelage hypertrophiques entre mâles et femelles suite à l'inactivation de *Npr1* dépendent de la présence des androgènes (Li et al, 2004b). D'un autre côté, les estrogènes exercent des effets antihypertrophiques sur les cardiomyocytes néonataux via une activation de la signalisation de l'ANF dans les cellules (Babiker et al, 2004). Ces résultats, dans leur

ensemble, pourraient expliquer pourquoi *Cm24* est lié aux variations de MVG observées spécifiquement chez les mâles.

## Différences dues aux chromosomes sexuels

L'étude des effets des chromosomes sexuels, en génétique des caractères complexes, nécessite d'élaborer une stratégie de croisement particulière. En effet, il est important d'effectuer des croisements F1 réciproques entre les souches parentales P1 et P2, c'est-à-dire croiser des femelles P1 avec des mâles P2, et des femelles P2 avec des mâles P1. Seule cette procédure permet de déterminer si les chromosomes sexuels portent une information génétique susceptible d'influencer le caractère d'intérêt. En effet, les individus mâles des deux croisements F1 réciproques auront des valeurs phénotypiques identiques si tous les QTL sont sur des autosomes. Par contre s'il y a au moins un QTL sur les chromosomes sexuels, les valeurs phénotypiques seront différentes entre les mâles F1 réciproques, selon l'origine parentale des chromosomes sexuels hétérologues.

Une seule étude a rapporté un effet des chromosomes sexuels sur la MVG au milieu des années 90, dans laquelle les investigateurs ont conclu que le chr X des rats *Lyon Hypertensive* contribuait à une augmentation de la MVG (Vincent et al, 1996). Cette étude reposait sur une analyse poussée de la ségrégation des chromosomes sexuels, dans des croisements F1 et des rétro-croisements réciproques. La non disponibilité de marqueurs génétiques à l'époque de l'étude ne leur a pas permis d'effectuer une étude de liaison. Aucune autre étude, chez le rat ou chez la souris, n'a rapporté d'effet des chromosomes sexuels sur la MVG. Ceci est principalement dû au fait que la majorité des investigations ont utilisé des croisements unidirectionnels pour générer les F1. Ceux qui ont pris soin de faire des croisements réciproques n'ont pas détecté de dimorphisme entre les mâles F1, ou n'ont simplement pas analysé les F1 et sont passés directement à la génération de la population ségrégeante.

L'analyse des F1 réciproques entre les souris A/J et C57BL/6J a montré que les mâles différaient pour la taille des cardiomyocytes, mais pas pour la MVG. La seule manière d'imputer sans ambiguïté les effets observés à l'un ou l'autre des 2 chromosomes sexuels est d'utiliser des lignées consomiques réciproques pour le chr Y (Negrin et al, 2001). J'ai ainsi pu prouver que les différences de taille des cardiomyocytes étaient dues au chr Y (plus précisément à la partie non recombinante, spécifique des mâles), celui des C57BL/6J étant associé à une élongation des cellules.

Il est normalement impossible d'effectuer une cartographie génétique sur le chr Y, notamment en raison de sa nature haploïde et, donc, de l'absence de recombinaison à la méiose (Charchar et al, 2003). Cependant, l'effet majeur du chr Y sur la taille des cardiomyocytes dans les lignées consomiques suggérait qu'il pourrait avoir un impact dans l'ensemble des lignées recombinantes. D'un point de vue pratique, j'ai donc considéré l'origine du chr Y (A/J ou C57BL/6J) comme une covariable additive ou interactive dans le criblage génomique des lignées recombinantes, pour les différentes composantes de la morphologie cellulaire. De cette manière, j'ai pu cartographier des loci autosomaux liés aux caractères d'intérêt, tout en tenant compte de l'influence du chr Y. Cette approche a été rendue possible en utilisant le logiciel d'analyse R/qtl. À ma connaissance, aucun autre logiciel public d'analyse de liaison n'offre à la fois la prise en compte d'une covariable qualitative (l'origine du chr Y) et la possibilité de modéliser une architecture génétique afin d'appréhender les effets additifs ou interactifs des QTL cartographiés.

Finalement, j'ai révélé des interactions du chr Y avec les deux QTL autosomaux *Cms3* et *Cms4* (sur les chr 5 et 10 respectivement). Le chr Y semblait donc contribuer de façon majeure, individuellement et par le biais d'effets épistatiques, aux régulations conjointes de la longueur, de la largeur et de la surface des cardiomyocytes (Figure 18, page 225). C'est la première fois qu'une analyse de ce genre est effectuée.

Très peu de travaux ont montré que des polymorphismes du chr Y pouvaient être liés à un phénotype cardiovasculaire. Chez l'humain, 4 études ont révélé une influence du chr Y sur la PA (Ellis et al, 2000; Charchar et al, 2002; Shankar et al, 2007), sur les niveaux

de cholestérol HDL (Shoji et al, 2002) et sur les niveaux de cholestérol LDL (Charchar et al, 2004). Chez le rat, la substitution du chr Y entre des souches hypertendues (SHR, SHRSP) et normotendues (WKY, BN) a permis de prouver clairement que le chr Y était lié à la PA (Ely et al, 1997; Negrin et al, 2001; Kren et al, 2001). Ce résultat n'a pu être généralisé car certaines lignées hypertendues ne montrent aucun effet du chr Y sur la PA (Charchar et al, 2003; Yagil et al, 2003). L'effet du chr Y sur la masse cardiaque n'a jamais été testé directement, mais des variants alléliques de ce chromosome ont été associés avec l'activité du système nerveux sympathique, la sensibilité au sel et des phénotypes lipidiques (Ely et al, 2000; Charchar et al, 2003). Toutes ces variables peuvent, en plus de la PA, avoir un impact sur le remodelage ventriculaire. Toutefois, tous ces caractères sont la résultante physiologique d'un grand nombre de facteurs moléculaires, biochimiques et cellulaires, et les mécanismes par lesquels le chr Y influence ces phénotypes n'ont jamais été décrits. L'étude de liaison que j'ai complétée montre pour la première fois l'impact du chr Y sur un type cellulaire bien défini. Ces effets sont puissants et robustes puisqu'ils sont à la base de variations importantes de la taille des cardiomyocytes, à la fois dans le fonds génétique pur des souches parentales et dans celui composite des F1 et des lignées recombinantes.

## Le chromosome Y et les androgènes

Le chr Y des lignées de souris de laboratoire provient de la sous-espèce asiatique *Mus musculus molossinus*, alors que le reste du génome nucléaire est une mosaïque contenant des fragments originaires de *M.m.domesticus*, *M.m.musculus* et *M.m.castaneus* (Nagamine et al, 1992). Historiquement, on sait que les souris asiatiques, qui contribuent aujourd'hui au génome des souris de laboratoire, ont été introduites en Europe à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. D'un point de vue évolutif, cet événement est récent malgré le grand nombre de générations de souris de laboratoire produites, et il est probable que très peu de variants alléliques soient présents sur le chr Y. Cependant, l'étude de l'évolution moléculaire de gènes qui étaient présents sur les chromosomes sexuels avant que ces derniers cessent de

recombiner (*Jarid1d* et *Zfy* sur le chr Y, *Jarid1c* et *Zfx* sur le chr X), a montré que les gènes du chr Y sont soumis à une accélération évolutive car ils accumulent des mutations à une fréquence plus élevée que le reste du génome (Sandstedt & Tucker, 2006). Aussi, des polymorphismes du chr Y ont récemment été associés à la susceptibilité d'une maladie autoimmune chez la souris (Teuscher et al, 2006). Il est donc vraisemblable que des variants alléliques sur le chr Y existent entre les souris C57BL/6J et A/J.

La partie non recombinante du chr Y de souris contient seulement 13 gènes identifiés à ce jour (Rohozinski et al, 2002; Toure et al, 2004a). Ce petit nombre de candidats à tester est une aubaine en génétique des caractères complexes. En effet, il est rare d'obtenir un intervalle de confiance ne contenant qu'une dizaine de gènes à la fin d'une cartographie sommaire de QTL. Cependant, les méthodes classiques de cartographie fine et de clonage positionnel ne sont pas applicables sur le chr Y. L'approche par gène candidat est difficile du fait que la fonction des gènes n'est que partiellement élucidée et limitée principalement au développement sexuel, et il n'y a donc aucun lien physiopathologique évident. Quant aux analyses moléculaires proprement dites, telles le séquençage ou l'analyse des profils d'expression, elles peuvent se révéler compliquées à cause du grand nombre de copies de certains gènes (Hargreave, 1999).

Malgré tout, il était tentant de disséquer les mécanismes moléculaires à la base de l'effet du chr Y sur la morphologie des cardiomycocytes révélé par l'étude des C57BL/6J et des A/J, ainsi que des lignées recombinantes et consomiques dérivées. La cartographie génétique a permis de mettre en évidence des candidats positionnels sur le chr Y, qui n'ont pas forcément une fonction avérée dans l'organe cible (le cœur). En fait, ces candidats pourraient jouer un rôle dans un système biologique extra-cardiaque et avoir un impact indirect sur la physiologie et/ou le développement cardiaque. Cependant, l'hypothèse la plus parcimonieuse était que l'expression différentielle d'un ou plusieurs gènes du chr Y au niveau du cœur aurait un impact direct sur la taille des cardiomycocytes, selon l'origine C57BL/6J ou A/J du chromosome. L'analyse de l'expression ontogénique de ces gènes dans le cœur a révélé de légères différences d'expression pour 2 candidats (*Eif2s3y* et

*Ddx3y*) à la naissance, mais leur séquençage n'a pas mené à l'identification d'un polymorphisme (voir chapitre 5). D'autre part, *Jarid1d* a une forte homologie avec *Jumonji*, un gène impliqué dans la prolifération des cardiomyocytes et qui a un rôle crucial dans le développement cardiaque. J'ai montré que *Jarid1d* est exprimé dans le cœur (voir chapitre 5). Bien qu'il n'y avait pas de différence d'expression ontogénique pour *Jarid1d*, j'ai séquencé ce gène car il constituait un candidat fonctionnel intéressant. Aucun polymorphisme n'a pu être mise en évidence (résultats non montrés).

Je me suis donc intéressé à des effets indirects des gènes du chr Y sur les cardiomyocytes, via les hormones sexuelles mâles. En effet, les cardiomyocytes contiennent des récepteurs aux androgènes fonctionnels qui médient l'hypertrophie cellulaire (Marsh et al, 1998). D'autre part, une récente étude a montré que la signalisation des androgènes est impliquée dans la croissance normale du cœur chez la souris, et module la réponse hypertrophique et la fibrose pendant le remodelage cardiaque (Ikeda et al, 2005). D'une manière générale, les propriétés anaboliques des androgènes favorisent une HVG chez la souris, le rat et l'humain (Hayward et al, 2001; Czubryt et al, 2006). Plusieurs évidences que des gènes du chr Y pourraient influencer les niveaux de testostérone plasmatique proviennent d'études sur les comportements agressifs chez la souris (Carlier et al, 1990; Sluyter et al, 1996). D'autre part, le chr Y a été impliqué dans le métabolisme des androgènes chez la souris (Jutley & Stewart, 1986), et a été directement lié aux niveaux de testostérone plasmatique chez des rats adultes, grâce à l'utilisation de lignées consomiques pour le chr Y (Toot et al, 2004). Enfin chez l'humain, le gène *Sry* interagit *in vitro* avec le récepteur aux androgènes (Yuan et al, 2001), mais ce résultat doit être modéré par le fait que *Sry* a des structures et des profils d'expression spatiale ou temporelle très différents chez l'humain et la souris (Clepet et al, 1993; Polanco & Koopman, 2006).

Les mâles C57BL/6J sont considérés comme ayant une déficience androgénique chronique, et ils sont caractérisés par des niveaux de testostérone plasmatique bas en comparaison d'autres souches (Bartke, 1974; Brouillette et al, 2005). Le dosage de la testostérone plasmatique à l'âge adulte a montré que les mâles C57BL/6J avaient moins

d'androgènes circulants que les A/J et les consomiques C57Bl6J-chrY A/J. Ce résultat suggère que le chr Y influe sur les niveaux de testostérone plasmatique (voir chapitre 5). Cependant, des niveaux de testostérone bas ne s'accordent pas avec une masse cardiaque élevée si l'on considère les propriétés anaboliques des androgènes.

Je me suis donc proposé d'investiguer la réponse des cardiomyocytes aux androgènes, en fonction de l'origine C57BL/6J ou A/J du chr Y. Des castrations prépubertères dans les souches parentales C57BL/6J et A/J, ainsi que dans les deux lignées consomiques, ont causé une atrophie des cardiomyocytes uniquement chez les souris possédant un chr Y d'origine C57BL/6J. Aucun effet n'a été noté chez les animaux possédant un chr Y de type A/J. Afin de valider ces observations, j'ai administré un traitement chronique de testostérone à des animaux castrés avant la puberté. L'expérience a révélé une réponse hypertrophique des cellules en fonction de la dose d'androgène, en présence du chr Y d'origine C57BL/6J, alors qu'aucun effet n'a été observé chez les souris possédant un chr Y d'origine A/J (voir chapitre 5). L'ensemble de ces résultats suggérait que l'origine C57BL/6J ou A/J du chr Y pouvait influencer la sensibilité des cardiomyocytes aux effets anaboliques de la testostérone, soit en augmentant la production du stéroïde, soit en agissant sur la réponse cellulaire.

Quant à l'expression du récepteur aux androgènes, l'origine du chr Y n'a pas montré d'effets sur les niveaux de messager ou de protéine (voir chapitre 5). En conséquence, si le chr Y contrôle la réponse hypertrophique des cardiomyocytes à la testostérone via la signalisation du récepteur aux androgènes, il est nécessaire que cela se fasse par l'intermédiaire d'un des nombreux cofacteurs (Chang & McDonnell, 2005; Toumazou et al, 2007). Il a d'ailleurs été proposé que l'action des androgènes en relation avec l'hypertrophie cardiaque soit influencée conjointement par les variations du récepteur spécifiques du tissu, l'activité des enzymes du métabolisme androgénique, et les corégulateurs du récepteur (Liu et al, 2003).

Par ailleurs, le rôle de l'environnement périnatal dans le développement de pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte a récemment été reconnu. Par exemple,

l'empreinte androgénique néonatale détermine le dimorphisme sexuel observé au niveau de la PA basale et de la susceptibilité à l'hypertension induite par un régime alimentaire chez le rat SHR adulte (Plut et al, 2002). Ceci apporte un argument intéressant pour expliquer que le déclenchement des maladies cardiovasculaires ait tendance à être prématuré chez les mâles, et que la progression pathologique soit souvent plus délétère. Un évènement clé dans la vie précoce des mâles est l'afflux périnatal d'androgènes testiculaires, au cours duquel les concentrations circulantes de testostérone atteignent des niveaux adultes. Cette période est critique pour l'empreinte hormonale du cerveau (Arnold & Gorski, 1984), de la prostate (Singh & Handelsman, 1999), et probablement d'autres tissus sensibles aux androgènes tels que le cœur. De façon intéressante, la castration de rats mâles à la naissance prolonge leur durée de vie, alors que la castration au moment de, ou après, la puberté n'a aucun effet (Talbert & Hamilton, 1965). Ce résultat est à rapprocher des observations faites sur une cohorte d'humains transsexuels de sexe génétique féminin, dans laquelle l'incidence des maladies cardiovasculaires n'était pas plus élevée que dans la population générale malgré une exposition à des doses massives de testostérone (van Kesteren et al, 1997). De la même façon, les femmes avec un syndrome polykistique ovarien sont exposées à des quantités assez importantes de testostérone, de façon chronique. Pourtant, on n'a pas observé d'incidence élevée de maladies cardiovasculaires (Wild et al, 2000), ni de mortalité précoce (Pierpoint et al, 1998), malgré une augmentation des facteurs de risque cardiovasculaires (Dahlgren et al, 1992; Elting et al, 2001). Le fait que ni les transsexuelles, ni les femmes avec un syndrome polykistique ovarien, ne soient exposées aux androgènes pendant la période périnatale pourrait expliquer leur relative résistance aux complications cardiovasculaires.

Chez la souris et le rat, il est possible d'évaluer l'ampleur du pic de testostérone prénatal en mesurant la distance ano-génitale 4 jours après la naissance (Vom Saal, 1979). J'ai donc effectué ces mesures chez des mâles et des femelles dans les souches parentales C57BL/6J et A/J, ainsi que dans les lignées consomiques (voir chapitre 5). Aucune différence n'a été observée chez les femelles. Les mâles C57BL/6J avaient la plus grande distance ano-génitale. La substitution du chr Y chez les consomiques C57BL/6J-chrY A/J a

induit une diminution prononcée de cette distance. Par contre, je n'ai pas remarqué d'effet significatif de la substitution du chr Y dans le fonds A/J. Dans toutes les expériences impliquant les lignées consomiques, j'ai remarqué que la substitution du chr Y dans le fonds génétique C57BL/6J était systématiquement associée à des effets prononcés sur les cardiomycocytes. Par contraste, la substitution du chr Y dans le fonds A/J a des effets plus modestes sur la taille des cardiomycocytes. De façon similaire, les résultats obtenus avec les distances ano-génitales suggèrent que la testostérone périnatale semble être l'objet d'une forte influence du chr Y uniquement dans le fonds C57BL/6J. D'autre part, les niveaux de testostérone plasmatiques bas et la MVG élevée chez les C57BL/6J adultes ne s'accordent pas avec les propriétés anaboliques de la testostérone. Je fais donc l'hypothèse que le chr Y contrôle la sensibilité des cardiomycocytes adultes à la testostérone, en influençant l'ampleur du pic prénatal d'androgènes. De plus, comme les effets semblent dépendre du fonds génétique et comme le suggèrent les résultats de la cartographie de QTL, le chr Y interagirait avec au moins un locus autosomal.

Cette hypothèse est étayée par les mécanismes mis en place lors du développement sexuel des mâles (Wilhelm & Koopman, 2006). La détermination et la différenciation des testicules sont des étapes charnières du développement sexuel, mais l'implication de nombreux régulateurs transcriptionnels, de réseaux de signalisation et de messagers endocriniens sous-tendent la masculinisation des organes tels que le cerveau, la prostate, et peut-être d'autres tissus comme le cœur. Or, les gènes du chr Y jouent un rôle dans la détermination du sexe mâle, dans la spermatogénèse et dans la fertilité (Affara & Mitchell, 2000; Charchar et al, 2003; Ditton et al, 2004; Toure et al, 2004b). En particulier, *Sry* est l'élément clé du développement des testicules et du tractus génital, et donc de la production de testostérone pré-natale.

Afin de valider l'hypothèse que le chr Y contrôle la sensibilité des cardiomycocytes adultes à la testostérone en influençant l'ampleur du pic prénatal d'androgènes, il sera nécessaire d'exposer, pendant la période périnatale, les mâles C57BL/6J (sensibles aux effets anaboliques de la testostérone) à un antagoniste des récepteurs aux androgènes, et les

mâles C57BL/6J-chrY A/J (résistants aux effets anaboliques de la testostérone) à une dose élevée de testostérone. Il faudra ensuite vérifier l'impact d'une castration prépubère et d'un traitement chronique à la testostérone sur la taille des cardiomycocytes. Si l'hypothèse est juste, je m'attends à ce que l'antagoniste prénatal abolisse les effets hypertrophiques chez les animaux qui ont un chr Y C57BL/6J, et que la testotérone prénatale induise une hypertrophie des cellules chez ceux qui ont un chr Y A/J. Dans le cas où l'hypothèse est vérifiée, il faudra alors contrôler l'existence d'un polymorphisme allélique sur le chr Y. Priorité sera donnée au gène *Sry*, qui est le candidat le plus évident pour affecter la production de testostérone testiculaire chez l'embryon.

## Conclusion

Grâce à l'étude de plusieurs populations ségrégeantes de rat ou de souris, j'ai pu disséquer conjointement, ou séparément, les bases génétiques de la régulation de la masse cardiaque, de la morphologie des cardiomycocytes, et de la pression artérielle.

Mon travail a abouti à la cartographie de plusieurs QTL originaux liés à la masse du ventricule cardiaque gauche, à la longueur, la largeur et la surface des cardiomycocytes, à la pression systolique et à la pression pulsatile. J'ai aussi confirmé la position de deux QTL liés à la masse cardiaque chez le rat, identifiés préalablement dans des croisements indépendants utilisant au moins une souche parentale différente. De plus, j'ai mis en évidence un QTL lié à la pression pulsatile, indépendant de la pression artérielle. Ce QTL est le premier du genre dans un modèle animal, et il pourrait être également lié au développement d'une hypertrophie cardiaque. Enfin, l'étude chez la souris a révélé qu'une augmentation de la taille des cellules ne conduit pas nécessairement à une augmentation de la MVG, et que des loci différents peuvent influencer les deux phénotypes de façon indépendante.

Les résultats, dans leur ensemble, ont dévoilé une complexité insoupçonnée du déterminisme génétique en fonction du sexe, indépendamment de la pression artérielle. Chez le rat, les loci autosomaux liés à la MVG se sont tous révélés spécifiques d'un sexe. Chez la souris, le chr Y a été lié pour la première fois à un caractère complexe (en l'occurrence, les différentes composantes de la morphologie des cardiomyocytes) au cours d'un criblage génomique. De manière intéressante, le chr Y interagirait avec des loci autosomaux.

J'ai montré que certains gènes du chr Y sont exprimés dans le cœur, mais aucun polymorphisme pouvant influencer la morphologie des cardiomyocytes n'a été détecté après séquençage. Par ailleurs, j'ai montré que le chr Y pouvait contrôler la réponse hypertrophique des cardiomyocytes aux effets anabolisants de la testostérone. Éventuellement, le chr Y pourrait interférer avec une possible empreinte androgénique périnatale des tissus cardiaques.

Finalement, le développement de lignées congéniques, ainsi que l'analyse physiologique et moléculaire des effets du chr Y, devraient permettre d'identifier de nouveaux gènes candidats impliqués dans l'étiologie de l'hypertrophie cardiaque, indépendamment de la pression artérielle.

## **Bibliographie**

- Heart and Stroke Foundation of Canada (2003) The Growing Burden of Heart Disease and Stroke in Canada 2003.
- Affara NA & Mitchell MJ (2000) The role of human and mouse Y chromosome genes in male infertility. *J Endocrinol Invest*;23:630-645.
- Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE (2005) The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet*;6:185-216.
- Aiello EA, Villa-Abrille MC, Escudero EM, Portiansky EL, Perez NG, Camilion De Hurtado MC, Cingolani HE (2004) Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;286:H1229-H1235.
- Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998) Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*;280:574-577.
- Alfakih K, Maqbool A, Sivananthan M, Walters K, Bainbridge G, Ridgway J, Balmforth AJ, Hall AS (2004) Left ventricle mass index and the common, functional, X-linked angiotensin II type-2 receptor gene polymorphism (-1332 G/A) in patients with systemic hypertension. *Hypertension*;43:1189-1194.
- Altmuller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M (2001) Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet*;69:936-950.
- Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, Richardson JA, Hill JA, Olson EN (2002) Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*;99:907-912.
- Aoki H, Sadoshima J, Izumo S (2000) Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat Med*;6:183-188.
- Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna NJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG, Seidman CE (2002) Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*;109:357-362.
- Arad M, Maron BJ, Gorham JM, Johnson WH, Jr., Saul JP, Perez-Atayde AR, Spirito P, Wright GB, Kanter RJ, Seidman CE et al (2005) Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*;352:362-372.
- Arnold AP (2004) Sex chromosomes and brain gender. *Nat Rev Neurosci*;5:701-708.
- Arnold AP & Gorski RA (1984) Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*;7:413-442.

- Asmar R, Rudnichi A, Blacher J, London GM, Safar ME (2001) Pulse pressure and aortic pulse wave are markers of cardiovascular risk in hypertensive populations. *Am J Hypertens;14*:91-97.
- Aurigemma GP & Gaasch WH (1995) Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology;86*:310-317.
- Avelar E, Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Strong M, Pendleton RC, Segerson N, Adams TD, Gress RE, Hunt SC et al (2007) Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension;49*:34-39.
- Babiker FA, De Windt LJ, Van Eickels M, Thijssen V, Bronsaer RJ, Grohe C, Van Bilsen M, Doevedans PA (2004) 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation;109*:269-276.
- Baessler A, Kwitek AE, Fischer M, Koehler M, Reinhard W, Erdmann J, Riegger G, Doering A, Schunkert H, Hengstenberg C (2006) Association of the Ghrelin receptor gene region with left ventricular hypertrophy in the general population: results of the MONICA/KORA Augsburg Echocardiographic Substudy. *Hypertension;47*:920-927.
- Bai SL, Campbell SE, Moore JA, Morales MC, Gerdes AM (1990) Influence of age, growth, and sex on cardiac myocyte size and number in rats. *Anat Rec;226*:207-212.
- Bailey DW (1971) Recombinant-inbred strains. An aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes. *Transplantation;11*:325-327.
- Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF (1990) Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol;259*:H324-H332.
- Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoni R, Vitali A, Felisari G, Salandi A, Daniel S, Cornelio F, Morandi L et al (2000) Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet;37*:102-107.
- Berrick C, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth S, Threadgill DW (2006) Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal and background dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol;[Epub ahead of print]*.

- Bartke A (1974) Increased sensitivity of seminal vesicles to testosterone in a mouse strain with low plasma testosterone levels. *J Endocrinol*;60:145-148.
- Bashyam MD, Savithri GR, Kumar MS, Narasimhan C, Nallari P (2003) Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC). *J Hum Genet*;48:55-64.
- Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, Fisher EM (2000) Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet*;24:23-25.
- Bier E & Bodmer R (2004) Drosophila, an emerging model for cardiac disease. *Gene*;342:1-11.
- Bilusic M, Bataillard A, Tschannen MR, Gao L, Barreto NE, Vincent M, Wang T, Jacob HJ, Sassard J, Kwitek AE (2004) Mapping the genetic determinants of hypertension, metabolic diseases, and related phenotypes in the Lyon hypertensive rat. *Hypertension*;44:695-701.
- Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW (2002) Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev*;7:71-88.
- Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, Salmon A, Ostman-Smith I, Watkins H (2001) Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet*;10:1215-1220.
- Bolognese L, Dellavesa P, Rossi L, Sarasso G, Bongo AS, Scianaro MC (1994) Prognostic value of left ventricular mass in uncomplicated acute myocardial infarction and one-vessel coronary artery disease. *Am J Cardiol*;73:1-5.
- Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K (1998) Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res*;83:580-593.
- Boutin-Ganache I, Picard S, Deschepper CF (2002) Distinct gene-sex interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently. *Physiol Genomics*;12:61-67.
- Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S, De Acetis M, Vecchione C, Marino G, Altruda F et al (2003) Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med*;9:68-75.
- Brandenburger Y, Jenkins A, Autelitano DJ, Hannan RD (2001) Increased expression of UBF is a critical determinant for rRNA synthesis and hypertrophic growth of cardiac myocytes. *FASEB J*;15:2051-2053.

- Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF et al (2003) Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest*;111:1475-1486.
- Broman KW (2001) Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab Anim (NY)*;30:44-52.
- Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C (2005) Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res*;65:148-157.
- Brugada R, Kelsey W, Lechin M, Zhao G, Yu QT, Zoghbi W, Quinones M, Elstein E, Omran A, Rakowski H et al (1997) Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig Med*;45:542-551.
- Brull D, Dhamrait S, Myerson S, Erdmann J, Woods D, World M, Pennell D, Humphries S, Regitz-Zagrosek V, Montgomery H (2001) Bradykinin B2BKR receptor polymorphism and left-ventricular growth response. *Lancet*;358:1155-1156.
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF et al (2000) The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*;19:6341-6350.
- Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, Colucci WS (1995) Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation*;92:2385-2390.
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*;296:1655-1657.
- Canzian F (1997) Phylogenetics of the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Genome Res*;7:262-267.
- Carabello BA (2002) Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail*;8:S258-S263.
- Cardon LR & Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*;2:91-99.
- Carlier M, Roubertoux PL, Kottler ML, Degrelle H (1990) Y chromosome and aggression in strains of laboratory mice. *Behav Genet*;20:137-156.
- Chang CY & McDonnell DP (2005) Androgen receptor-cofactor interactions as targets for new drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*;26:225-228.

- Charchar FJ, Tomaszewski M, Lacka B, Zakrzewski J, Zukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W, Dominiczak AF (2004) Association of the human Y chromosome with cholesterol levels in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;24:308-312.
- Charchar FJ, Tomaszewski M, Padmanabhan S, Lacka B, Upton MN, Inglis GC, Anderson NH, McConnachie A, Zukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W et al (2002) The Y chromosome effect on blood pressure in two European populations. *Hypertension*;39:353-356.
- Charchar FJ, Tomaszewski M, Strahorn P, Champagne B, Dominiczak AF (2003) Y is there a risk to being male? *Trends Endocrinol Metab*;14:163-168.
- Chaturvedi N, Athanassopoulos G, McKeigue PM, Marmot MG, Nihoyannopoulos P (1994) Echocardiographic measures of left ventricular structure and their relation with rest and ambulatory blood pressure in blacks and whites in the United Kingdom. *J Am Coll Cardiol*;24:1499-1505.
- Chaves AA, Weinstein DM, Bauer JA (2001) Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. *Life Sci*;69:213-222.
- Chia R, Achilli F, Festing MF, Fisher EM (2005) The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet*;37:1181-1186.
- Chu G, Haghghi K, Kranias EG (2002) From mouse to man: understanding heart failure through genetically altered mouse models. *J Card Fail*;8:S432-S449.
- Churchill GA (2007) Recombinant inbred strain panels: a tool for systems genetics. *Physiol Genomics*;In press-
- Churchill GA & Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*;138:963-971.
- Chusho H, Ogawa Y, Tamura N, Suda M, Yasoda A, Miyazawa T, Kishimoto I, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K et al (2000) Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology*;141:3807-3813.
- Cicila GT, Choi C, Dene H, Lee SJ, Rapp JP (1999) Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on chromosome 3 in Dahl rats. *Mamm Genome*;10:112-116.
- Cicila GT, Dukhanina OI, Kurtz TW, Walder R, Garrett MR, Dene H, Rapp JP (1997) Blood pressure and survival of a chromosome 7 congenic strain bred from Dahl rats. *Mamm Genome*;8:896-902.

- Clark JS, Jeffs B, Davidson AO, Lee WK, Anderson NH, Bihoreau MT, Brosnan MJ, Devlin AM, Kelman AW, Lindpaintner K et al (1996) Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension*;28:898-906.
- Clepet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1993) The human SRY transcript. *Hum Mol Genet*;2:2007-2012.
- Coca A & De La Sierra A (1997) Salt sensitivity and left ventricular hypertrophy. *Adv Exp Med Biol*;432:91-101.
- Collins KA, Korcarz CE, Lang RM (2003) Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics*;13:227-239.
- Colucci WS (1998) The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. *Clin Cardiol*;21:I20-I24.
- Complex Trait Consortium (2003) The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet*;4:911-916.
- Complex Trait Consortium, Churchill GA, Airey DC, Allayee H, Angel JM, Attie AD, Beatty J, Beavis WD, Belknap JK, Bennett B et al (2004) The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet*;36:1133-1137.
- Cooper RS, Simmons BE, Castaner A, Santhanam V, Ghali J, Mar M (1990) Left ventricular hypertrophy is associated with worse survival independent of ventricular function and number of coronary arteries severely narrowed. *Am J Cardiol*;65:441-445.
- Courvoisier H, Bihoreau MT, Gauguier D, Plomion C, Mormede P, Moisan MP (1997) Integrated genetic mapping of 64 rat microsatellite markers from different sources. *Mamm Genome*;8:282-283.
- Crow JF (1990) Mapping functions. *Genetics*;125:669-671.
- Cuppen E (2005) Haplotype-based genetics in mice and rats. *Trends Genet*;21:318-322.
- Cutilletta AF, Dowell RT, Rudnik M, Arcilla RA, Zak R (1975) Regression of myocardial hypertrophy. I. Experimental model, changes in heart weight, nucleic acids and collagen. *J Mol Cell Cardiol*;7:761-780.
- Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B (2006) The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol*;84:93-109.

- D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW (1997) Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*;94:8121-8126.
- Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, Knutsson F, Oden A, Janson PO, Mattson LA, Crona N, Lundberg PA (1992) Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. *Fertil Steril*;57:505-513.
- Daniels SR, Kimball TR, Morrison JA, Khoury P, Witt S, Meyer RA (1995) Effect of lean body mass, fat mass, blood pressure, and sexual maturation on left ventricular mass in children and adolescents. Statistical, biological, and clinical significance. *Circulation*;92:3249-3254.
- Darvasi A & Soller M (1995) Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics*;141:1199-1207.
- Darvasi A & Soller M (1997) A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet*;27:125-132.
- Darvasi A & Soller M (1992) Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *TAG Theor Appl Genet*;85:353-359.
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, Soller M (1993) Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics*;134:943-951.
- Dash R, Schmidt AG, Pathak A, Gerst MJ, Biniakiewicz D, Kadambi VJ, Hoit BD, Abraham WT, Kranias EG (2003) Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc Res*;57:704-714.
- Davis RC, Schadt EE, Smith DJ, Hsieh EW, Cervino AC, van NA, Rosales M, Doss S, Meng H, Allayee H et al (2005) A genome-wide set of congenic mouse strains derived from DBA/2J on a C57BL/6J background. *Genomics*;86:259-270.
- Dawber TR, Meadors GF, Moore FE, Jr. (1951) Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health*;41:279-281.
- De Simone G, Verdecchia P, Pede S, Gorini M, Maggioni AP (2002) Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension: the MAVI Study. *Hypertension*;40:470-476.

- Del Monte F, Butler K, Boecker W, Gwathmey JK, Hajjar RJ (2002) Novel technique of aortic banding followed by gene transfer during hypertrophy and heart failure. *Physiol Genomics*;9:49-56.
- Delles C, Erdmann J, Jacobi J, Hilgers KF, Fleck E, Regitz-Zagrosek V, Schmieder RE (2001) Aldosterone synthase (CYP11B2) -344 C/T polymorphism is associated with left ventricular structure in human arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*;37:878-884.
- Demant P (2003) Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nat Rev Genet*;4:721-734.
- Demant P & Hart AA (1986) Recombinant congenic strains--a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene. *Immunogenetics*;24:416-422.
- Deng AY (2007) Positional cloning of quantitative trait Loci for blood pressure: how close are we?: a critical perspective. *Hypertension*;49:740-747.
- Deschepper CF, Boutin-Ganache I, Zahabi A, Jiang Z (2002a) In search of cardiovascular candidate genes: interactions between phenotypes and genotypes. *Hypertension*;39:332-336.
- Deschepper CF & Llamas B (2007) Hypertensive cardiac remodeling in males and females: from the bench to the bedside. *Hypertension*;49:401-407.
- Deschepper CF, Masciotra S, Zahabi A, Boutin-Ganache I, Picard S, Reudelhuber TL (2001) Functional alterations of the Nppa promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ Res*;88:223-228.
- Deschepper CF, Olson JL, Otis M, Gallo-Payet N (2004) Characterization of blood pressure and morphologic traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains. *J Appl Physiol*;97:369-376.
- Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, Rouleau JL (2002b) Characterization of myocardium, isolated cardiomyocytes, and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;282:H149-H155.
- DeStefano AL, Larson MG, Mitchell GF, Benjamin EJ, Vasan RS, Li J, Corey D, Levy D (2004) Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Hypertension*;44:152-155.
- Di Nicolantonio R, Kostka V, Kwitek A, Jacob H, Thomas WG, Harrap SB (2006) Fine mapping of Lvm1: a quantitative trait locus controlling heart size independently of blood pressure. *Pulm Pharmacol Ther*;19:70-73.

- DiPetrillo K, Tsaih SW, Sheehan S, Johns C, Kelmenson P, Gavras H, Churchill GA, Paigen B (2004) Genetic analysis of blood pressure in C3H/HeJ and SWR/J mice. *Physiol Genomics*;17:215-220.
- DiPetrillo K, Wang X, Stylianou IM, Paigen B (2005) Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends Genet*;21:683-692.
- Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH (2004) The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Hum Mol Genet*;13:2333-2341.
- Doerge RW & Churchill GA (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics*;142:285-294.
- Dorn GW & Hahn HS (2004) Genetic factors in cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci*;1015:225-237.
- Dorn GW, Robbins J, Sugden PH (2003) Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*;92:1171-1175.
- Dostal DE & Baker KM (1992) Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens*;5:276-280.
- Du XJ (2004) Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res*;63:510-519.
- Du XJ, Fang L, Kiriazis H (2006) Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther*;111:434-475.
- Dubay C, Vincent M, Samani NJ, Hilbert P, Kaiser MA, Beressi JP, Kotelevtsev Y, Beckmann JS, Soubrier F, Sassard J (1993) Genetic determinants of diastolic and pulse pressure map to different loci in Lyon hypertensive rats. *Nat Genet*;3:354-357.
- Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB (2000) Association of the human Y chromosome with high blood pressure in the general population. *Hypertension*;36:731-733.
- Elting MW, Korsen TJ, Bezemer PD, Schoemaker J (2001) Prevalence of diabetes mellitus, hypertension and cardiac complaints in a follow-up study of a Dutch PCOS population. *Hum Reprod*;16:556-560.
- Ely D, Caplea A, Dunphy G, Daneshvar H, Turner M, Milsted A, Takiyyudin M (1997) Spontaneously hypertensive rat Y chromosome increases indexes of sympathetic nervous system activity. *Hypertension*;29:613-618.

- Ely D, Turner M, Milsted A (2000) Review of the Y chromosome and hypertension. *Braz J Med Biol Res*;33:679-691.
- Epstein FH (2007) MR in mouse models of cardiac disease. *NMR Biomed*;20:238-255.
- Ezzati M (2004) How can cross-country research on health risks strengthen interventions? Lessons from INTERHEART. *Lancet*;364:912-914.
- Fatkın D & Graham RM (2002) Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev*;82:945-980.
- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK (2005) Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol*;14:1-11.
- Federman DD (2006) The biology of human sex differences. *N Engl J Med*;354:1507-1514.
- Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC (2002) Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*;99:11363-11368.
- Flaim SF, Minteer WJ, Nellis SH, Clark DP (1979) Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat. *Am J Physiol*;236:H698-H704.
- Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R (2005) Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet*;6:271-286.
- Ford LE (1976) Heart size. *Circ Res*;39:297-303.
- Fortin A, Diez E, Rochefort D, Laroche L, Malo D, Rouleau GA, Gros P, Skamene E (2001) Recombinant congenic strains derived from A/J and C57BL/6J: a tool for genetic dissection of complex traits. *Genomics*;74:21-35.
- Franklin SS, Larson MG, Khan SA, Wong ND, Leip EP, Kannel WB, Levy D (2001) Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation*;103:1245-1249.
- Frazer KA, Wade CM, Hinds DA, Patil N, Cox DR, Daly MJ (2004) Segmental phylogenetic relationships of inbred mouse strains revealed by fine-scale analysis of sequence variation across 4.6 mb of mouse genome. *Genome Res*;14:1493-1500.
- Frey N & Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*;65:45-79.

- Funakoshi H, Kubota T, Kawamura N, Machida Y, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A (2002) Disruption of inducible nitric oxide synthase improves beta-adrenergic inotropic responsiveness but not the survival of mice with cytokine-induced cardiomyopathy. *Circ Res*;90:959-965.
- Galderisi M, Anderson KM, Wilson PW, Levy D (1991) Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol*;68:85-89.
- Gao XM, Agrotis A, Autelitano DJ, Percy E, Woodcock EA, Jennings GL, Dart AM, Du XJ (2003) Sex hormones and cardiomyopathic phenotype induced by cardiac beta 2-adrenergic receptor overexpression. *Endocrinology*;144:4097-4105.
- Garcia R & Diebold S (1990) Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res*;24:430-432.
- Gardin JM, Siscovick D, Anton-Culver H, Lynch JC, Smith VE, Klopfenstein HS, Bommer WJ, Fried L, O'Leary D, Manolio TA (1995a) Sex, age, and disease affect echocardiographic left ventricular mass and systolic function in the free-living elderly. The Cardiovascular Health Study. *Circulation*;91:1739-1748.
- Gardin JM, Wagenknecht LE, Anton-Culver H, Flack J, Gidding S, Kurosaki T, Wong ND, Manolio TA (1995b) Relationship of cardiovascular risk factors to echocardiographic left ventricular mass in healthy young black and white adult men and women. The CARDIA study. Coronary Artery Risk Development in Young Adults. *Circulation*;92:380-387.
- Garner C, Lecomte E, Visvikis S, Abergel E, Lathrop M, Soubrier F (2000) Genetic and environmental influences on left ventricular mass. A family study. *Hypertension*;36:740-746.
- Garrett MR, Dene H, Rapp JP (2003) Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *J Am Soc Nephrol*;14:1175-1187.
- Garrett MR, Joe B, Yerga-Woolwine S (2006) Genetic linkage of urinary albumin excretion in Dahl salt-sensitive rats: influence of dietary salt and confirmation using congenic strains. *Physiol Genomics*;25:39-49.
- Garrett MR, Saad Y, Dene H, Rapp JP (2000) Blood pressure QTL that differentiate Dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics*;3:33-38.
- Garrington TP & Johnson GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*;11:211-218.

- Gauguier D, Behmoaras J, Argoud K, Wilder SP, Pradines C, Bihoreau MT, Osborne-Pellegrin M, Jacob MP (2005) Chromosomal mapping of quantitative trait loci controlling elastin content in rat aorta. *Hypertension*;45:460-466.
- Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, Seidman JG (1996) A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science*;272:731-734.
- Gerdes AM (2002) Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail*;8:S264-S268.
- Gerdes AM & Capasso JM (1995) Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*;27:849-856.
- Gerdes AM, Kellerman SE, Malec KB, Schocken DD (1994) Transverse shape characteristics of cardiac myocytes from rats and humans. *Cardioscience*;5:31-36.
- Gerdes AM, Kellerman SE, Moore JA, Muffly KE, Clark LC, Reaves PY, Malec KB, McKeown PP, Schocken DD (1992) Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation*;86:426-430.
- Ghali JK, Liao Y, Simmons B, Castaner A, Cao G, Cooper RS (1992) The prognostic role of left ventricular hypertrophy in patients with or without coronary artery disease. *Ann Intern Med*;117:831-836.
- Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ (2002) Finding genes that underlie complex traits. *Science*;298:2345-2349.
- Graves JA (2006) Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell*;124:901-914.
- Graves JA, Koina E, Sankovic N (2006) How the gene content of human sex chromosomes evolved. *Curr Opin Genet Dev*;16:219-224.
- Greaves SC, Roche AH, Neutze JM, Whitlock RM, Veale AM (1987) Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy: a cross sectional and M mode echocardiographic study of 50 families. *Br Heart J*;58:259-266.
- Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L (1997) Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*;416:107-112.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*;56:56-64.

- Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM (2006) Cardiovascular disease in the dialysis population: prognostic significance of arterial disorders. *Curr Opin Nephrol Hypertens*;15:105-110.
- Haghghi K, Schmidt AG, Hoit BD, Brittsan AG, Yatani A, Lester JW, Zhai J, Kimura Y, Dorn GW, MacLennan DH et al (2001) Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem*;276:24145-24152.
- Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D (1998) Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol*;32:1454-1459.
- Haley CS & Knott SA (1992) A Simple Regression Method for Mapping Quantitative Trait Loci in Line Crosses Using Flanking Markers. *Heredity*;69:315-324.
- Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Tremblay J (1998) Hypertension: genes and environment. *J Hypertens*;16:397-418.
- Hannan RD, Jenkins A, Jenkins AK, Brandenburger Y (2003) Cardiac hypertrophy: a matter of translation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*;30:517-527.
- Hargreave TB (1999) Understanding the Y chromosome. *Lancet*;354:1746-1747.
- Harrap SB, Danes VR, Ellis JA, Griffiths CD, Jones EF, Delbridge LM (2002a) The hypertrophic heart rat: a new normotensive model of genetic cardiac and cardiomyocyte hypertrophy. *Physiol Genomics*;9:43-48.
- Harrap SB, Wong ZY, Stebbing M, Lamantia A, Bahlo M (2002b) Blood pressure QTLs identified by genome-wide linkage analysis and dependence on associated phenotypes. *Physiol Genomics*;8:99-105.
- Hasenfuss G (1998) Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res*;39:60-76.
- Hatt PY, Rakusan K, Gastineau P, Laplace M (1979) Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto-caval fistula in the rat). *J Mol Cell Cardiol*;11:989-998.
- Hayward CS, Webb CM, Collins P (2001) Effect of sex hormones on cardiac mass. *Lancet*;357:1354-1356.
- Heineke J & Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*;7:589-600.

- Hendley ED & Ohlsson WG (1991) Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *Am J Physiol*;261:H583-H589.
- Herrera VL, Tsikoudakis A, Ponce LR, Matsubara Y, Ruiz-Opazo N (2006) Sex-specific QTLs and interacting loci underlie salt-sensitive hypertension and target organ complications in Dahl S/jrHS hypertensive rats. *Physiol Genomics*;26:172-179.
- Herrington DM, Kesler K, Reiber JC, Davis W, Brown WV, Helms R, Mallon SM, Raines J (2003) Arterial compliance adds to conventional risk factors for prediction of angiographic coronary artery disease. *Am Heart J*;146:662-667.
- Heydemann A, Doherty KR, McNally EM (2007) Genetic modifiers of muscular dystrophy: implications for therapy. *Biochim Biophys Acta*;1772:216-228.
- Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahasi S (1991) Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature*;353:521-529.
- Ho CY & Seidman CE (2006) A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*;113:e858-e862.
- Hoit BD, Kiatchoosakun S, Restivo J, Kirkpatrick D, Olszens K, Shao H, Pao YH, Nadeau JH (2002) Naturally occurring variation in cardiovascular traits among inbred mouse strains. *Genomics*;79:679-685.
- Hoit BD & Nadeau JH (2001) Phenotype-driven genetic approaches in mice: high-throughput phenotyping for discovering new models of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*;11:82-89.
- Holtwick R, Van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M (2003) Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest*;111:1399-1407.
- Hultqvist M, Olofsson P, Gelderman KA, Holmberg J, Holmdahl R (2006) A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Med*;3:e348.
- Hunter KW & Williams RW (2002) Complexities of cancer research: mouse genetic models. *ILAR J*;43:80-88.
- Ikeda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzuki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M et al (2005) Androgen receptor gene knockout male mice

- exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J Biol Chem*;280:29661-29666.
- Innes BA, McLaughlin MG, Kapuscinski MK, Jacob HJ, Harrap SB (1998) Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension*;31:741-746.
- Inomata H, Watanabe T, Iizuka Y, Liang YQ, Mashimo T, Nabika T, Ikeda K, Yanai K, Gotoda T, Yamori Y et al (2005) Identification of quantitative trait loci for cardiac hypertrophy in two different strains of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertens Res*;28:273-281.
- Ishimori N, Li R, Walsh KA, Korstanje R, Rollins JA, Petkov P, Pletcher MT, Wiltshire T, Donahue LR, Rosen CJ et al (2006) Quantitative trait loci that determine BMD in C57BL/6J and 129S1/SvImJ inbred mice. *J Bone Miner Res*;21:105-112.
- Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita M (1994) DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation*;90:2622-2628.
- Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1987) Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest*;79:970-977.
- Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1988) Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*;85:339-343.
- Jacob HJ & Kwitek AE (2002) Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet*;3:33-42.
- James MA, Saadeh AM, Jones JV (2000) Wall stress and hypertension. *J Cardiovasc Risk*;7:187-190.
- Jansen RC (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*;135:205-211.
- Jesmin S, Hattori Y, Togashi H, Ueno K, Yoshioka M, Sakuma I (2005) Age-related changes in cardiac expression of VEGF and its angiogenic receptor KDR in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*;272:63-73.
- Jobling MA & Tyler-Smith C (2003) The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet*;4:598-612.

- Johan WO (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *TAG Theor Appl Genet*;84:803-811.
- John SW, Krege JH, Oliver PM, Hagaman JR, Hodgin JB, Pang SC, Flynn TG, Smithies O (1995) Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science*;267:679-681.
- Johnston CM, Shimeld SM, Sharpe PT (1998) Molecular evolution of the ZFY and ZNF6 gene families. *Mol Biol Evol*;15:129-137.
- Jouannot P & Hatt PY (1975) Rat myocardial mechanics during pressure-induced hypertrophy development and reversal. *Am J Physiol*;229:355-364.
- Jutley JK & Stewart AD (1986) Genetic analysis of the Y-chromosome of the mouse: evidence for two loci affecting androgen metabolism. *Genet Res*;47:29-34.
- Kadokami T, McTiernan CF, Kubota T, Frye CS, Feldman AM (2000) Sex-related survival differences in murine cardiomyopathy are associated with differences in TNF-receptor expression. *J Clin Invest*;106:589-597.
- Kao CH, Zeng ZB, Teasdale RD (1999) Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics*;152:1203-1216.
- Kato N, Hyne G, Bihoreau MT, Gauguier D, Lathrop GM, Rapp JP (1999) Complete genome searches for quantitative trait loci controlling blood pressure and related traits in four segregating populations derived from Dahl hypertensive rats. *Mamm Genome*;10:259-265.
- Katz AM (2002) Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc Drugs Ther*;16:245-249.
- Khattar RS, Swales JD, Dore C, Senior R, Lahiri A (2001) Effect of aging on the prognostic significance of ambulatory systolic, diastolic, and pulse pressure in essential hypertension. *Circulation*;104:783-789.
- Kiatchoosakun S, Restivo J, Kirkpatrick D, Hoit BD (2002) Assessment of left ventricular mass in mice: comparison between two-dimensional and m-mode echocardiography. *Echocardiography*;19:199-205.
- Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H (1995) Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension*;25:1252-1259.

- Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL (2001) A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*;98:2703-2706.
- Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O, Rockman HA, Maeda N (2001) Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest*;107:975-984.
- Komuro I, Kurabayashi M, Takaku F, Yazaki Y (1988) Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. *Circ Res*;62:1075-1079.
- Korstanje R & Paigen B (2002) From QTL to gene: the harvest begins. *Nat Genet*;31:235-236.
- Korytkowski MT, Krug EI, Daly MA, Deriso L, Wilson JW, Winters SJ (2005) Does androgen excess contribute to the cardiovascular risk profile in postmenopausal women with type 2 diabetes? *Metabolism*;54:1626-1631.
- Kren V, Qi N, Krenova D, Zidek V, Sladka M, Jachymova M, Mikova B, Horky K, Bonne A, Van Lith HA et al (2001) Y-chromosome transfer induces changes in blood pressure and blood lipids in SHR. *Hypertension*;37:1147-1152.
- Krumholz HM, Larson M, Levy D (1993) Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol*;72:310-313.
- Kuhn M, Holtwick R, Baba HA, Perriard JC, Schmitz W, Ehler E (2002) Progressive cardiac hypertrophy and dysfunction in atrial natriuretic peptide receptor (GC-A) deficient mice. *Heart*;87:368-374.
- Kuribayashi T (1987) Spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy in the rat. I. Pathologic features. *Jpn Circ J*;51:573-588.
- Kuribayashi T, Mizuta T, Shimoo K, Kubota Y, Katsume H, Nakagawa M, Ibata Y (1988) Spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy in the rat. II. Distribution of, and correlations between, various cardiac abnormalities in the WKY/NCrj and its related strains. *Jpn Circ J*;52:1156-1170.
- Kwitek AE, Tonellato PJ, Chen D, Gullings-Handle J, Cheng YS, Twigger S, Scheetz TE, Casavant TL, Stoll M, Nobrega MA et al (2001) Automated construction of high-density comparative maps between rat, human, and mouse. *Genome Res*;11:1935-1943.
- Lako-Futo Z, Szokodi I, Sarman B, Foldes G, Tokola H, Ilves M, Leskinen H, Vuolteenaho O, Skoumal R, DeChatel R et al (2003) Evidence for a functional role of

- angiotensin II type 2 receptor in the cardiac hypertrophic process in vivo in the rat heart. *Circulation*;108:2414-2422.
- Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S (2007) Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. *Circulation*;115:1067-1074.
- Lander ES & Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*;121:185-199.
- Lander ES & Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*;11:241-247.
- Lander ES & Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science*;265:2037-2048.
- Lantelme P, Lo M, Luttenauer L, Sassard J (1997) Pivotal role of the renin-angiotensin system in Lyon hypertensive rats. *Am J Physiol*;273:R1793-R1799.
- Lapu-Bula R, Quarshie A, Lyn D, Oduwole A, Pack C, Morgan J, Nkemdiche S, Igbo-Pemu P, Onwuanyi A, Li R et al (2005) The 894T allele of endothelial nitric oxide synthase gene is related to left ventricular mass in African Americans with high-normal blood pressure. *J Natl Med Assoc*;97:197-205.
- Lattion AL, Michel JB, Arnauld E, Corvol P, Soubrier F (1986) Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am J Physiol*;251:H890-H896.
- Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D (1991) The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA*;266:231-236.
- Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P (2005) Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension*;45:1050-1055.
- Leamy LJ, Pomp D, Eisen EJ, Cheverud JM (2002) Pleiotropy of quantitative trait loci for organ weights and limb bone lengths in mice. *Physiol Genomics*;10:21-29.
- Leinwand LA (2003) Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest*;112:302-307.
- Lekakis JP, Ikonomidis I, Protoplerou AD, Papaioannou TG, Stamatelopoulos K, Papamichael CM, Mavrikakis ME (2006) Arterial wave reflection is associated with severity of extracoronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*;13:236-242.

- Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP (1988) Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*;108:7-13.
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*;322:1561-1566.
- Li P, Li J, Feng X, Li Z, Hou R, Han C, Zhang Y (2003) Gene expression profile of cardiomyocytes in hypertrophic heart induced by continuous norepinephrine infusion in the rats. *Cell Mol Life Sci*;60:2200-2209.
- Li R, Lyons MA, Wittenburg H, Paigen B, Churchill GA (2005) Combining data from multiple inbred line crosses improves the power and resolution of quantitative trait loci mapping. *Genetics*;169:1699-1709.
- Li W, Mital S, Ojaimi C, Csiszar A, Kaley G, Hintze TH (2004a) Premature death and age-related cardiac dysfunction in male eNOS-knockout mice. *J Mol Cell Cardiol*;37:671-680.
- Li Y, Kishimoto I, Saito Y, Harada M, Kuwahara K, Izumi T, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Tanimoto K et al (2004b) Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology*;145:951-958.
- Liang Q, Bueno OF, Wilkins BJ, Kuan CY, Xia Y, Molkentin JD (2003) c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J*;22:5079-5089.
- Lieb W, Graf J, Gotz A, Konig IR, Mayer B, Fischer M, Stritzke J, Hengstenberg C, Holmer SR, Doring A et al (2006) Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *J Mol Med*;84:88-96.
- Lim WK, Wren B, Jepson N, Roy S, Caplan G (1999) Effect of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol*;83:1132-4, A9.
- Lind L, Andersson PE, Andren B, Hanni A, Lithell HO (1995) Left ventricular hypertrophy in hypertension is associated with the insulin resistance metabolic syndrome. *J Hypertens*;13:433-438.
- Linhart A, Jindra A, Golan L, Jachymova M, Sedlacek K, Peleska J, Umnerova V, Bultas J, Horky K, Aschermann M (2002) Association between tyrosine hydroxylase

- polymorphisms and left ventricular structure in young normotensive men. *Br J Biomed Sci*;59:90-94.
- Linzbach AJ (1960) Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol*;5:370-382.
- Lips DJ, DeWindt LJ, Van Kraaij DJ, Doevedans PA (2003) Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J*;24:883-896.
- Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS (1994) Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*;89:345-354.
- Liu PY, Death AK, Handelsman DJ (2003) Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev*;24:313-340.
- Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF (2007) Cardiac mass and cardiomyocyte size are governed by different genetic loci on either autosomes or chromosome Y in recombinant inbred mice. *Physiol Genomics*;In press-
- Llamas B, Contesse V, Guyonnet-Duperat V, Vaudry H, Mormede P, Moisan MP (2005a) QTL mapping for traits associated with stress neuroendocrine reactivity in rats. *Mamm Genome*;16:505-515.
- Llamas B & Deschepper CF (2005) Identification and validation of loci and candidate genes linked to cardiac hypertrophy. *Methods Mol Med*;112:321-338.
- Llamas B, Jiang Z, Rainville M-L, Picard S, Deschepper CF (2005b) Distinct QTLs are linked to cardiac left ventricular mass in a sex-specific manner in a normotensive inbred rat inter-cross. *Mamm Genome*;16:700-711.
- Llamas B, Lau C, Cupples WA, Rainville M-L, Souzeau E, Deschepper CF (2006) Genetic determinants of systolic and pulse pressure in an intercross between normotensive inbred rats. *Hypertension*;48:921-926.
- Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A (1995) Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature*;378:65-68.
- Louhelainen M, Vahtola E, Kaheinen P, Leskinen H, Merasto S, Kyto V, Finckenberg P, Colucci WS, Levijoki J, Pollesello P et al (2007) Effects of levosimendan on cardiac remodeling and cardiomyocyte apoptosis in hypertensive Dahl/Rapp rats. *Br J Pharmacol*;150:851-861.

- MacRae CA (2000) Genetics and dilated cardiomyopathy: limitations of candidate gene strategies. *Eur Heart J*;21:1817-1819.
- Malcolm DD, Burns TL, Mahoney LT, Lauer RM (1993) Factors affecting left ventricular mass in childhood: the Muscatine Study. *Pediatrics*;92:703-709.
- Manichaikul A, Dupuis J, Sen S, Broman KW (2006) Poor performance of bootstrap confidence intervals for the location of a quantitative trait locus. *Genetics*;174:481-489.
- Mansour-Chemaly M, Haddy N, Siest G, Visvikis S (2002) Family studies: their role in the evaluation of genetic cardiovascular risk factors. *Clin Chem Lab Med*;40:1085-1096.
- Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF, Burelle Y (2006) Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *J Mol Cell Cardiol*;41:998-1009.
- Marian AJ (2002) Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*;17:242-252.
- Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet*;17:280-284.
- Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE (1995) Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*;92:785-789.
- Maron BJ, Nichols PF, III, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ (1984) Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol*;53:1087-1094.
- Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ (1998) Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*;98:256-261.
- Marshall Graves JA (2002) The rise and fall of SRY. *Trends Genet*;18:259-264.
- Marshall JD, Mu JL, Cheah YC, Nesbitt MN, Frankel WN, Paigen B (1992) The AXB and BXA set of recombinant inbred mouse strains. *Mamm Genome*;3:669-680.

- Masciotra S, Picard S, Deschepper CF (1999) Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circ Res*;84:1453-1458.
- Matsumori A, Furukawa Y, Hasegawa K, Sato Y, Nakagawa H, Morikawa Y, Miura K, Ohno Y, Tamakoshi A, Inaba Y et al (2002) Epidemiologic and clinical characteristics of cardiomyopathies in Japan: results from nationwide surveys. *Circ J*;66:323-336.
- Mayosi BM, Keavney B, Watkins H, Farrall M (2003) Measured haplotype analysis of the aldosterone synthase gene and heart size. *Eur J Hum Genet*;11:395-401.
- McKusick VA (2007) Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *Am J Hum Genet*;80:588-604.
- Mendelsohn ME & Rosano GM (2003) Hormonal regulation of normal vascular tone in males. *Circ Res*;93:1142-1145.
- Mercadier JJ, Lompre AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K (1981) Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res*;49:525-532.
- Mestroni L, Miani D, Di Lenarda A, Silvestri F, Bussani R, Filippi G, Camerini F (1990) Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*;65:1449-1453.
- Mestroni L, Milasin J, Vatta M, Pinamonti B, Sinagra G, Rocco C, Matulic M, Falaschi A, Giacca M, Camerini F (1996) Genetic factors in dilated cardiomyopathy. *Arch Mal Coeur Vaiss*;89 Spec No 2:15-20.
- Minhas KM, Saraiva RM, Schuleri KH, Lehrke S, Zheng M, Saliaris AP, Berry CE, Barouch LA, Vandegaer KM, Li D et al (2006) Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Circ Res*;98:271-279.
- Mitchell GF, Jeron A, Koren G (1998) Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol*;274:H747-H751.
- Miura K, Nakagawa H, Morikawa Y, Sasayama S, Matsumori A, Hasegawa K, Ohno Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y (2002) Epidemiology of idiopathic cardiomyopathy in Japan: results from a nationwide survey. *Heart*;87:126-130.
- Miyazaki H, Oka N, Koga A, Ohmura H, Ueda T, Imaizumi T (2006) Comparison of gene expression profiling in pressure and volume overload-induced myocardial hypertrophies in rats. *Hypertens Res*;29:1029-1045.

- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*;93:215-228.
- Monks DA, Kopachik W, Breedlove SM, Jordan CL (2006) Anabolic responsiveness of skeletal muscles correlates with androgen receptor protein but not mRNA. *Can J Physiol Pharmacol*;84:273-277.
- Moody DE, Pomp D, Nielsen MK, Van Vleck LD (1999) Identification of quantitative trait loci influencing traits related to energy balance in selection and inbred lines of mice. *Genetics*;152:699-711.
- Moore KJ & Nagle DL (2000) Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. *Annu Rev Genet*;34:653-686.
- Moreno C, Dumas P, Kaldunski ML, Tonellato PJ, Greene AS, Roman RJ, Cheng Q, Wang Z, Jacob HJ, Cowley AW, Jr. (2003) Genomic map of cardiovascular phenotypes of hypertension in female Dahl S rats. *Physiol Genomics*;15:243-257.
- Morganroth J, Maron BJ, Henry WL, Epstein SE (1975) Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann Intern Med*;82:521-524.
- Morisco C, Sadoshima J, Trimarco B, Arora R, Vatner DE, Vatner SF (2003) Is treating cardiac hypertrophy salutary or detrimental: the two faces of Janus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;284:H1043-H1047.
- Myerson SG, Montgomery HE, Whittingham M, Jubb M, World MJ, Humphries SE, Pennell DJ (2001) Left ventricular hypertrophy with exercise and ACE gene insertion/deletion polymorphism: a randomized controlled trial with losartan. *Circulation*;103:226-230.
- Nabel EG (2003) Cardiovascular disease. *N Engl J Med*;349:60-72.
- Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P (2003) Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*;92:139-150.
- Nadeau JH, Burrage LC, Restivo J, Pao YH, Churchill G, Hoit BD (2003) Pleiotropy, homeostasis, and functional networks based on assays of cardiovascular traits in genetically randomized populations. *Genome Res*;13:2082-2091.
- Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES (2000) Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet*;24:221-225.

- Nagamine CM, Nishioka Y, Moriwaki K, Boursot P, Bonhomme F, Lau YF (1992) The musculus-type Y chromosome of the laboratory mouse is of Asian origin. *Mamm Genome*;3:84-91.
- Nakayama T, Soma M, Saito S, Honye J, Sato M, Aoi N, Kosuge K, Haketa A, Kanmatsuse K, Kokubun S (2003) Missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene is associated with myocardial infarction. *Med Sci Monit*;9:CR505-CR510.
- Negrin CD, McBride MW, Carswell HV, Graham D, Carr FJ, Clark JS, Jeffs B, Anderson NH, Macrae IM, Dominiczak AF (2001) Reciprocal consomic strains to evaluate y chromosome effects. *Hypertension*;37:391-397.
- Nesbitt MN & Skamene E (1984) Recombinant inbred mouse strains derived from A/J and C57BL/6J: a tool for the study of genetic mechanisms in host resistance to infection and malignancy. *J Leukoc Biol*;36:357-364.
- Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson EN (2001) Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J*;20:2757-2767.
- Nitta K, Akiba T, Uchida K, Otsubo S, Otsubo Y, Takei T, Ogawa T, Yumura W, Kabaya T, Nihei H (2004) Left ventricular hypertrophy is associated with arterial stiffness and vascular calcification in hemodialysis patients. *Hypertens Res*;27:47-52.
- Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess DJ, Sharov VG, Sabbah HN, Hoit BD, Ernsberger P, Chandler MP, Stanley WC (2006) Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. *Hypertension*;48:1116-1123.
- Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N (1997) Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A*;94:14730-14735.
- Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P (1995) Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*;26:1068-1079.
- Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, Lu S, Akerstrom B, Holmdahl R (2003) Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet*;33:25-32.
- Olson EN (2006) Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*;313:1922-1927.

- Olsson MC, Palmer BM, Leinwand LA, Moore RL (2001) Gender and aging in a transgenic mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;280:H1136-H1144.
- Onodera T, Tamura T, Said S, McCune SA, Gerdes AM (1998) Maladaptive remodeling of cardiac myocyte shape begins long before failure in hypertension. *Hypertension*;32:753-757.
- Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH (2004) The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*;37:449-471.
- Page GP, George V, Go RC, Page PZ, Allison DB (2003) "Are we there yet?": Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am J Hum Genet*;73:711-719.
- Palmer BM, Chen Z, Lachapelle RR, Hendley ED, LeWinter MM (2006) Cardiomyocyte function associated with hyperactivity and/or hypertension in genetic models of LV hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;290:H463-H473.
- Parascandola M & Weed DL (2001) Causation in epidemiology. *J Epidemiol Community Health*;55:905-912.
- Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A, Ji G, Cheng L, Yang Q, Kotlikoff MI et al (2006) Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest*;116:217-227.
- Pennacchio LA & Rubin EM (2003) Comparative genomic tools and databases: providing insights into the human genome. *J Clin Invest*;111:1099-1106.
- Penpargkul S & Scheuer J (1970) The effect of physical training upon the mechanical and metabolic performance of the rat heart. *J Clin Invest*;49:1859-1868.
- Perola M, Kainulainen K, Pajukanta P, Terwilliger JD, Hiekkalinna T, Ellonen P, Kaprio J, Koskenvuo M, Kontula K, Peltonen L (2000) Genome-wide scan of predisposing loci for increased diastolic blood pressure in Finnish siblings. *J Hypertens*;18:1579-1585.
- Perry J, Palmer S, Gabriel A, Ashworth A (2001) A short pseudoautosomal region in laboratory mice. *Genome Res*;11:1826-1832.
- Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL (2007) The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet*;8:58-69.

- Petkov PM, Ding Y, Cassell MA, Zhang W, Wagner G, Sargent EE, Asquith S, Crew V, Johnson KA, Robinson P et al (2004) An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res*;14:1806-1811.
- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Dunn FG, Nishiyama K, Tsuchiya M, Frohlich ED (1979) Natural biventricular hypertrophy in normotensive rats. I. Physical and hemodynamic characteristics. *Am J Physiol*;236:H640-H643.
- Pierpoint T, McKeigue PM, Isaacs AJ, Wild SH, Jacobs HS (1998) Mortality of women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up. *J Clin Epidemiol*;51:581-586.
- Pinto YM, Paul M, Ganter D (1998) Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*;39:77-88.
- Plut C, Ribiere C, Giudicelli Y, Dausse JP (2002) Gender differences in hypothalamic tyrosine hydroxylase and alpha(2)-adrenoceptor subtype gene expression in cafeteria diet-induced hypertension and consequences of neonatal androgenization. *J Pharmacol Exp Ther*;302:525-531.
- Polanco JC & Koopman P (2006) Sry and the hesitant beginnings of male development. *Dev Biol*;302:13-24.
- Ponten A, Li X, Thoren P, Aase K, Sjöblom T, Ostman A, Eriksson U (2003) Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*;163:673-682.
- Post WS, Larson MG, Myers RH, Galderisi M, Levy D (1997) Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. *Hypertension*;30:1025-1028.
- Pravenec M, Klir P, Kren V, Zicha J, Kunes J (1989) An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J Hypertens*;7:217-221.
- Proud CG (2004) Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*;63:403-413.
- Punnonen R, Jokela H, Aine R, Teisala K, Salomaki A, Uppa H (1997) Impaired ovarian function and risk factors for atherosclerosis in premenopausal women. *Maturitas*;27:231-238.
- Quinones MA, Greenberg BH, Kopelen HA, Koilpillai C, Limacher MC, Shindler DM, Shelton BJ, Weiner DH (2000) Echocardiographic predictors of clinical outcome in patients with left ventricular dysfunction enrolled in the SOLVD registry and trials:

- significance of left ventricular hypertrophy. Studies of Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol*;35:1237-1244.
- Rapp JP (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev*;80:135-172.
- Rapp JP (1991) Dissecting the primary causes of genetic hypertension in rats. *Hypertension*;18:I18-I28.
- Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*;428:493-521.
- Redfield MM (2002) Heart failure--an epidemic of uncertain proportions. *N Engl J Med*;347:1442-1444.
- Reffelmann T & Kloner RA (2003) Transthoracic echocardiography in rats. Evaluation of commonly used indices of left ventricular dimensions, contractile performance, and hypertrophy in a genetic model of hypertrophic heart failure (SHHF-Mcc-facp-Rats) in comparison with Wistar rats during aging. *Basic Res Cardiol*;98:275-284.
- Regitz-Zagrosek V (2006) Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*;5:425-438.
- Rhoden EL & Morgentaler A (2004) Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med*;350:482-492.
- Rocha JL, Eisen EJ, Van Vleck LD, Pomp D (2004) A large-sample QTL study in mice: II. Body composition. *Mamm Genome*;15:100-113.
- Rockman HA, Knowlton KU, Ross J, Chien KR (1993) In vivo murine cardiac hypertrophy: A novel model to identify genetic signaling mechanisms that activate an adaptive physiological response. *Circulation*;87:14-21.
- Rodriguez CJ, Lin F, Sacco RL, Jin Z, Boden-Albala B, Homma S, Di Tullio MR (2006) Prognostic implications of left ventricular mass among Hispanics: the Northern Manhattan Study. *Hypertension*;48:87-92.
- Rohozinski J, Agoulnik AI, Boettger-Tong HL, Bishop CE (2002) Successful targeting of mouse Y chromosome genes using a site-directed insertion vector. *Genesis*;32:1-7.
- Rosengren A, Hawken S, Ounpuu S, Sliwa K, Zubaid M, Almahmeed WA, Blackett KN, Sitthi-amorn C, Sato H, Yusuf S (2004) Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*;364:953-962.

- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP et al (2005) The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*;434:325-337.
- Ross RS & Borg TK (2001) Integrins and the myocardium. *Circ Res*;88:1112-1119.
- Rossouw JE (2002) Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*;53:550-557.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC et al (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*;288:321-333.
- Rota M, Boni A, Urbanek K, Padin-Iruegas ME, Kajstura TJ, Fiore G, Kubo H, Sonnenblick EH, Musso E, Houser SR et al (2005) Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility. *Circ Res*;97:1332-1341.
- Rottman JN, Ni G, Brown M (2007) Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. *Echocardiography*;24:83-89.
- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*;423:873-876.
- Rubattu S, Bigatti G, Evangelista A, Lanzani C, Stanzione R, Zagato L, Manunta P, Marchitti S, Venturelli V, Bianchi G et al (2006) Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*;48:499-505.
- Saadane N, Alpert L, Chalifour LE (1999) Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol*;127:1165-1176.
- Sack MN & Kelly DP (1998) The energy substrate switch during development of heart failure: gene regulatory mechanisms (Review). *Int J Mol Med*;1:17-24.
- Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier H (2003) Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation*;107:2864-2869.
- Sandstedt SA & Tucker PK (2006) Inefficient purifying selection: the mammalian Y chromosome in the rodent genus *Mus*. *Mamm Genome*;17:14-21.

- Sandvik L, Eriksson J, Thaulow E, Eriksson G, Mundal R, Aakhus T (1993) Heart volume and cardiovascular mortality. A 16 year follow-up study of 1984 healthy middle-aged men. *Eur Heart J*;14:592-596.
- Scheuer J & Tipton CM (1977) Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol*;39:221-251.
- Schillaci G, Verdecchia P, Porcellati C, Cuccurullo O, Cosco C, Perticone F (2000) Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension*;35:580-586.
- Schmieder RE, Erdmann J, Delles C, Jacobi J, Fleck E, Hilgers K, Regitz-Zagrosek V (2001) Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans. *J Am Coll Cardiol*;37:175-182.
- Schmieder RE, Langenfeld MR, Friedrich A, Schobel HP, Gatzka CD, Weihprecht H (1996) Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. *Circulation*;94:1304-1309.
- Schonberger J, Levy H, Grunig E, Sangwanaroj S, Fatkin D, MacRae C, Stacker H, Halpin C, Eavey R, Philbin EF et al (2000) Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndrome that maps to 6q23-24. *Circulation*;101:1812-1818.
- Schork NJ (1997) Genetically complex cardiovascular traits. Origins, problems, and potential solutions. *Hypertension*;29:145-149.
- Schroeder AP, Sihm I, Morn B, Thygesen K, Pedersen EB, Lederballe O (1996) Influence of humoral and neurohormonal factors on cardiovascular hypertrophy in untreated essential hypertensives. *Am J Hypertens*;9:207-215.
- Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Rieger GA (1994) Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*;330:1634-1638.
- Schwartz K, De La Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M (1986) Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res*;59:551-555.
- Sebksi A, Zhao L, Lu L, Haley CS, Nunez DJ, Wilkins MR (1999) Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats: results from an F344xWKY cross. *Hypertension*;33:949-953.

- Seda O, Liska F, Krenova D, Kazdova L, Sedova L, Zima T, Peng J, Pelinkova K, Tremblay J, Hamet P et al (2005) Dynamic genetic architecture of metabolic syndrome attributes in the rat. *Physiol Genomics*;21:243-252.
- Seidman JG & Seidman C (2001) The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*;104:557-567.
- Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G (2004) Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res*;63:373-380.
- Sen S & Churchill GA (2001) A statistical framework for quantitative trait mapping. *Genetics*;159:371-387.
- Sen S, Satagopan JM, Broman KW, Churchill GA (2007) R/qtldesign: inbred line cross experimental design. *Mamm Genome*;18:87-93.
- Sen S, Satagopan JM, Churchill GA (2005) Quantitative trait locus study design from an information perspective. *Genetics*;170:447-464.
- Shai SY, Harpf AE, Babbitt CJ, Jordan MC, Fishbein MC, Chen J, Omura M, Leil TA, Becker KD, Jiang M et al (2002) Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res*;90:458-464.
- Shankar RR, Charchar FJ, Eckert GJ, Saha C, Tu W, Dominiczak AF, Pratt JH (2007) Studies of an association in boys of blood pressure and the y chromosome. *Am J Hypertens*;20:27-31.
- Shi W, Chen Z, Schottenfeld J, Stahl RC, Kunkel LM, Chan YM (2004) Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve*;29:409-419.
- Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K (2005) Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*;115:2108-2118.
- Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, Schaefer E, Walsh K, Rosenzweig A, Torella D et al (2004) Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*;94:884-891.
- Shoji M, Tsutaya S, Shimada J, Kojima K, Kasai T, Yasujima M (2002) Lack of association between Y chromosome Alu insertion polymorphism and hypertension. *Hypertens Res*;25:1-3.

- Siegel AK, Planert M, Rademacher S, Mehr AP, Kossmehl P, Wehland M, Stoll M, Kreutz R (2003) Genetic Loci contribute to the progression of vascular and cardiac hypertrophy in salt-sensitive spontaneous hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;23:1211-1217.
- Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD (1989) Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int*;36:286-290.
- Simpson E, Scott D, Chandler P (1997a) The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annu Rev Immunol*;15:39-61.
- Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ (1997b) Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet*;16:19-27.
- Singer JB, Hill AE, Burrage LC, Olszens KR, Song J, Justice M, O'Brien WE, Conti DV, Witte JS, Lander ES et al (2004) Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice. *Science*;304:445-448.
- Singh J & Handelsman DJ (1999) Imprinting by neonatal sex steroids on the structure and function of the mature mouse prostate. *Biol Reprod*;61:200-208.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T et al (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*;423:825-837.
- Slama M, Susic D, Varagic J, Frohlich ED (2002) High rate of ventricular septal defects in WKY rats. *Hypertension*;40:175-178.
- Sluyter F, Van Oortmerssen GA, De Ruiter AJ, Koolhaas JM (1996) Aggression in wild house mice: current state of affairs. *Behav Genet*;26:489-496.
- Snell GD (1948) Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet*;49:87-99.
- Soler JM, Pereira AC, Torres CH, Krieger JE (2006) Gene by environment QTL mapping through multiple trait analyses in blood pressure salt-sensitivity: identification of a novel QTL in rat chromosome 5. *BMC Med Genet*;7:47-
- Soller M, Brody T, Genizi A (1976) On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *TAG Theor Appl Genet*;47:35-39.

- Souzeau E, Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF (2006) A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats. *Hypertension*;47:128-133.
- Stainier DY (2001) Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat Rev Genet*;2:39-48.
- Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1991) Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med*;325:756-762.
- Stella P, Bigatti G, Tizzoni L, Barlassina C, Lanzani C, Bianchi G, Cusi D (2004) Association between aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphism and left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*;43:265-270.
- Steyn K, Sliwa K, Hawken S, Commerford P, Onen C, Damasceno A, Ounpuu S, Yusuf S (2005) Risk factors associated with myocardial infarction in Africa: the INTERHEART Africa study. *Circulation*;112:3554-3561.
- Stoll M, Cowley AW, Jr., Tonellato PJ, Greene AS, Kaldunski ML, Roman RJ, Dumas P, Schork NJ, Wang Z, Jacob HJ (2001) A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science*;294:1723-1726.
- Sugden PH & Clerk A (1998) "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*;83:345-352.
- Sugiyama F, Churchill GA, Li R, Libby LJ, Carver T, Yagami K, John SW, Paigen B (2002) QTL associated with blood pressure, heart rate, and heart weight in CBA/CaJ and BALB/cJ mice. *Physiol Genomics*;10:5-12.
- Susic D, Nunez E, Frohlich ED, Prakash O (1996) Angiotensin II increases left ventricular mass without affecting myosin isoform mRNAs. *Hypertension*;28:265-268.
- Swynghedauw B (1986) Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev*;66:710-771.
- Takahashi J, Kagaya Y, Kato I, Ohta J, Isoyama S, Miura M, Sugai Y, Hirose M, Wakayama Y, Ninomiya M et al (2003) Deficit of CD38/cyclic ADP-ribose is differentially compensated in hearts by gender. *Biochem Biophys Res Commun*;312:434-440.
- Takemori K, Ishida H, Ito H (2005) Continuous inhibition of the renin-angiotensin system and protection from hypertensive end-organ damage by brief treatment with

- angiotensin II type 1 receptor blocker in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*;77:2233-2245.
- Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA (2005) Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*;11:214-222.
- Takuma S, Suehiro K, Cardinale C, Hozumi T, Yano H, Shimizu J, Mullis-Jansson S, Sciacca R, Wang J, Burkhoff D et al (2001) Anesthetic inhibition in ischemic and nonischemic murine heart: comparison with conscious echocardiographic approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;280:H2364-H2370.
- Talbert GB & Hamilton JB (1965) Duration of life in Lewis strain of rats after gonadectomy at birth and at older ages. *J Gerontol*;20:489-491.
- Talbot CJ, Nicod A, Cherny SS, Fulker DW, Collins AC, Flint J (1999) High-resolution mapping of quantitative trait loci in outbred mice. *Nat Genet*;21:305-308.
- Tamura T, Onodera T, Said S, Gerdes AM (1998) Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J Mol Cell Cardiol*;30:2175-2181.
- Tanase H, Yamori Y, Hansen CT, Lovenberg W (1982) Heart size in inbred strains of rats. Part 1. Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension*;4:864-872.
- Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L et al (2006) Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet*;368:647-658.
- Teuscher C, Noubade R, Spach K, McElvany B, Bunn JY, Fillmore PD, Zachary JF, Blankenhorn EP (2006) Evidence that the Y chromosome influences autoimmune disease in male and female mice. *Proc Natl Acad Sci USA*;103:8024-8029.
- Thrainsdottir IS, Hardarson T, Thorgeirsson G, Sigvaldason H, Sigfusson N (2003) Survival and trends of occurrence of left ventricular hypertrophy, gender differences, 1967-92: The Reykjavik Study. *J Intern Med*;253:418-424.
- Threadgill DW, Hunter KW, Williams RW (2002) Genetic dissection of complex and quantitative traits: from fantasy to reality via a community effort. *Mamm Genome*;13:175-178.
- Thum T & Borlak J (2002) Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J*;16:1537-1549.

- Toot J, Dunphy G, Turner M, Ely D (2004) The SHR Y-chromosome increases testosterone and aggression, but decreases serotonin as compared to the WKY Y-chromosome in the rat model. *Behav Genet*;34:515-524.
- Toumazou C, Li J, Wong J (2007) Cofactor Restriction by Androgen Receptor N-terminal and C-terminal Interaction. *Mol Endocrinol*;[Epub ahead of print].
- Toure A, Clemente EJ, Ellis P, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Ball PA, Reynard L, Loveland KL, Burgoyne PS, Affara NA (2005) Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice with deletions of the Y chromosome long arm. *Genome Biol*;6:R102-
- Toure A, Grigoriev V, Mahadevaiah SK, Rattigan A, Ojarikre OA, Burgoyne PS (2004a) A protein encoded by a member of the multicopy Ssty gene family located on the long arm of the mouse Y chromosome is expressed during sperm development. *Genomics*;83:140-147.
- Toure A, Szot M, Mahadevaiah SK, Rattigan A, Ojarikre OA, Burgoyne PS (2004b) A new deletion of the mouse Y chromosome long arm associated with the loss of Ssty expression, abnormal sperm development and sterility. *Genetics*;166:901-912.
- Towbin JA & Bowles NE (2000) Genetic abnormalities responsible for dilated cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*;2:475-480.
- Tsoutsman T, Lam L, Semsarian C (2006) Genes, calcium and modifying factors in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*;33:139-145.
- Tsujita Y, Iwai N, Tamaki S, Nakamura Y, Nishimura M, Kinoshita M (2000) Genetic mapping of quantitative trait loci influencing left ventricular mass in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;279:H2062-H2067.
- Ueno T, Tremblay J, Kunes J, Zicha J, Dobesova Z, Pausova Z, Deng AY, Sun Y, Jacob HJ, Hamet P (2003) Gender-specific genetic determinants of blood pressure and organ weight: pharmacogenetic approach. *Physiol Res*;52:689-700.
- Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, Taylor MS, Rawlins JN, Mott R, Flint J (2006) Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet*;38:879-887.
- van Kesteren PJ, Asschelman H, Megens JA, Gooren LJ (1997) Mortality and morbidity in transsexual subjects treated with cross-sex hormones. *Clin Endocrinol (Oxf)*;47:337-342.

- Van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks AP, Van Der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC (2001) Association between arterial stiffness and atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Stroke*;32:454-460.
- Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Levy D (1997) Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. *N Engl J Med*;336:1350-1355.
- Verdecchia P, Carini G, Circo A, Dovellini E, Giovannini E, Lombardo M, Solinas P, Gorini M, Maggioni AP (2001) Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J Am Coll Cardiol*;38:1829-1835.
- Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Pede S, Porcellati C (1998) Ambulatory pulse pressure: a potent predictor of total cardiovascular risk in hypertension. *Hypertension*;32:983-988.
- Verhaaren HA, Schieken RM, Mosteller M, Hewitt JK, Eaves LJ, Nance WE (1991) Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am J Cardiol*;68:661-668.
- Verhave JC, Fesler P, Du Cailar G, Ribstein J, Safar ME, Mimran A (2005) Elevated pulse pressure is associated with low renal function in elderly patients with isolated systolic hypertension. *Hypertension*;45:586-591.
- Vikstrom KL, Factor SM, Leinwand LA (1996) Mice expressing mutant myosin heavy chains are a model for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Med*;2:556-567.
- Vikstrom KL & Leinwand LA (1996) Contractile protein mutations and heart disease. *Curr Opin Cell Biol*;8:97-105.
- Villard E (2003) [Genetics and dilated cardiomyopathy]. *Arch Mal Coeur Vaiss*;96:1049-1053.
- Villari B, Campbell SE, Schneider J, Vassalli G, Chiariello M, Hess OM (1995) Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J*;16:1410-1419.
- Vincent M, Hadour G, Orea V, Samani NJ, Sassard J (1996) Left ventricular weight but not blood pressure is associated with sex chromosomes in Lyon rats. *J Hypertens*;14:293-299.
- Visscher PM, Thompson R, Haley CS (1996) Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics*;143:1013-1020.

- Vom Saal FS (1979) Prenatal exposure to androgen influences morphology and aggressive behavior of male and female mice. *Horm Behav*;12:1-11.
- Wakeland E, Morel L, Achey K, Yui M, Longmate J (1997) Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today*;18:472-477.
- Warkman AS & Krieg PA (2007) Xenopus as a model system for vertebrate heart development. *Semin Cell Dev Biol*;18:46-53.
- Watkins H (2003) Genetic clues to disease pathways in hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation*;107:1344-1346.
- Weinberg EO, Thienelt CD, Katz SE, Bartunek J, Tajima M, Rohrbach S, Douglas PS, Lorell BH (1999) Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*;34:264-273.
- Wessels A & Sedmera D (2003) Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics*;15:165-176.
- Wettschureck N, Rutten H, Zywiertz A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermanns S (2001) Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galphal1 in cardiomyocytes. *Nat Med*;7:1236-1240.
- Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H (2000) Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)*;52:595-600.
- Wilhelm D & Koopman P (2006) The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet*;7:620-631.
- Wilkins BJ & Molkentin JD (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*;322:1178-1191.
- Williams RW, Gu J, Qi S, Lu L (2001) The genetic structure of recombinant inbred mice: high-resolution consensus maps for complex trait analysis. *Genome Biol*;2:research0046.1-0046.18.
- Wiltshire T, Pletcher MT, Batalov S, Barnes SW, Tarantino LM, Cooke MP, Wu H, Smylie K, Santrosyan A, Copeland NG et al (2003) Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis defines haplotype patterns in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*;100:3380-3385.

- Winnicki M, Somers VK, Accurso V, Hoffmann M, Pawlowski R, Frigo G, Visentin P, Palatini P (2002) alpha-Adducin Gly460Trp polymorphism, left ventricular mass and plasma renin activity. *J Hypertens*;20:1771-1777.
- Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM (2006) Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest*;116:675-682.
- Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS, Wang YX, Copello JA, Ji GJ, Collier ML, Deng KY, Jeyakumar LH, Magnuson MA et al (2002) Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature*;416:334-338.
- Xu Y, Malhotra A, Ren M, Schlame M (2006) The enzymatic function of tafazzin. *J Biol Chem*;281:39217-39224.
- Yagil C, Hubner N, Kreutz R, Ganter D, Yagil Y (2003) Congenic strains confirm the presence of salt-sensitivity QTLs on chromosome 1 in the Sabra rat model of hypertension. *Physiol Genomics*;12:85-95.
- Yagil C, Sapojnikov M, Kreutz R, Zurcher H, Ganter D, Yagil Y (1999) Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension. *Hypertension*;33:261-265.
- Yang H, Bell TA, Churchill GA, Pardo-Manuel d, V (2007) On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat Genet*;[Epub ahead of print]-
- Yang XP, Liu YH, Rhaleb NE, Kurihara N, Kim HE, Carretero OA (1999) Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol*;277:H1967-H1974.
- Yuan X, Lu ML, Li T, Balk SP (2001) SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*;276:46647-46654.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L et al (2005) Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*;366:1640-1649.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J et al (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*;364:937-952.
- Yutzey KE & Robbins J (2007) Principles of genetic murine models for cardiac disease. *Circulation*;115:792-799.

- Zahabi A, Picard S, Fortin N, Reudelhuber TL, Deschepper CF (2003) Expression of constitutively active guanylate cyclase in cardiomyocytes inhibits the hypertrophic effects of isoproterenol and aortic constriction on mouse hearts. *J Biol Chem*;278:47694-47699.
- Zaugg M, Jamali NZ, Lucchinetti E, Xu W, Alam M, Shafiq SA, Siddiqui MA (2001) Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J Cell Physiol*;187:90-95.
- Zeng ZB (1993) Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*;90:10972-10976.
- Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, Xiao RP (2000) Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;279:H429-H436.
- Zhu X, Wheeler MT, Hadhazy M, Lam MY, McNally EM (2002) Cardiomyopathy is independent of skeletal muscle disease in muscular dystrophy. *FASEB J*;16:1096-1098.
- Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA (2005) Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;25:932-943.
- Zierhut W, Zimmer HG, Gerdes AM (1991) Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res*;69:609-617.
- Zimdahl H, Nyakatura G, Brandt P, Schulz H, Hummel O, Fartmann B, Brett D, Droege M, Monti J, Lee YA et al (2004) A SNP map of the rat genome generated from cDNA sequences. *Science*;303:807-
- Zou F, Gelfond JA, Airey DC, Lu L, Manly KF, Williams RW, Threadgill DW (2005) Quantitative trait locus analysis using recombinant inbred intercrosses: theoretical and empirical considerations. *Genetics*;170:1299-1311.
- Zou Y, Song L, Wang Z, Ma A, Liu T, Gu H, Lu S, Wu P, Zhang Y, Shen L et al (2004) Prevalence of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in China: a population-based echocardiographic analysis of 8080 adults. *Am J Med*;116:14-18.

**Annexe 1: Hypertensive cardiac remodeling in males and females: from the bench to the bedside**

## Hypertensive Cardiac Remodeling in Males and Females From the Bench to the Bedside

Christian F. Deschepper, Bastien Llamas

**C**ardiovascular diseases affect women and men differently: there are sex-dependent differences in the age at which they become manifest, in the pathophysiologic consequences of various insults, in the relative importance of risk factors, and in the responses to several treatments (as reviewed recently).<sup>1,2</sup> Although many of these differences may relate to modifications of the lipid profile, as well as differences in the functions of endothelial and/or vascular smooth muscle cells, it is becoming clear that direct actions within the heart itself must also be considered. The current review will, therefore, focus on sex-specific differences in the remodeling responses of cardiac ventricles to various challenges.

### Sex-Dependent Differences in Cardiac Remodeling

At baseline, male and female hearts display several differences: (1) coronary artery size is smaller in women<sup>3</sup>; (2) there are differences in the electrophysiological properties of the hearts, as females have faster resting heart rates and longer rate-corrected QT intervals<sup>4,5</sup>; (3) male and female hearts differ in terms of the pattern of expression of certain genes<sup>6</sup>; and (4) there are differences in the contractile properties of male and female hearts.<sup>7,8</sup> More importantly, there are significant differences in the way male and female hearts respond to various challenges. In rodents, aortic banding-induced pressure overload increases left ventricular mass to the same extent in males and females, but function is better preserved in females, and males show an early transition to heart failure.<sup>9,10</sup> In rats, volume overload induces eccentric dilated hypertrophy in male Sprague-Dawley rats but not in females.<sup>11</sup> Differences in the remodeling responses can also be seen after myocardial infarction (MI), because female rats develop less thickening of noninfarcted regions and less pronounced diastolic dysfunction than their male counterparts,<sup>12</sup> and post-MI rupture of the left ventricle is less frequent in female than in male mice.<sup>13,14</sup> Aging (arguably the most common type of insult on human hearts) may also affect cardiomyocytes in a sex-specific fashion. For instance, various biochemical characteristics (including telomerase activity and several components of the insulin-like growth factor system) vary differently across the lifespan in male and

female cardiomyocytes.<sup>15,16</sup> Finally, there are several examples where modification of the cardiac expression of specific genes (either by transgenesis or inactivation) induces cardiac remodeling in male but not in female mice.<sup>17,18</sup> With the exception of longer QT intervals (which increase the risk of "torsades-de-pointe" in females), males generally develop greater remodeling responses than females.<sup>2</sup> The sex-related differences in remodeling of the whole heart are mirrored by differences in intracellular signaling pathways and/or patterns of gene expression. First, rat cardiac myocytes display sex-dependent differences in intracellular calcium concentrations under either baseline or stimulated conditions (which is important in light of the central role that calcium exerts on cardiac growth and function<sup>19</sup>), possibly because of differences in the capacity of the sarcoplasmic reticulum to handle calcium.<sup>20,21</sup> Second, many genes respond to pressure overload in a sex-specific manner in rat hearts.<sup>22</sup>

The evidence listed above has been derived from experiments performed in animals. Direct comparisons with humans are not always possible, because clinical studies often enroll aged patients, where participating women are postmenopausal. Nonetheless, there is evidence that left ventricles remodel differently in women and men. For instance, women with aortic stenosis display more marked concentric hypertrophy, better preservation of systolic function, and less fibrosis than men.<sup>23,24</sup> Likewise, hypertension induces mostly concentric hypertrophy in women but eccentric dilated hypertrophy in men.<sup>25</sup> It also has been reported that left ventricular mass decreases in an age-dependent fashion in men but not in women.<sup>26</sup> These age-related changes are paralleled at the cellular level, because the number of cardiomyocytes decreases with age and their volume increases in men but not in women.<sup>27</sup> Microarray experiments have also revealed that sex had a greater effect than heart failure on the cardiac transcriptome in human hearts.<sup>28</sup> Of note, premenopausal women do not always fare better than men. When cardiac complications do develop in women, they often have more negative consequences than in men.<sup>1</sup> Women are also more vulnerable than men to specific pathologies, such as idiopathic dilated cardiomyopathy or alcohol-induced cardiac disease.<sup>17</sup>

Received October 17, 2006; first decision November 1, 2006; revision accepted December 13, 2006.

From the Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Quebec, Canada, and the Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada.

Correspondence to Christian F. Deschepper, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Pine Ave West, Montréal, Quebec, Canada H2W 1R7.  
E-mail: [christian.deschepper@ircm.ca](mailto:christian.deschepper@ircm.ca)

(*Hypertension*, 2007;49:401-407).

© 2007 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at <http://www.hypertensionaha.org>

DOI: 10.1161/01.HYP.0000256279.49882.d8

Several lines of evidence suggest that differences in the steroid environment may be (at least in part) responsible for some of these sex-dependent differences. First, there is no sex-related difference in heart size before puberty.<sup>28</sup> Second, in young premenopausal women, cardiovascular risk increases when estrogen production stops, for instance, as a result of surgery.<sup>29</sup> Of note, the presence of functional estrogen receptors on both cardiac myocytes and fibroblasts,<sup>30</sup> as well as that of functional androgen receptors in cardiomyocytes from several species,<sup>31,53</sup> are compatible with the notion that sex steroids may exert direct effects on the hearts, as will be discussed in the following paragraphs.

### Cardiac Effects of Estrogens

In young adult rats, ovariectomy abolishes the female-specific protection against volume overload-induced adverse remodeling<sup>32</sup> and attenuates the effect of age on ventricular remodeling.<sup>33</sup> Conversely, administration of estradiol to ovariectomized female rodents attenuates the remodeling induced by either pressure overload<sup>34</sup> or aging.<sup>35</sup> The effects of estrogens on postmyocardial infarct remodeling are a bit more controversial. Some have reported in Sprague-Dawley rats that estrogens had deleterious acute effects on infarct size and acute mortality but prevented later dilated remodeling.<sup>36</sup> Others have found no evidence of such effects of physiological replacement of estrogens in Wistar rats<sup>36</sup> but found that high pharmacological doses of estradiol prevented post-MI remodeling.<sup>37</sup> In C57BL/6J mice, others have reported that, despite diminished infarct size and reduced cardiomyocyte apoptosis, estradiol-treated mice had greater increases in left ventricular mass and enhanced post-MI mortality.<sup>38</sup> Finally, systemic deletion of estrogen receptor (ER) $\beta$  increases mortality and aggravates clinical and biochemical markers of heart failure in the post-MI period.<sup>39</sup>

In addition to its effects on cardiomyocytes, estradiol also affects age-induced changes in collagen isoforms and metalloprotease activity, indicating that the antiremodeling effects of estradiol are not limited to cardiomyocytes but may also affect noncardiac cells, as well as the extracellular matrix.<sup>33</sup> The latter finding is compatible with the observation that estradiol inhibits the proliferation of cardiac fibroblasts and their capacity to produce collagen.<sup>40,41</sup> Mast cells constitute other types of noncardiac cells that are postulated to play important roles in ventricular remodeling. The effect of either pressure overload or age on ventricular remodeling has been shown to be greatly attenuated in genetic rodent models that are devoid of mast cells.<sup>42,43</sup> The cause-effect relationship among myocardial mast cells, matrix metalloprotease activity, and volume overload-induced ventricular remodeling has also been demonstrated by pharmacological inhibition of mast cell degranulation.<sup>44,45</sup> Importantly, estrogens also inhibit cardiac mast-cell-mediated extracellular matrix degradation,<sup>46</sup> an effect that probably participates in the protective effect of ovarian hormones against volume overload-induced hypertrophy. In humans, transdermal estradiol has been shown to increase the effect of standard antihypertensive therapy on left ventricular mass reduction.<sup>47</sup> Despite all of the evidence listed above, the effects of estrogens on left ventricular remodeling cannot be considered as consistently

### Mechanisms Possibly Involved in the Cardioprotective Effects of Estrogens

Mechanisms	References
Increased production of atrial natriuretic peptide	48
Upregulation of NO synthases	89
Increased nuclear Akt activity	90
Decrease apoptosis of cardiomyocytes	91
Decreased phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase	34
Decreased B-type endothelin receptors in cardiomyocytes	92
Decreased expression of the cardiac L-type calcium channel	93
Decreased production of tumor necrosis factor- $\alpha$	94
Decreased angiotensin-converting enzyme	95
Decreased angiotensin AT1 receptors	41,96

positive, as shown for instance in some models of post-MI remodeling.<sup>38</sup>

In keeping with the many cardioprotective effects of estrogens identified mostly in animal models, these compounds have been reported to recruit several protective mechanisms and to activate protective signaling pathways, as well as to inhibit several potentially harmful mechanisms or pathways, as summarized in the Table. For instance, estradiol inhibits pressure overload-induced hypertrophy via induction of the production of atrial natriuretic peptide<sup>48</sup> and, thus, via activation of intracellular cGMP, which has been shown to be sufficient to inhibit pressure overload hypertrophy.<sup>39</sup>

### The Presence of Estrogens or the Absence of Androgens?

When considering the causes of reduced cardiovascular risk in premenopausal women, much more attention has been paid to the potential protective effects of estrogens than on the possible deleterious effects of androgens. However, the absence of a clear and sharp break point in the rise of female cardiovascular risk at menopause has led some to challenge the estrogen protection hypothesis.<sup>50,51</sup> The fact that the prospective Hormone and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Trial of estrogen replacement therapy actually increased cardiovascular risk in healthy postmenopausal women has reinforced this thinking.<sup>52</sup> Several lines of evidence indicate that androgens may be (at least in part) responsible for some differences in the cardiovascular systems of males and females. For instance, the higher plasma concentration of high-density lipoprotein in women is because of the fact that androgens decrease high-density lipoprotein cholesterol and not because of the fact that estrogens increase it.<sup>50</sup> In male mice, the increased risk of post-MI rupture of the ventricular wall is because of testosterone; however, estrogens may decrease the risk in males by virtue of their testosterone-lowering effects.<sup>17</sup> Likewise, much of the sex-dependent differences in adult mouse cardiac repolarization are because of the effects of androgens.<sup>53</sup> There are also several rat models where higher levels of blood pressure in males are explained by a deleterious effect of testosterone but not by a blood pressure-lowering effect of estrogens.<sup>54</sup>

Likewise, there is evidence that antiandrogen treatment of hypertensive rats with flutamide decreases end-organ damage in heart and kidneys<sup>55</sup>; however, the interpretation of these data are not clear cut, because flutamide has also been found to have cardiovascular actions that are androgen receptor independent.<sup>56</sup> In vitro, androgens have been reported to induce apoptosis in cardiomyocytes.<sup>57</sup> The possible effects of androgens on cardiac remodeling are compatible with the report that cardiomyocytes contain functional and responsive androgen receptors.<sup>58</sup>

Despite the findings listed above, there is no clear-cut evidence that androgens are deleterious from a cardiovascular standpoint: (1) in males, there is evidence that physiological levels of testosterone participate, via its conversion to estrogen in target tissues by aromatase, to the maintenance of normal vascular tone in males<sup>59</sup>; (2) in men, there is an inverse relationship between testosterone levels and the incidence of coronary heart disease<sup>60</sup>; and (3) there is no evidence that administration of testosterone at physiological doses has any effect on cardiovascular risk.<sup>60</sup> However, the possibility remains that androgens may exert adverse effects in certain particular backgrounds and/or conditions. For instance, it has been reported recently that postmenopausal women with type 2 diabetes have evidence of androgen excess that might contribute to increased cardiovascular risk.<sup>61</sup>

### Mechanisms of Actions of Sex Steroids and Gene–Environment Interactions

The effects of estrogens are mediated via 2 distinct types of ER, that is, ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Each ER appears to contribute differently to the various cardioprotective effects of estrogens. In the vasculature, the protective effects of estrogens have been shown in knockout mice to be mediated predominantly via ER $\alpha$ . In contrast, the protective effect of estradiol against pressure overload-induced hypertrophy is abolished only after inactivation of ER $\beta$ .<sup>62,63</sup> Interestingly, recent data indicate that ER $\beta$  gene polymorphisms associate with left ventricular mass and wall thickness in women but not in men.<sup>64</sup> However, the molecular machinery mediating cellular responses to estrogens is complex and involves both genomic and nongenomic effects, is regulated by numerous coregulatory proteins, and is still far from being understood.<sup>65,66</sup> The actions of activated androgen receptors are modulated by an equally large number of coregulators,<sup>51</sup> but their mechanisms of action and their potential roles within the cardiovascular system have been studied in less detail than that of ERs. When considering the effects of steroids on the heart, one should also take into account their actions on different cell types and/or processes. For instance, estrogens and androgens have been suggested to have adverse and beneficial effects on inflammatory processes in cardiomyocytes and/or immune cells, respectively.<sup>67,68</sup>

We have shown recently by linkage analysis that genetic loci linked to left ventricular mass under baseline conditions in males are different and distinct from those found in females in a normotensive rat cross.<sup>69</sup> However, when the hearts are challenged by volume overload, a particular locus that showed linkage to baseline left ventricular mass in males only

was linked to transition toward congestive heart failure both in males and females, thus showing that the effect of loci may be modulated by environmental conditions.<sup>70</sup> Some of these gene–environment interactions may actually result from differences in the response of individuals to sex steroids. For example, androgens increase left ventricular mass to a much greater extent in mice where the gene coding for natriuretic peptide receptor A was inactivated than in their wild-type counterparts.<sup>71</sup> In rats, we have made similar observations, because orchidectomy did not decrease the size of cardiomyocytes in Wistar–Kyoto male rats but did so in congenic Wistar–Kyoto rats containing a hypomorphic variant allele of the gene coding for atrial natriuretic peptide precursor (B.L. and C.F.D., unpublished observations, 2006). In some instances, steroids themselves may constitute the environmental factor, which is then modulated by gene variants within the steroid-responsive machinery. For instance, recent data in humans show that variants of the ER $\alpha$  gene associate with MI in men,<sup>72</sup> whereas variants of the ER $\beta$  gene associate with left ventricular mass in women.<sup>64</sup> Thus, when considering the actions of sex steroids, one should remember that their effects can be modulated by the genetic background of individuals, as well as by environmental conditions (including age and/or postmenopausal condition).

### Role of Sex Chromosomes

The mechanisms responsible for sex-based differences in ventricular remodeling are not entirely clear, but differences in sex chromosomes constitute an undisputable difference between males and females. One of the attributes of maleness in humans and laboratory rodents is the presence of chromosome Y. Interestingly, several chromosome substitution experiments have been performed between normotensive (Wistar–Kyoto, Brown Norway, and King Holtzman) and hypertensive (spontaneously hypertensive and spontaneously hypertensive stroke-prone) rat inbred strains.<sup>73,74</sup> In several cases, the presence of chromosome Y from the hypertensive strain was associated with a 20- to 25-mm Hg difference in blood pressure. Of note, this is not a genetic characteristic of all hypertensive strains, because transfer of chromosome Y from other hypertensive strains did not yield the same effect.<sup>73</sup> When present, the effect of chromosome Y was found to depend on the presence of testosterone and of androgen receptors.<sup>74</sup> Although the effect of chromosome Y on left ventricular mass has not been tested directly, allelic variants of this chromosome also associate with sympathetic nervous system activity, salt sensitivity, and lipid phenotypes, all of which may (in addition to blood pressure) affect cardiac remodeling.<sup>71,74</sup> Recently we have measured the shape of cardiomyocytes from 2 mouse strains displaying marked differences in cardiac mass, that is, A/J and C57Bl/6J mice.<sup>75,76</sup> In keeping with the differences in cardiac mass, cardiomyocytes from C57Bl/6J mice were much larger than that from their A/J counterparts. However, substitutions of chromosome Y between the 2 strains revealed that chromosome Y from C57Bl/6J was associated with an increased size of cardiomyocytes, despite the fact that blood pressure was within the normotensive range in all of the strains.<sup>77</sup> Further analyses are underway to decipher the mechanisms responsi-

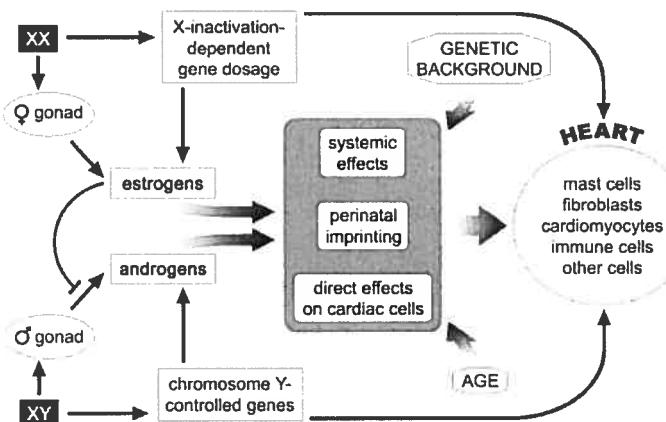


Diagram summarizing the ways and mechanisms by which sex can modulate the phenotype of the heart.

ble for these effects. The finding in animals may have relevance for human populations, because chromosome Y polymorphisms have been linked to differences in blood pressure in 3 different populations and to high-density lipoprotein cholesterol levels in a Japanese population.<sup>73</sup>

Chromosome X is the other sex chromosome, present in 2 copies in females and 1 copy in males. Although 1 of the 2 X chromosomes is commonly inactivated in female cells by compaction into the Barr body, ~15% of genes on the inactive chromosome X escape inactivation, and another 10% is only partially inactivated.<sup>74</sup> This leaves ample room for double doses of genes carried on the X chromosome to contribute to sex-related biologic differences, but the possible impact of this phenomenon has not been investigated in detail.

### Steroids and Perinatal Programming

Beyond the role of postpubertal steroids, early life exposure to steroids may also have important consequences on late-life cardiovascular diseases. For instance, excess exposure of developing fetuses to glucocorticoids increases their blood pressure later during adult life.<sup>75</sup> A key event in early male life is the perinatal androgen surge, a period that is critical for hormonal imprinting and sex differentiation of the brain and the prostate, and possibly also other tissues, including cardiovascular ones.<sup>51,80</sup> Neonatal androgen imprinting has been reported to determine the sex-specific susceptibility of rats to cafeteria diet-induced hypertension.<sup>81</sup> Importantly, the environment contains numerous agents that may disrupt the function of steroid hormones by acting as either agonists or antagonists and, thus, disturb the normal mechanisms of perinatal imprinting.<sup>82</sup> One example is that of soybean-derived phytoestrogens (PE), that is, the isoflavones daidzein and genistein. Most commercial rodent chows are soybean derived and, thus, contain PEs at sufficiently high concentrations to affect the physiology of several organs. We, therefore, compared rats fed with standard PE-rich rodent chow with others receiving a PE-free casein-based diet to test whether the diet would have an impact on cardiac morphology and/or function. We found that the hearts of rats fed with a PE-free casein-based diet developed features of dilated eccentric hypertrophy and (unlike the hearts of their counter-

parts fed with PE-rich soy-based diet) progressed toward congestive heart failure when further challenged by volume overload.<sup>83</sup> Importantly, the effect of dietary PE was restricted to their presence in the maternal diet during perinatal development, thus demonstrating that receptors recognized by PE (presumably steroid receptors) play an important role in the perinatal programming of cardiac morphology and function. Of note, whereas some have confirmed that dietary PEs protect rats against volume overload,<sup>84</sup> others have reported different and divergent effects of dietary PEs, because a soy-based diet appears to worsen cardiac function in male transgenic mouse models of hypertrophic cardiomyopathy.<sup>85</sup> However, it is unknown whether the latter effect is related to perinatal or adult exposure to PE.

### Clinical Consequences

As summarized in the Figure, there are many ways and mechanisms by which sex can modulate the cardiac phenotype, and much remains to be learned about each of them. These pathways themselves are modulated by other factors, including the genetic background of individuals and age. The modulatory actions of sex steroids on inflammatory processes are of particular interest; because those are likely to become more prevalent as age increases, it might explain in part why the protective effects of estrogens in young women turn into adverse effects when replacement therapy is given to older postmenopausal women.<sup>68</sup>

Although the cardiovascular effects of estrogens and androgens are not uniformly positive or negative, respectively, the evidence reviewed above has led to the widely held perception that women are protected against cardiovascular diseases. This has led to the unfortunate consequence that cardiovascular diseases are less diagnosed in women and that they are less likely to receive appropriate treatment.<sup>86</sup> However, cardiovascular diseases typically manifest themselves during middle age, at a time when women are postmenopausal and even more vulnerable to cardiovascular problems than men.<sup>47</sup> One consequence of the HERS Trial is that there is currently no safe and accepted hormonal replacement therapy to reduce cardiovascular risk in postmenopausal women.<sup>82</sup> It is, therefore, critical not to minimize the diagnosis and treatment of cardiovascular disease in women. This

should also serve as an impetus to better understand how steroids exert their potential cardioprotective action and use that knowledge to design proper strategies for hormonal replacement (provided that sex steroids are the main cause of sex-specific differences). Because genetics have shown that different genes may be responsible for ventricular remodeling in males and females,<sup>69</sup> it is also possible that the efficacy of some drugs will be different in men and women. So far, differences in the use of cardiovascular drugs have been mostly justified by differences in pharmacokinetics and/or in the activity of drug-metabolizing enzymes.<sup>1,87</sup> However, because women are still underrepresented in studies on arterial hypertension and heart failure,<sup>88</sup> we still do not appreciate fully whether drugs work differently in men and women. If differences are found, a better understanding of the mechanisms of sex-specific cardiovascular differences should be helpful in the optimization of therapies according to the sex of the patients.

### Sources of Funding

This work was supported by grant HL69122 from the National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute and by grant MOP-64391 from the Canadian Institutes for Health Research.

### Disclosures

None.

### References

- Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:425-239.
- Du XJ, Fang J, Kiriazis H. Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2006;111:434-475.
- Sherer SE, Canos MR, Weinburg KP, Arora UK, Mendelsohn FO, Gersh BJ, Weissman NJ. Sex differences in coronary artery size assessed by intravascular ultrasound. *Am Heart J*. 2000;139:649-653.
- Trepamer-Boulay V, St Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res*. 2001;89:437-444.
- Pham TV, Robinson RB, Danilo P, Jr., Rosen MR. Effects of gonadal steroids on gender-related differences in transmural dispersion of L-type calcium current. *Cardiovasc Res*. 2002;53:752-762.
- Boehler KR, Volkova M, Morrell C, Garg R, Zhu Y, Margulies K, Seymour A-M, Lakatta EG. Sex- and age-dependent human transcriptome variability: implications for chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2754-2759.
- Capasso JM, Remily RM, Smith RH, Sonnenblick EH. Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res Cardiol*. 1983;78:156-171.
- Schaible TF, Scheuer J. Comparison of heart function in male and female rats. *Basic Res Cardiol*. 1984;79:402-412.
- Weinberg EO, Thienel CD, Katz SE, Bartunek J, Tajima M, Rohrbach S, Douglas PS, Lorell BH. Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:264-273.
- Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1118-1125.
- Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J Card Fail*. 2002;8:101-107.
- Litwin SF, Katz SE, Litwin CM, Morgan JP, Douglas PS. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. *Cardiology*. 1999;91:173-183.
- Cavasin MA, Sankey SS, Yu A-L, Menon S, Yang X-P. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 2003;284:H1560-H1569.
- Gao XM, Xu Q, Kiriazis H, Dart AM, Du XJ. Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. *Cardiovasc Res*. 2005;65:469-477.
- Leri A, Kapusta J, Li B, Sonnenblick EH, Beltrami CA, Anversa P, Fishman WH. Cardiomyocyte aging is gender-dependent: the local IGF-1-IGF-1R system. *Heart Dis*. 2000;2:108-115.
- Leri A, Malhotra A, Liew CC, Kapusta J, Anversa P. Telomerase activity in rat cardiac myocytes is age and gender dependent. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:385-390.
- Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest*. 2003;112:302-307.
- Du X-J. Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res*. 2004;63:510-519.
- Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nature Medicine*. 2000;6:1221-1227.
- Curt CL, Wendt IR, Kotsanas G. Effects of gender on intracellular. *Pflugers Arch*. 2001;441:709-716.
- Chen J, Petranka J, Yamamura K, London RE, Steenbergen C, Murphy E. Gender differences in sarcoplasmic reticulum calcium loading after isoproterenol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H2657-H2662.
- Weinberg EO, Mirotsou M, Gannon J, Diaz VJ, Lee RT, Pran RF. Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload. *Physiol Genomics*. 2003;12:113-127.
- Aurnemma GP, Gaasch WH. Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology*. 1995;86:310-317.
- Villani B, Campbell SE, Schneider J, Vassalli G, Chiarello M, Hess OM. Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J*. 1995;16:1410-1419.
- Krumholz HM, Larson M, Levy D. Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol*. 1993;72:310-313.
- Hayward CS, Webb CM, Collins P. Effect of sex hormones on cardiac mass. *Lancet*. 2001;357:1354-1356.
- Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gamberti SR, Anversa P. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:1068-1079.
- Malcolm DD, Burns TL, Mahoney LT, Lauer RM. Factors affecting left ventricular mass in childhood: the Muscatine Study. *Pediatrics*. 1993;92:703-709.
- Puunonen R, Jokela H, Aine R, Teisala K, Salomaki A, Uppa H. Impaired ovarian function and risk factors for atherosclerosis in premenopausal women. *Maturitas*. 1997;27:231-238.
- Grohe C, Kahlert S, Lohrbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*. 1997;416:107-112.
- Brandenburger Y, Jenkins A, Autefano DJ, Hannan RD. Increased expression of UBF is a critical determinant for rRNA synthesis and hypertrophic growth of cardiac myocytes. *FASEB J*. 2001;15:2051-2053.
- Brower GL, Gardner JD, Janicki JS. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol Cell Biochem*. 2003;251:89-95.
- Xu Y, Arenas JA, Armstrong SJ, Davidge ST. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res*. 2003;57:388-394.
- van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JPM, Janssen BJ, Wellens HJJ, Doevedans PAF. 17 $\beta$ -Estradiol attenuates the development of pressure overload hypertrophy. *Circulation*. 2001;104:1419-1423.
- Smith PJ, Omatsky O, Stewart DJ, Pieard P, Dawood F, Wen WH, Liu PP, Webb DJ, Monge JC. Effects of estrogen replacement on infarct size, cardiac remodeling, and the endothelin system after myocardial infarction in ovariectomized rats. *Circulation*. 2000;102:2983-2989.
- Hugel S, Reincke M, Stromer H, Winning J, Horn M, Dienesch C, Mora P, Schmidt HH, Alolio B, Neubauer S. Evidence against a role of physiological concentrations of estrogen in post-myocardial infarction remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:1427-1434.
- Beer S, Reineke M, Kral M, Calhes F, Stromer H, Dienesch C, Steinbauer S, Ertl G, Alolio B, Neubauer S. High-dose 17 $\beta$ -estradiol treatment prevents development of heart failure post-myocardial infarction in the rat. *Basic Res Cardiol*. 2007;102:9-18.
- van Eickels M, Patten RD, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Gostyla K, Celestin F, Grohe C, Mendelsohn ME, Karas RH. 17 $\beta$ -Beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:2084-2092.
- Pelzer T, Loza PA, Hu K, Bayer B, Dienesch C, Calvillo L, Couse JF, Korach KS, Neyses L, Ertl G. Increased mortality and aggravation of

- heart failure in estrogen receptor beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation*. 2005;111:1492-1498.
40. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, Keller PJ. 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension*. 1998;31:522-528.
  41. Stewart JA, Jr., Cashatt DO, Borck AC, Brown JE, Carver WE. 17Beta-estradiol modulation of angiotensin II-stimulated response in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:97-107.
  42. Hara M, Ono K, Hwang MW, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S, Matsumori A. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. *J Exp Med*. 2002;195:375-381.
  43. Kennedy RH, Hauer-Jensen M, Joseph J. Cardiac function in hearts isolated from a rat model deficient in mast cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H632-H637.
  44. Brower GL, Janicki JS. Pharmacologic inhibition of mast cell degranulation prevents left ventricular remodeling induced by chronic volume overload in rats. *J Card Fail*. 2005;11:548-556.
  45. Brower GL, Chaney AL, Thangaraj S, Matsubara BB, Janicki JS. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1518-H1525.
  46. Chaney AL, Gardner JD, Murray DB, Brower GL, Janicki JS. Modulation of cardiac mast cell-mediated extracellular matrix degradation by estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H316-H321.
  47. Modena MG, Muira N Jr, Aveta P, Molnari R, Rossi R. Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension*. 1999;34:1041-1046.
  48. Bahiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Thijssen V, Bronsma RJP, Grobe C, van Bilsen M, Doeievandans PAJ. 17Beta-Estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation*. 2004;109:269-276.
  49. Deschepper CF, Masciotra S, Zahabi A, Boutou-Ganache I, Picard S, Reudelhuber T. Functional alterations of the Nppa promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ Res*. 2001;88:222-227.
  50. Rossouw JE. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Rev*. 2002;53:550-557.
  51. Liu PY, Deitch AK, Handelman DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev*. 2003;24:313-340.
  52. Writing Group for the Women's Health Initiative. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*. 2002;288:321-333.
  53. Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Rev*. 2005;65:148-157.
  54. Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*. 2001;37:1199-1208.
  55. Baltatu O, Cayla C, Ihescu R, Andreev D, Bader M. Abolition of end-organ damage by antiandrogen treatment in female hypertensive transgenic rats. *Hypertension*. 2003;41:830-833.
  56. Ihescu R, Campus LA, Schlegel WP, Morano I, Baltatu O, Bader M. Androgen receptor independent cardiovascular action of the antiandrogen flutamide. *J Mol Med*. 2003;81:420-427.
  57. Zaugg M, Jamali NZ, Lucchini E, Xu W, Alam M, Shafiq SA, Siddiqui MA. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J Cell Physiol*. 2001;187:90-95.
  58. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*. 1998;98:256-261.
  59. Mendelsohn ME, Rosano GM. Hormonal regulation of normal vascular tone in males. *Circ Res*. 2003;93:1142-1145.
  60. Rhoden EI, Morgentaler A. Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med*. 2004;350:482-492.
  61. Korytkowski MT, Krug EL, Daly MA, Deriso L, Wilson JW, Winters SJ. Does androgen excess contribute to the cardiovascular risk profile in postmenopausal women with type 2 diabetes? *Metabolism*. 2005;54:1626-1631.
  62. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Denianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS, Murphy E. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H469-H476.
  63. Bahiker FA, Lips D, Meyer R, Delvaux E, Zandberg P, Janssen B, van Eys G, Grothe C, Doeievandans PA. Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1524-1530.
  64. Peter I, Shearman AM, Vasan RS, Zucker DR, Schmid CH, Demissie S, Cupples LA, Kuvitt JT, Karas RH, Mendelsohn ME, Housman DE, Benjamin EJ. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women. *Am J Hypertens*. 2005;18:1388-1395.
  65. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. 2005;308:1583-1587.
  66. Meyer MR, Haas E, Barton M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension*. 2006;47:1019-1026.
  67. Pugh PJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Heart failure as an inflammatory condition: potential role for androgens as immune modulators. *Eur J Heart Fail*. 2002;4:673-680.
  68. Stork S, van der Schouw YT, Grobbee DE, Bots ML. Estrogen, inflammation and cardiovascular risk in women: a critical appraisal. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:66-72.
  69. Llamas B, Jiang Z, Rainville M-L, Picard S, Deschepper CF. Distinct QTLs are linked to cardiac left ventricular mass in a sex-specific manner in a normotensive inbred rat intercross. *Manut Genome*. 2005;16:700-712.
  70. Souza E, Llamas B, Belanger S, Deschepper CF. A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats. *Hypertension*. 2006;47:128-133.
  71. Li Y, Kishimoto I, Santo Y, Harada M, Kuwahara K, Izumi T, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Tanimoto K, Nakagawa Y, Nakamishi M, Adachi Y, Garbers DL, Fukumizu A, Nakao K. Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase A. *Endocrinology*. 2004;145:951-958.
  72. Shearman AM, Cooper JA, Korwinski PJ, Miller GJ, Humphries SE, Ardlie KG, Jordan B, Irene K, Lunetta KL, Schuit SC, Utterlinden AG, Pols HA, Demissie S, Cupples LA, Mendelsohn ME, Levy D, Housman DE. Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. *Circ Res*. 2006;98:590-597.
  73. Charchar FJ, Tomaszewski M, Strahorn P, Champagne B, Dominicak AF. Y is there a risk to being male? *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14:163-168.
  74. Ely D, Turner M, Milsted A. Review of the Y chromosome and hypertension. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:679-691.
  75. Hoit BD, Kiatchoosakun S, Restivo J, Kirkpatrick D, Olszens K, Shao H, Pao Y-H, Nadeau JH. Naturally occurring variation in cardiovascular traits among inbred strains of mice. *Genomics*. 2003;79:679-685.
  76. Deschepper CF, Olson JL, Otis M, Gallo-Payer N. Characterization of blood pressure and morphological traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains. *J Appl Physiol*. 2004;97:369-376.
  77. Llamas B, Deschepper CF. The chromosome Y contributes to features of dilated eccentric hypertrophy in male C57BL/6J mice. *Circ Res*. 2005;97:E12.
  78. Federman DD. The biology of human sex differences. *N Engl J Med*. 2006;354:1507-1514.
  79. Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology*. 1996;64:412-418.
  80. Kudwa AF, Michopoulos V, Gatewood JD, Rissman EF. Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior. *Neuroscience*. 2006;138:921-928.
  81. Plut C, Ribiere C, Giudicelli Y, Dausse JP. Gender differences in hypothalamic tyrosine hydroxylase and alpha(2)-adrenoceptor subtype gene expression in cafeteria diet-induced hypertension and consequences of neonatal androgenization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:525-531.
  82. Tchernitchin AN, Tchernitchin NN, Menta MA, Unda C, Soto J. Imprinting: perinatal exposures cause the development of diseases during the adult age. *Acta Biol Hung*. 1999;50:425-440.
  83. Souza E, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H715-H721.
  84. Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Effects of dietary phytoestrogens on cardiac remodeling secondary to chronic volume overload in female rats. *J Appl Physiol*. 2005;99:1378-1383.
  85. Stauffer BL, Konhilas JP, Luczak ED, Leinwand LA. Soy diet worsens heart disease in mice. *J Clin Invest*. 2006;116:209-216.

## Deschepper and Llamas

## Cardiac Remodeling in Males and Females 407

86. Giardina EG. Heart disease in women. *Int J Fertil Womens Med.* 2000; 45:350-357.
87. Joehmann N, Stangl K, Garbe E, Baumann G, Stangl V. Female-specific aspects in the pharmacotherapy of chronic cardiovascular diseases. *Eur Heart J.* 2005;26:1585-1595.
88. Harris DJ, Douglas PS. Enrollment of women in cardiovascular clinical trials funded by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *N Engl J Med.* 2000;343:475-480.
89. Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Meyer R, Vetter H, Grohe C. Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett.* 2001;502:103-108.
90. Camper-Kulig D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KDR, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. Myocardial Akt activation and gender. Increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res.* 2001;88:1020-1027.
91. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X, Michael A, Haq S, Nuedling S, Grohe C, Force T, Mendelsohn ME, Karas RH, 17Beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res.* 2004; 95:692-699.
92. Nuedling S, van Eickels M, Allera A, Duwendans P, Meyer R, Vetter H, Grohe C. 17 Beta-estradiol regulates the expression of endothelin receptor type B in the heart. *Br J Pharmacol.* 2003;140:195-201.
93. Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol.* 1997;110:135-140.
94. Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Plautz WC, Xu H, Davidge ST. Estrogen improves cardiac recovery after ischemia/reperfusion by decreasing tumor necrosis factor-alpha. *Cardiovasc Res.* 2006;69:836-844.
95. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension.* 1999;33:323-328.
96. Nickeng G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stahlein A, Beckers E, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation.* 1998;97:2197-2201.

**Annexe 2: Identification and validation of loci and candidate genes linked to cardiac hypertrophy**

## 21

---

### Identification and Validation of Loci and Candidate Genes Linked to Cardiac Hypertrophy

Bastien Llamas and Christian F. Deschepper

#### Summary

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a complex quantitative trait that has a strong prognostic value for cardiovascular mortality and morbidity. Cardiac mass is determined in part by the influence of genetic loci that are known as quantitative trait loci (QTLs), the localization of which can be performed experimentally in genetic animal crosses. The present chapter outlines standard procedures for the selection of appropriate animal strains, for assessment of mode of inheritance, for characterizing the cardiac phenotype, for performing whole-genome scans, and for conducting linkage analyses. Identification of QTLs may lead to the identification of candidate genes whose roles can be further investigated in either transgenic, knockout, or pharmacologically manipulated animal models.

**Key Words:** Left ventricular hypertrophy; cardiomyocyte; complex trait; quantitative trait locus; inbred mouse strains; inbred rat strains; animal genetic crosses; recombinant inbred strains; recombinant congenic strains; simple sequence length polymorphism; linkage mapping; congenic animals; candidate gene.

#### 1. Introduction

Complex traits (also called quantitative traits) can be defined as phenotypic traits that (unlike mendelian traits) are not linked by a simple one-to-one relationship to variants of one particular gene (1). These traits are characterized by measurable phenotypic variations owing to the combined effects of genetic and environmental influences, the combination of which makes it impossible to predict *a priori* the magnitude or importance of the trait (2). Identification of

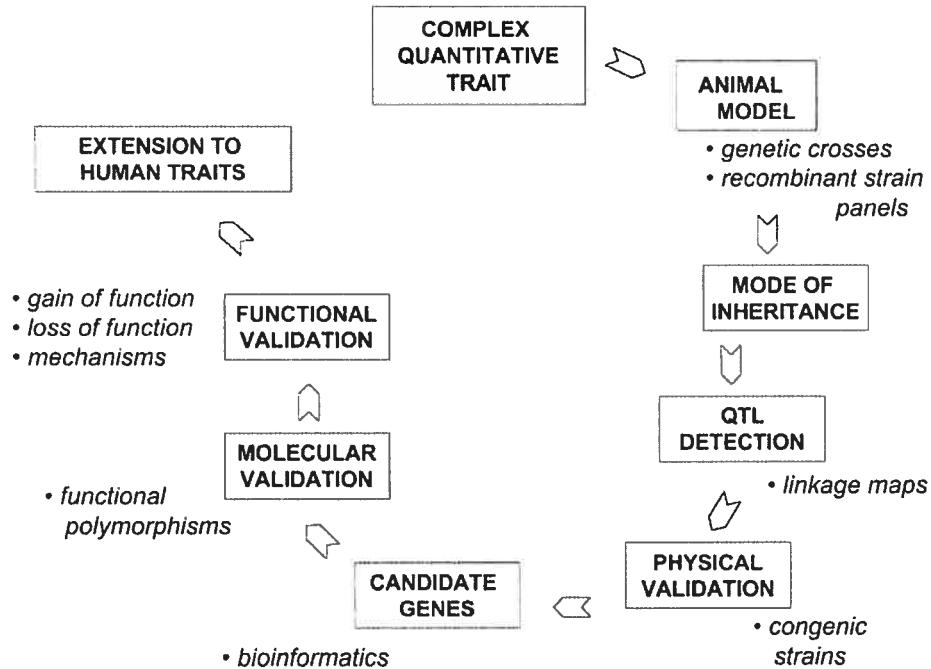
From: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 112: *Molecular Cardiology: Methods and Protocols*  
Edited by: Z. Sun © Humana Press Inc., Totowa, NJ

gene mutations linked to mendelian traits may be a long and challenging process, but the most limiting factor is the availability of informative pedigrees. Once these have been obtained, identification of the locus is highly feasible, as illustrated by the fact that the links between human syndromes and gene mutations have been established in several hundreds of examples (3). In contrast, many cardiovascular traits (including susceptibility to cardiovascular diseases) can be defined as complex traits, so that progress in the identification of genes linked to such traits has been lagging. Nonetheless, there has been in recent years an acceleration in the identification of genes linked to complex traits, in part thanks to the availability of new research tools (4,5).

A locus linked to a complex trait is called a quantitative trait locus (QTL). Since finding a QTL in humans remains a difficult task, a viable alternative is first to map QTLs in animal models with quantitative traits differences and then to use this information to identify candidate genes. The successive steps of this strategy have been outlined in Fig. 1. This chapter focuses on how QTL mapping strategies can be used to find QTLs linked to cardiac ventricular mass. In both humans and animals, the latter trait is highly variable, and its variance has been shown to be determined to a large extent by heritable factors (6,7). It is also a trait of clinical significance, because chronic left ventricular hypertrophy (LVH) constitutes one of the most powerful independent risk factors for cardiovascular morbidity and mortality (8,9), and is associated with the development of arrhythmias, heart failure and cardiac sudden death (10).

## 2. Materials

1. Inbred animal strains (*see Subheading 3.1.* and Note 1).
2. Progeny of crosses between inbred strains (*see Subheading 3.2.* and Notes 2 and 3).
3. Top-load balance.
4. Micrometer caliper.
5. DNeasy Tissue extraction kit (Qiagen, Valencia, CA), containing spin columns, 2-mL collection tubes, buffer ATL, a proteinase K solution (20 mg/mL), buffer AL, buffer AW1, and buffer AW2.
6. RNase A solution (100 mg/mL H<sub>2</sub>O).
7. 96–100% Ethanol.
8. Microcentrifuge tubes.
9. DNA elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0/0.01 mM EDTA).
10. Spectrophotometer.
11. 6.6 μM Unlabeled M13 primer (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'), in DNA elution buffer (for analysis of polymerase chain reaction [PCR] products on manual sequencing gels).
12. 3000 Ci/mimole [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).
13. T4 polynucleotide kinase (10 U/μL) and accompanying 5X stock forward buffer: 350 mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM 2-mercaptoethanol.



**Fig. 1.** Diagram of steps required for identification and validation of a quantitative trait locus (QTL) in animal models. Some of the tools and/or techniques required at each step are indicated in italics.

14. SpeedVac lyophylizer.
15. 6.6  $\mu M$  M13 primer custom-labeled (in the 5' position) with a fluorochrome dye, in DNA elution buffer (for analysis of PCR products with an automated sequencing apparatus).
16. 0.66  $\mu M$  Forward primer with a 5' M13 tail, in DNA elution buffer.
17. 6.6  $\mu M$  Reverse primer in DNA elution buffer.
18. dNTP mix: 25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP, in H<sub>2</sub>O.
19. 5 U/ $\mu L$  Taq polymerase.
20. 10X PCR buffer: 0.5 M KCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/mL gelatin.
21. PCR thermal cycler.
22. DNA sequencing equipment.
23. Personal computer and linkage analysis software (*see Subheading 3.7. and Note 4*).

### 3. Methods

#### 3.1. Selection of Parental Strains

Parental inbred strains constitute the starting point for any animal genetic study (*see Note 1*). The choice of parental strains should be guided by (1) the

presence of quantitative differences for a trait of interest, and (2) the presence of abundant genetic polymorphisms between the two strains. The selection of such strains is greatly facilitated by the availability of several on-line databases. For rats, the main resource is the Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>), which makes an inventory of information concerning genetic polymorphisms and phenotypes and maintains up-to-date links to other sites. For mice, the Jackson Laboratories provide comprehensive information on mouse strains via the Mouse Genome Informatics website (<http://www.informatics.jax.org/>) as well as the Mouse Phenome Database (<http://aretha.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rtn=docs/home>). An exhaustive list of additional rodent resources is available on the National Institutes of Health website (<http://www.nih.gov/science/models/>).

### ***3.2. Assessment of Mode of Inheritance in the Progeny of Crosses***

When using the progeny of crosses between two parental strains, a phenotypic analysis of the trait of interest (see **Subheading 3.4.**) should be performed in the F1 progeny in order to assess the mode of inheritance of the trait of interest. Assuming that the value of a given trait is either low or high in parental strains P1 and P2, respectively, the trait will be either: (1) dominant/recessive (if its value in the F1 progeny is at the same time not statistically different compared with one of the parental strains and statistically different compared with the other parental strain), or (2) codominant (if its value is intermediary between that of the trait in parental strains P1 and P2). Likewise, reciprocal crosses (in which female P1 and male P2 animals are crossed, as well as male P1 and female P2 animals) should be performed to assess whether underlying genetic determinants are on autosomes or sexual chromosomes. If the QTL is on autosomes, the magnitude of a given trait will be similar in crosses performed with either male P1 animals (and female P2 animals) or with male P2 animals (and female P1 animals). If the QTL is on sexual chromosomes, the magnitude of the trait will be different in the F1 progeny according to whether the males used in the cross originated from strain P1 or P2.

### ***3.3. Selection of a Genetic Cross***

Genetic studies are performed on animals derived from crosses between parental inbred strains. One classical way of proceeding is to perform an experimental cross between two parental inbred strains, the type of cross being selected on the mode of inheritance of the trait (see **Note 2**). Alternative models include that of recombinant inbred (RI) strains and recombinant congenic (RC) panels (see **Note 3**). For rats, there is one RI panel that has been derived

*QTLs Linked to Cardiac Hypertrophy*

325

from an F2 cross between SHR and BN inbred strains (11). This panel comprises 11 BXH (derived from crosses between female BN and male SHR) and 21 HXB strains (derived from the reciprocal cross) and constitutes the only available rat panel with at least 20 different strains. It has been used to elucidate some of the genetic determinants of LVH (12), as well as for other cardiovascular traits (including arterial pressure, dyslipidemia, and glucose metabolism) (13). For mice, several panels of RI mice are available from the Jackson Laboratories. These include 20 AKXD strains (derived from AKR and DBA/2 strains), 29 AXB/BXA strains (derived from A/J and C57Bl/6 strains), and 32 BXD strains (derived from reciprocal crosses between C57Bl/6 and DBA/2 strains). In addition, two informative panels of RC mice strains that have been developed. One is composed of 20 CcS (derived from BALB/cHeA and STS/A strains) (14). The other one comprises 37 AcB/BcA (derived from reciprocal crosses between A/J and C57Bl/6 strains) (15). Collectively, these various panels have been used so far for finding QTLs linked to diabetes, susceptibility to cancer and/or infectious agents, and behavioral traits but have not been exploited much for cardiovascular traits. Nonetheless, it has recently been found that A/J and C57Bl6/J mice exhibit differences in LV mass and morphology (16) as well as in cardiomyocyte morphology (Llamas and Deschepper, unpublished data). It might therefore be expected that the AXB/BXA RI panel will be useful for finding QTLs linked to LV mass or related traits.

**3.4. Phenotypic Characterization**

Phenotyping is an important part of a QTL search, and several principles should guide which particular phenotypic measurement should be made (*see Note 5*). The present section describes how to measure corrected mass index, arguably the most commonly used phenotype for quantification of cardiac mass (*see Note 6*). However, other measurements that should be performed include that of cardiomyocyte morphology (*see Note 7*).

1. Weigh the animal to obtain whole body weight.
2. After killing the animal, open the chest and the heart out dissect.
3. With dissection scissors, remove the atria, separate the free wall of the right ventricle (RV) from the LV (which comprises a block of tissue that contains both the septal and the free walls).
4. Dissect out the tibia, and air-dry.
5. Weigh each ventricular sample on a top-load balance.
6. Measure dry tibia length from the tip of the condyles to the tip of the medial malleolus with a micrometer caliper.
7. Divide the weight of each ventricular sample by either BW or by tibia length (*see Note 6*).

### 3.5. Isolation of Genomic DNA

Several considerations should guide the choice of tissue and the type of extraction procedure (*see Note 8*). The following protocol describes a standard procedure for isolation of DNA from spleen.

1. Collect the spleen from the animal, snap-freeze the tissue, and powder the tissue with a mortar and pestle under liquid nitrogen.
2. Transfer approx 10 mg of powdered spleen in a chilled microtube.
3. Add 180 µL of ATL buffer and 20 µL of proteinase K solution to the tube, vortex, and incubate at 55°C until complete lysis of the tissue (4–16 h).
4. Add 4 µL of RNase A solution, vortex and incubate for 2 min at room temperature.
5. Vortex for 15 s, add 200 µL of AL buffer, vortex again, and incubate at 70°C for 10 min.
6. Add 200 µL of ethanol, and vortex. A white precipitate should form.
7. Pipet the mixture into a DNeasy spin column, centrifuge for 1 min at 8000 rpm, and discard the flowthrough and collection tube.
8. Place the DNeasy spin column in a new collection tube, add 500 µL of AW1 buffer, centrifuge for 1 min at 8000 rpm, and discard the flowthrough and collection tube.
9. Repeat the same procedure with 500 µL of AW2 buffer, centrifuge for 3 min at full speed, and discard flow-through and collection tube.
10. Place the DNeasy spin column in a clean microcentrifuge tube, pipet 100–200 µL of DNA elution buffer onto the membrane at the bottom of the column, incubate for 1 min at room temperature, and recover DNA by centrifugation for 1 min at 8000 rpm.
11. Repeat step 10 in a new clean microcentrifuge tube, and combine the second eluate with the first one.
12. Quantify DNA by absorbance at 260 nm.
13. Keep stock aliquots of DNA samples in their original concentration (as obtained after elution from the DNeasy columns) at -20°C.
14. Make aliquots of genomic DNA at working dilutions (20 ng/µL of DNA elution buffer).

### 3.6. Genotyping Procedures

The most common way of genotyping animals is to amplify genomic DNA by PCR, using primers known to flank simple sequence repetitive sequences. Since the length of such sequences is highly polymorphic between strains, their amplification will reveal simple sequence length polymorphisms (SSLPs). Our PCR amplification procedure uses labelled M13 primers (*see Note 9*). If the PCR products are to be analyzed manually with a sequencing polyacrylamide gel followed by autoradiography, the M13 primer should first be labeled with [<sup>32</sup>P], as described below in Subheading 3.6.2. If the PCR products are to be analyzed with an automated sequencer, one should custom-order the M13

*QTLs Linked to Cardiac Hypertrophy*

327

primer prelabeled in 5' with a fluorochrome dye that is compatible with the detection system of the automated sequencer.

**3.6.1. Selection of Primer Pairs**

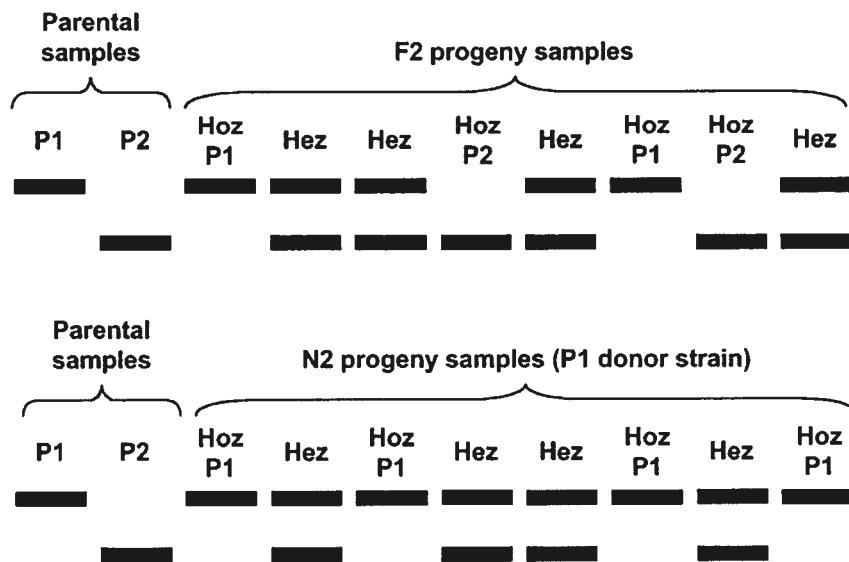
Information concerning the nucleotide sequence of primer pairs (along with information concerning the length of the amplified product in several inbred strains and the distribution of each marker on genetic and radiation hybrid maps) can be found in a variety of sites. For mice, the information is provided by the Mouse Genome Informatics website (<http://www.informatics.jax.org/>). For rats, comparable information can be found on the following websites: (<http://www-genome.wi.mit.edu/rat/public>), NIH/Arb (<http://www.niams.nih.gov/rtbc/ratbase/>), Wellcome Trust (<http://www.well.ox.ac.uk/rat mapping ressources/>), Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>), and RatMap (<http://ratmap.gen.gu.se/>). The sequence information obtained on these various sites can be used to order primer pairs from any oligonucleotide provider. Of note, the amplification procedure described below incorporates a labeled M13 primer in the PCR amplification reaction (see Note 9). This requires a 5'-tailin of all forward primers (whose sequence is defined in the databases described above) with the M13 sequence 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3' (17).

**3.6.2. [ $\beta^32$ P]-Labeling of M13 Primer (in Case of Manual Sequencing Gels)**

1. Add 8  $\mu$ L of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP in a clean microcentrifuge tube, and concentrate in a Speed-Vac lyophylizer (down to ~1  $\mu$ L).
2. Resuspend concentrated radioisotope in 30  $\mu$ L of unlabeled M13 primer solution.
3. Add 2  $\mu$ L of T4 kinase, 8  $\mu$ L of T4 forward buffer 5X stock, and 4  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (final volume 46  $\mu$ L).
4. Mix well, and incubate for 1 h at 37°C.
5. Denature for 10 min at 65°C.

**3.6.3. PCR Amplification of Genomic DNA**

1. Prepare a PCR/dNTP mix by combining 1 mL of dNTP mix, 10 mL of 10X PCR buffer, and 39 mL H<sub>2</sub>O.
2. For PCR reactions to be analyzed by manual sequencing gels, prepare a 2X primer mix by combining 10  $\mu$ L Taq polymerase, 30  $\mu$ L M13 forward primer, 48  $\mu$ L of reverse primer, 46  $\mu$ L of [ $^{32}$ P]-labeled M13 primer (as described in Subheading 3.6.2.), and adjust up to 1 mL with PCR/dNTP mix. For PCR products to be analyzed by automated sequencing apparatus, prepare a 2X primer mix by combining 10  $\mu$ L Taq polymerase, 30  $\mu$ L M13 forward primer, 48  $\mu$ L reverse primer, 24  $\mu$ L M13 primer custom-labeled with a fluorochrome dye in the 5' position, and adjust up to 1 mL with PCR/dNTP mix (see Note 10).
3. Add 20–100 ng of genomic DNA in 5  $\mu$ L of DNA elution buffer in a clean microcentrifuge tube, and mix with 5  $\mu$ L of 2X primer mix.



**Fig. 2.** Examples of electrophoresis migration profiles of an amplified microsatellite marker in F2 or N2 progenies and the relative frequency of allelic occurrence in the same populations. P1, parental 1; P2, parental 2; Hoz, homozygote; Hez, heterozygote.

4. Amplify each sample by cycling in the PCR thermal cycler (see Note 11).

#### 3.6.4. Analysis of PCR-Amplified Allele Fragments on Sequencing Devices

After amplification, the relative migration profile of each amplified allele fragment is determined by analysis with a sequencing device. Genotyping is performed by comparing the migration position of each amplified allele with that of the allele from each parental strain, as illustrated in Fig. 2. Accordingly, each genomic sample will be scored as either homozygous P1, homozygous P2, or heterozygous P1/P2 for a given marker. For each primer pair, the expected size of the corresponding amplified allele can be predicted from the information gathered in the databases given in Subheading 3.6.1. If one selects markers whose expected size differs by at least 50 bp, it is then possible to multiplex several PRC reactions and load them together in the same gel lane or capillary (typically three per lane or per capillary). When one is using an automated sequencer, the number of multiplexed reactions can be further multiplied by the number of dyes that can be detected by the corresponding apparatus.

### **3.7. Coarse Linkage Mapping**

After collecting all genotypic and phenotypic data in each animal, QTLs are detected and localized (at low resolution) by statistical calculations. The algorithms used for these calculations (18,19) have been implemented in various software applications (*see Note 4*). The analysis implies multiple steps: (1) on the basis of the distribution of SSLP markers among the population, one determines the relative position of each marker on each chromosome; the results of this procedure (called linkage mapping) can be fine tuned by comparison with the results of similar linkage maps published for mice and rats on related websites; (2) one calculates the significance of linkage of each genomic locus to the trait of interest and performs interval mapping to construct curves depicting the significance level of linkage at fixed intervals along all chromosomes; (3) one estimates the probability of linkage on the basis of appropriate significance thresholds (*see Note 12*); (4) one calculates the confidence interval for the localization of each QTL (*see Note 13*); and (5) one performs further calculations to detect possible interactions between each significant QTL (*see Note 4*). By proceeding in this manner, linkage of QTLs to heart weight has been reported in genetic populations of normotensive rats (20,21) or mice (22).

### **3.8. Physical Mapping.**

Since the first step in QTL detection relies on the statistical method, it is important to provide an independent confirmation that the physical region containing the QTL will indeed affect the phenotypic trait under investigation (2,23). This is performed by construction of so-called congenic lines. The procedure involves the transfer of a precise genetic region from one donor inbred strain into the background of another inbred recipient strains. To this end, animals from the F1 progeny are backcrossed to the recipient strain. The resulting progeny is genotyped to identify individuals that have retained the desired genetic region from the donor strain, and these individuals are further backcrossed with the recipient strain. Backcross matings over ten generations result in animals that are heterozygous for the locus of interest from the donor strain, and approx 99.9% of the remainder of the genome belongs to the recipient strain (24). The introgressed region can then be made homozygous by intercrossing, which generates the congenic strain. The latter is then used to quantitate the phenotypic trait and to confirm that it is influenced by the introgressed genetic material from the donor strain. To speed up the whole process, one can rely on the so-called speed-congenic breeding procedure (24). This procedure implies that, in addition to genotyping the progeny of each backcross for the introgressed region, one also uses additional markers to identify individuals that are most enriched for the background of the recipient strain. By proceed-

ing in this manner, one needs only four cycles of backcrossing to obtain an animal in which the genome outside the introgressed locus is approx 100% that of the recipient strain (24). Congenic rats have previously been generated to confirm physical linkage of a QTL to cardiomyocyte morphology (25).

### **3.9. Fine Mapping**

An additional utility of congenic strains is that they constitute the starting point for fine mapping of a QTL to intervals that range from 1 to 5 cM. Indeed, statistical detection of QTL has limited resolution and is not appropriate to define smaller intervals. Once a congenic strain has been generated, they can be further backcrossed into the recipient strain to generate subcongenics whose differential genetic segments are smaller than in the congenic parent and overlap to different extents. By comparing the phenotypes of several subcongenic strains and the physical boundaries of their respective introgressed region, it is then possible to identify a minimal physical interval that is shared by all subcongenics and that correlates with the trait of interest (26). Although it was usually considered that a QTL should be fine-mapped to an interval no greater than 1 cM in order to be able to identify a candidate gene, the completion of genome sequencing of several model organisms has facilitated the groundwork for identifying candidate genes. Nonetheless, it remains true that the lesser the genes in a given interval, the greater the chances are of identifying the correct causative gene.

### **3.10. Identification and Validation of Candidate Genes**

Causation is an essential concept in the field of genetics, the gold standard being the demonstration that a mutation within a given gene is linked to the trait of interest. In contrast, there is no such gold standard for genes linked to complex traits: instead, one proceeds both by elimination of false links and by accumulation of circumstantial evidence to build a case in favor of the identity of a QTL (2,3,5). To illustrate the approach, others have recently referred to a quotation from the fictional Sherlock Holmes, who stated that: "When you have eliminated all of which is impossible, then whatever remains, however improbable, must be the truth" (3). Suffice it to say, QTL identification requires a combination of flair, experimental evidence, and detective work that is beyond the scope of a simple "methods" chapter. Nonetheless, a classical approach is to test whether: (1) there are variations in the sequences of the alleles of a given gene, (2) whether such changes may lead to either changes in the function and/or the level of expression of the corresponding protein, and (3) whether such changes may cause quantitative changes in the trait of interest. The latter involves the use of animal models in which the gene of interest can be either overexpressed (in transgenic animals), inactivated (by knockout),

replaced with a variant allele (by knockin), or modulated by pharmacological means. In the case of LVH, both transgenic and knockout animals strongly support the role of at least one candidate gene whose locus coincides with that of a QTL linked to cardiac mass (27).

#### 4. Notes

1. An inbred strain is isogenic, which implies that all animals from that strain are genetically identical to each other, and all nonsexual genes come in pairs of identical homozygous alleles. In same-sex animals within such a strain, all biological variability is exclusively owing to nongenetic factors (i.e., environment and/or methodology). The genomes of the parental strains are recombined in genetic crosses that are used to identify links between chromosome loci and particular quantitative phenotypes.
2. One can distinguish two basic types of crosses: (1) intercrosses between two F1 animals (which yield F2 progeny), or (2) backcrosses of an F1 animal with one of the initial parents (which yield N2 progeny). Of note, many QTLs are linked to phenotypes in a codominant manner, whereby the quantitative value of the phenotype is linearly related to the numbers of given alleles of one particular gene. In such cases, intercrosses are advantageous because all combinations of a given genetic locus are present within the F2 progeny in a 1:2:1 distribution (homozygous P1:heterozygous:homozygous P2) (Fig. 2). In cases of genes with dominant/recessive effects, N2 populations may be advantageous as they will contain a greater proportion of genes with homozygous combinations in a 1:1 distribution (homozygous P1 or P2:heterozygous) (Fig. 2).
3. RI strains are produced by inbreeding (by repetitive brother-sister mating) separate pairs of F2 animals. Each animal contains a unique combination of 50% of the genes from each parental strain. Provided there is a sufficient number of these strains (preferably >20), they can be used collectively for QTL detection. Advantages of RI strains include the following: (1) once the genotyping of individuals from each strain is completed, it no longer needs to be repeated; (2) phenotypic traits can be quantitated by averaging the values from several genetically identical animals (which allows for greater precision); (3) phenotypic traits can be quantified at different time-points (i.e., age); and (4) one can quantitate the response of a trait to an environmental stimulus (which is not always possible in individual animals from genetic crosses). One disadvantage is that mapping low-penetrance QTLs might only be possible if sets of several hundred RI strains are used (28). RC strains are derived from two sequential backcrosses (N3) of one donor inbred strain into another recipient inbred strain. In an RC set, each strain contains different combinations of approx 12.5% of the genome of the donor strain within the background of the receiving strain. Although there are caveats about the use of RC strains for mapping studies, they are useful, as the power to detect relevant QTLs may be considerably increased compared with RI strains (28).
4. MAPMAKER/QTL was one of the first software packages developed to construct genetic maps and perform linkage analyses (37). The program was written

for either the DOS or UNIX operating systems. It has been used by many investigators but is no longer used much nowadays, in part because it has not been updated for the last 10 yr, but also because of the development of other applications that have enhanced calculation capabilities and operate in a more user-friendly manner. These new applications can all operate on a personal computer with the Windows and/or Mac operating systems, are regularly updated, are available freely through public distribution programs, allow for importation of data formatted for analysis with MAPMAKER/QTL, perform all the calculations described in the section on coarse linkage mapping, and provide tutorials along with step-by-step examples for uninitiated users. The programs may differ somewhat in terms of which specific algorithms are used for calculations and/or concerning some of the features they offer. One of the most popular packages among investigators is Map Manager QTX (<http://www.mapmanager.org>), which was developed by Kenneth Manly (38). The program has a user-friendly and flexible interface, allows for the fast and easy construction of framework genetic maps, accommodates most possible types of experimental crosses, considers all possible modes of inheritance, performs exhaustive 2D searches for interactions among QTLs, and provides both graphic and tabular text outputs.

Another powerful package (called R/QTL) was developed by Broman et al. (39). It has been implemented as an add-on package for the freely available statistical software called "R" and can be downloaded from the site <http://www.biostat.jhsph.edu/~kbroman/qtl/>. It is a bit less user-friendly than Map Manager QTX but implements a very comprehensive set of methods, and is written in such a way that the more sophisticated user can readily extend its methods. It has the additional advantages of incorporating algorithms to deal with missing data and genotyping errors and allowing graphic outputs to visualize interactions between QTLs. A third option is the QTL Cartographer program created by Basten and Zeng (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/index.php>). It does not construct linkage maps, so these have to be imported from those constructed by one of the above programs. However, it uses a different and perhaps more robust algorithm to calculate possible interactions between QTLs.

5. Since QTL detection relies on statistical procedures, it is preferable to find phenotypic measurements that allow for the greatest possible separation (ideally,  $>2$  standard deviations) between the average values in each parental strain. Although this is determined in part by the choice of parental strains, there are often different techniques to measure one given phenotypic trait, and some techniques may allow for better separation of the trait values than others (29,30). In addition, a detailed phenotypic characterization might define distinct subphenotypes that can each be linked to a different QTL. In the case of cardiac mass, it has been argued that gross heart weight falls short of what is needed to phenotype LVH and that a minimum characterization should also include at least measurements of cardiomyocyte size, characterization of ventricular morphology, and any particular pattern of change in gene expression (31). Other useful variables might include a characterization of heart morphology and function *in vivo* by echocardiography, as well as measurements of cardiomyocyte contractile function.

*QTLs Linked to Cardiac Hypertrophy*

333

6. In young adult animals, body weight is usually appropriate to correct cardiac mass and obtain an indexed value. However, sometimes body weight changes disproportionately as compared with cardiac mass. This may happen, for instance, with senescent animals or in the case of experimental conditions that might either increase (i.e., volume loading, heart failure) or decrease (i.e., muscle wasting) the body weight of the animals in a relatively short period. In such cases, a better reference value is provided by tibia length (which is proportional to the growth status of the animal and is not affected by superimposed rapid changes in body weight) (32). Although this value can be obtained by dissection of the tibia and direct measurement (as described in Subheading 3.4.), an alternative method is to obtain an X-ray image of the limbs of the animals and then measure tibia length directly on that image.
7. One common procedure to phenotype hypertrophy at the level of cardiomyocytes themselves is to measure cross-sectional area in sagittal cardiac sections (33). This procedure involves the detection of the external boundaries of cardiomyocytes by labeling them with fluorescein-conjugated wheat germ agglutinin. One can then define the area of the cross-sections of approx 100 cardiomyocytes/heart sections using a digitizer, and calculate the corresponding surface areas with a morphometry computer program. However, some have argued that precise assessments of cardiomyocyte morphology can only be performed on cardiomyocytes isolated from adult hearts (34). The latter procedure requires retrograde aortic perfusion of the hearts with a defined sequence of several warmed and oxygenated solutions. The precise description of that method may constitute a methods chapter by itself and is beyond the scope of the present one. However, several detailed protocols have been published for either rat (35) or mouse (36) hearts. The particular utility of performing such measurements to phenotype LVH in genetic models has been illustrated previously (25).
8. Genomic DNA can easily be extracted and purified from various tissues and/or plasma. Since a whole-genome scan requires the genotyping of each animal with a large number of markers, spleen is a tissue of choice because it yields relatively high quantities of DNA (5–30 µg) from as little as 10 mg of tissue. Other tissues such as liver or tail clips (when genotyping needs to be performed prior to completion of the phenotypic procedures) can be used as well but require a little more tissue (approx 25 mg). Other considerations concern the quality and stability of the genomic DNA preparation since a QTL mapping project can run over many months (and sometimes years). Although cheaper methods may be available, the genomic DNA one can obtain using the DNeasy kit is both of good quality and particularly stable. Although the DNeasy kit provides its own elution buffer (identified as AE), our protocol uses another DNA elution buffer with a lower EDTA concentration (since higher EDTA concentrations may sometimes interfere with subsequent PCR amplifications). After eluting the DNA from the DNeasy column, it can be conserved at the same concentration to prepare stock aliquots that should be kept at -20°C. Aliquots of genomic DNA at working dilutions (4–20 ng/µL) can be kept at 4°C for as long as satisfactory PCR amplifications can be obtained.

9. The whole-genome scan of the progeny of a genetic cross may typically necessitate the genotyping of approx 200 animals with 150 microsatellite markers, which amounts to at least 30,000 PCR reactions (without even taking in consideration genotyping that needs to be repeated because of technical failures). Cost-effective and high-throughput methods are therefore desirable. Our modification of the standard procedure replaces the forward primer by a mix (in an ~15:1 ratio) of a labeled M 13 primer and a forward primer that is 5'-tailed with the M13 sequence 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3' (17). This method has several advantages: (1) only one primer needs to be labeled for all primer pairs to be used, which saves time and/or expenses (especially when dye-labeled primers are used); and (2) the reaction products are much cleaner than what is obtained with original nontailed primers, which makes it possible to multiplex at least three SSLP reactions yielding products of different size.
10. The M13 primer (labeled with either [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP or a fluorochrome dye) is used at the same concentration as the reverse primer. When the M13 primer is combined with an M13-tailed forward primer (in the approximate molar ratio of ~15:1) and the cognate reverse primer, it generates an amplified allele fragment labeled with the tag carried by the M13 primer (17). The 15:1 molar ratio of the labeled M13 primer vs that of the unlabeled M13-tailed forward primer is generally appropriate for most reactions but may vary somewhat according to the true concentration of the M13-tailed forward primer. It is thus recommended to perform preliminary experiments to titrate the relative concentration of M13-tailed forward primer and find its optimal ratio. Each PCR reaction is carried out in a final volume of 10  $\mu$ L, but it is best to optimize the whole procedure for 96-well PCR plates (or equivalent tube strips), using a multichannel pipetor and a thermal cycler that accommodates 96-well plates. By proceeding in this fashion with a four-block thermal cycler, one can typically generate approx 1500 PCR reactions/day (that need to be further analyzed on a sequencing device).
11. For products ranging from 150 to 300 bp, a typical PCR amplification will comprise one initial denaturation cycle at 94°C for 90 s, followed by 30 alternating cycles of denaturation (30 s at 94°C), annealing (45 s at optimal temperature), and elongation (30 s at 72°C). The procedure is terminated by a final elongation step of 3 min at 72 °C. However, some primer pairs may require slightly different conditions.
12. Significance of linkage is calculated by assigning a score to each locus, the most popular one being the log-likelihood ratio of the data under the null hypothesis (i.e., lod score). Great care must be taken in determining which threshold should be used to determine whether a QTL is significantly linked to a given phenotype. Statistical guidelines have been published to determine (on the basis of conservative assumptions) whether linkage results obtained with several types of crosses should be considered either suggestive, significant ( $p < 0.05$ ), or highly significant ( $p < 0.001$ ) (18). More recently, others have proposed the use of permutation tests to actually calculate for the given dataset which threshold should be used to consider data as significant or highly significant (40). Such permutation tests have been implemented in all the recent software applications described above.

*QTLs Linked to Cardiac Hypertrophy*

335

13. After determining which QTLs are most significant, one should assign realistic confidence intervals for their localization. One popular method is the *LOD drop-off method*: if one considers the curve that represents graphically the evolution of linkage significance levels (expressed as lod scores) along the chromosome and defines the highest lod score as the peak, the confidence interval is thus defined by the length of chromosome that is covered by significance levels whose values are that of the peak -1 lod score. However, in the case of "weak" QTLs (i.e., those with low linkage probability), this may include most of the chromosome. Bootstrap tests provide more reliable calculations to assign confidence intervals over all QTL strengths and have been implemented in all the software applications described above.

**Acknowledgments**

This work was supported by grant HL69122 (NIH/NHLBI), by grants MOP-64391 from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), and by a Group Grant of the CIHR to the Multidisciplinary Research Group in Hypertension. We thank Ken Manly, Chris Basten, and Karl Broman for helpful comments concerning the computer applications.

**References**

1. Lander, E. S. and Schork, N. J. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**, 2037–2048.
2. Members of the Complex Trait Consortium (2003) The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nature Rev. Genetics* **4**, 911–916.
3. Page, G. P., George, V., Go, R. C., Page, P. Z., and Allison, D. B. (2003) "Are we there yet?": Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 711–719.
4. Korstanje, R. and Paige, B. (2002) From QTL to gene: the harvest begins. *Nature Genet.* **31**, 235,236.
5. Glazier, A. M., Nadeau, J. H., and Aitman, T. J. (2002) Finding genes that underlie complex traits. *Science* **298**, 2345–2349.
6. Tanase, H., Yamori, Y., Hansen, C. T., and Lovenberg, W. (1982) Heart size in inbred strains of rats. Part I. Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension* **4**, 864–872.
7. Verhaaren, H. A., Schieken, R. M., Mosteller, M., Hewitt, J. K., Eaves, L. J., and Nance, W. E. (1991) Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Wisconsin twin study). *Am. J. Cardiol.* **68**, 661–668.
8. Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B., and Castelli, W. P. (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1561–1566.
9. Devereux, R. B., de Simone, G., Ganau, A., and Roman, M. J. (1994) Left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in hypertension: stimuli, functional consequences and prognostic implications. *J. Hypertens.* **12**, S117–S127.

10. Frey, N. and Olson, E. N. (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 45–79.
11. Pravenec, M., Klir, P., Kren, V., Zicha, J., and Kunes, J. (1989) An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J. Hypertens.* **7**, 217–222.
12. Pravenec, M., et al. (1995) Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J. Clin. Invest.* **96**, 1973–1978.
13. Printz, M. P., Jirout, M., Jaworski, R., Alemayehu, A., and Kren, V. (2003) HXB/BXH rat recombinant inbred strain platform: a newly enhanced tool for cardiovascular, behavioral, and developmental genetics and genomics. *J. Appl. Physiol.* **94**, 2510–2522.
14. Moen, C. J., van der Valk, M. A., Snoek, M., van Zutphen, B. F., von Deimling, O., Hart, A. A., and Demant, P. (1991) The recombinant congenic strains: a novel genetic tool applied to the study of colon tumor development in the mouse. *Mamm. Genome* **217**–227.
15. Fortin, A., Diez, E., Rochefort, D., et al. (2001) Recombinant congenic strains derived from A/J and C57BL/6J: a tool for genetic dissection of complex traits. *Genomics* **74**, 21–35.
16. Hoit, B. D., Kiatchoosakun, S., Restivo, J., et al. (2003) Naturally occurring variation in cardiovascular traits among inbred strains of mice. *Genomics* **79**, 679–685.
17. Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., and Deschepper, C. F. (2001) M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques* **31**, 24–26.
18. Lander, E. S. and Kruglyak, L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet.* **11**, 241–247.
19. Sen, S. and Churchill, G. A. (2001) A statistical framework for quantitative trait mapping. *Genetics* **159**, 371–387.
20. Sebkhi, A., Zhao, L., Lu, L., Haley, C. S., Nunez, D. J. R., and Wilkins, M. R. (1999) Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats. Results from an F344xWKY cross. *Hypertension* **33**, 949–953.
21. Deschepper, C. F., Masciotra, S., Zahabi, A., Boutin-Ganache, I., Picard, S., and Reudelhuber, T. (2001) Functional alterations of the *Nppa* promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ. Res.* **88**, 222–227.
22. Sugiyama, F., Churchill, G. A., Li, R., et al. (2002) QTL associated with blood pressure, heart rate, and heart weight in CBA/CaJ and BalB/cJ mice. *Physiol. Genomics* **10**, 5–12.
23. Rapp, J. P. (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol. Rev.* **80**, 135–172.
24. Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., et al. (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genet.* **17**, 280–284.
25. Boutin-Ganache, I., Picard, S., and Deschepper, C. F. (2002) Distinct gene-sex interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently. *Physiol. Genomics* **12**, 61–67.

## QTLs Linked to Cardiac Hypertrophy

337

26. Olofsson, P., Holberg, J., Tordson, J., Lu, S., Akerström, B., and Holmdahl, R. (2003) Positional identification of *Ncf1* as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nature Genet.* **33**, 25–32.
27. Zahabi, A., Picard, S., Fortin, N., Reudelhuber, T. L., and Deschepper, C. F. (2003) Expression of constitutively active guanylate cyclase in cardiomyocytes inhibits the hypertrophic effects of isoproterenol and aortic constriction on mouse hearts. *J. Biol. Chem.* **278**, 47,694–47,699.
28. Demant, P. (2003) Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nature Rev. Genetics* **4**, 721–735.
29. Aitman, T. J., et al. (1998) Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nature Genet.* **16**, 197–201.
30. Deschepper, C. F., Boutin-Ganache, I., Zahabi, A., and Jiang, Z. (2002) In search of cardiovascular genes. Interactions between phenotypes and genotypes. *Hypertension* **39**, 332–336.
31. Dorn, G. W. I., Robbins, J., and Sugden, P. H. (2003) Phenotyping hypertrophy. Eschew obfuscation. *Circ. Res.* **92**, 1171–1175.
32. Yin, F. C. P., Spurgeon, H. A., Weisfeldt, M. L., and Lakatta, E. G. (1980) Mechanical properties of myocardium from hypertrophied rat hearts. *Circ. Res.* **46**, 292–300.
33. Milano, C. A., Dolber, P. C., Rockman, H. A., et al. (1994) Myocardial expression of a constitutively active  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10,109–10,113.
34. Gerdes, A. M. (1992) The use of isolated myocytes to evaluate myocardial remodeling. *Trends Cardiovasc. Med.* **2**, 152–155.
35. Mitcheson, J. S., Hancox, J. C., and Levi, A. J. (1998) Cultured adult myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc. Res.* **39**, 280–300.
36. Zhou ,Y.-Y., et al. (2000) Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am. J. Physiol.* **279**, H429–H436.
37. Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., et al. (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174–181.
38. Manly, K. F. and Olson, J. M. (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm. Genome* **10**, 327–334.
39. Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A. (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**, 889–890.
40. Doerge, R. W. and Churchill, G. A. (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* **142**, 285–294.

**Annexe 3: Page de couverture du journal *Physiological Genomics*, d'après l'article 3**



**Annexe 4: Revue éditoriale de l'article 3 écrite par Gary Churchill**

**Recombinant Inbred Strain Panels: A Tool for Systems Genetics**

Gary A. Churchill

The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME

Corresponding author:

Gary A. Churchill, Ph.D.  
600 Main Street  
Bar Harbor, Maine 04609  
207-288-6189  


Systems biology is "the study of the interactions between the components of *biological systems*, and how these interactions give rise to the function and behavior of that system" (ref. Wikipedia). Ideally the practice of systems biology is a cyclical process that alternates between stages of mathematical modeling and experimentation. A model is a quantitative description of the system. By solving the model, the "forward problem", we can make predictions about the behavior of the system that can be verified experimentally. Based on the outcome of the experiment, the model may be refined and the cycle begins again. In essence, systems biology is an approach to solving an "inverse problem": given observations of a system in response to perturbations we attempt to deduce or infer the functional properties of the system. Inverse problems are notoriously hard to solve and the key to success is to choose a set of perturbations that provides good discrimination among alternative models. When the perturbations in a systems biology experiment are genetic variants, we refer to the approach as systems genetics. Llamas et al. in this issue of *Physiological Genomics* provide us with a simple but compelling demonstration of systems genetics in practice.

For sake of illustration, consider a simplified model of the "system" of blood pressure regulation. In our initial model, blood pressure (BP) is the product of cardiac output (CO) and peripheral resistance (PR). Thus  $BP = CO * PR$ . We know that genetic factors affect blood pressure and would like to extend the simple model by adding genetic effects on cardiac output, peripheral resistance, or both. We are able to measure blood pressure and cardiac output but cannot measure both on the same animal. Direct measurements of peripheral resistance are not available to us. Fortunately we have access to a panel of recombinant inbred mouse strains (RIs) with a wide range of blood

pressures. We measure BP and CO on different, but genetically identical animals and study the relationships of the measured traits at the level of the strain means. Moreover the recombinant inbred panel has been densely genotyped and extensively phenotyped by other researchers, opening the possibility of extending our "system" to include other measured traits. We can also map the genetic loci (QTL) associated with blood pressure, at no extra cost.

Suppose that we have mapped two QTL. Both are associated with blood pressure but only one QTL (Q1) has an effect on cardiac output. According to our model, the other QTL must act on blood pressure through the peripheral resistance pathway. The model is illustrated graphically in **Figure 1**. The estimated allelic effects provide quantitative parameters with which one can make predictions. The effect of a "B" genotype at Q1 is to reduce cardiac output by a factor of 0.9 relative to the "A" genotype, with a corresponding decrease in blood pressure. The "B" genotype at Q2, acting through its effect on peripheral resistance, increases blood pressure by 33%. The model gives the following quantitative predictions for the two-locus genetic system:

Q1	Q2	BP
A	B	90
A	A	100
B	B	120
B	A	133

We can confirm (or not) that the parental strains of the RI panel have the predicted blood pressures but what about the other combinations? Certainly they exist in the RI panel,

but these are the same animals that we used to estimate the model and thus they do not provide an independent test of our prediction. Again we are fortunate to have access to a set of chromosome substitution lines<sup>2</sup> between the parental strains A and B. Our prediction is that B.A\_Q1 will have blood pressure lower than the low parental strain and that B.A\_Q2 will have higher blood pressure than the high parental strain. This example illustrates the phenomenon of transgressive segregation that is often seen in QTL studies. In this case, the A allele at Q1 is associated with high blood pressure despite the fact that it derives from the parental strain with lower blood pressure.

Next we carry out the experiment. If we are able to validate our predictions there is some small comfort to be had in the consistency between our model and the data. But if we are lucky, our prediction will fail and this will force us to reconsider our initial model. For example suppose that the cardiac output has increased by 10% as predicted in the B.A\_Q1 animals but their blood pressure is only 120, similar to the B strain. One plausible explanation is a feedback loop. Perhaps high blood pressure induces a physiological mechanism that lowers peripheral resistance in order to maintain a normal blood pressure. Homeostatic mechanisms are common features of biological systems. This would lead us to modify our model (red arrow in Figure 1) and to devise a new experiment, perhaps using genetic perturbations, to test the new model.

As in our simple example, Llamas et al., used a recombinant inbred strain panel to address a question about the relationship between two quantities, cardiomyocyte size (CMS) and left ventricular mass (LVM). Very roughly, we can think of LVM as the product of CMS and number of cardiomyocytes plus a bit of other stuff that makes up the

left ventricle of the heart. Both LVM and CMS are measurable quantities, but it is not possible to measure both on the same animal.

Llamas et al., demonstrate how complex traits genetic can yield to careful statistical analysis. They find that the CMS associated QTL are sex specific and that males from reciprocal F1 crosses are quite different. Further analysis reveals that this Y chromosome effect is mediated by epistatic interactions with two different autosomal loci. To achieve this insight, they employed an interacting covariate in their genome scan analysis. The result is a rich and accurate quantitative model of the genetic architecture of CMS. Next, they utilize a complementary resource, reciprocal B.AY and A.BY consomic strains, to confirm the Y chromosome effect.

The LVM trait presents some interesting twists as well. The single, major QTL for LVM has a paradoxical effect. The parent with lower LVM contributes the high allele. The paradox is easily explained. The allele effects in my fictional model of blood pressure regulation are similar to the QTL effects estimated by Llamas et al. The observation of a transgressive QTL tells us something about the system. Another system component, genetic or physiological, is present and acting to counter the direct effect of this QTL. There is something that is still perplexing about the system. We expect LVM to be correlated with CMS and it is (Figure 2). It follows that the QTL with direct effects on CMS should have an indirect effect on LVM. This isn't the case. The CMS QTL are quite distinct from the LVM QTL and there is not even a hint of shared effect to be seen in the genome scans (Llamas et al., Figure 2). Llamas et al, have demonstrated that two distinct pathways are involved in the genetic regulation of LVM, but not everything is neatly tied up. Perhaps we could look at CMS and LVM in the reciprocal consomic lines

B.A13 and A.B13, the site of the LVM QTL, to obtain additional information about this system.

RI strain panels provide an abundance of natural genetic variants that can serve as perturbations for systems genetics studies. Natural genetic variation is qualitatively different from engineered variation. Most natural variants are not loss of function. They tend to be subtle changes in regulation or amino acid substitutions that are compatible with normal function. Yet the phenotypic diversity that arises from mixing mouse genomes can be extreme and unpredictable. Experiments that simultaneously perturb multiple factors can be much more efficient than approaches that perturb one factor at a time, but they still require a reasonable sample size to achieve effective results. .

Despite the success exemplified by Llamas et al, existing recombinant inbred mouse strain panels are too small to tackle the complex systems of genetic and physiological regulation that underlie most common disease phenotypes. In addition, existing RI panels capture only a fraction of the genetic diversity that exists in mice and there are substantial blind spots due to shared ancestry among strains<sup>3</sup>. Larger and more diverse RI strain panels are being developed<sup>1</sup> and these will enable genetic experiments on the grander scale that we typically associate with systems biology. Recombinant inbred strain panels can provide insights into biological processes and mechanisms that go well beyond the mapping of QTLs. This proof of principle study provides a glimpse into what systems genetics can achieve.

#### References

1. Churchill GA, et al (2004). The collaborative cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nature Genetics* 36:1133-1137.

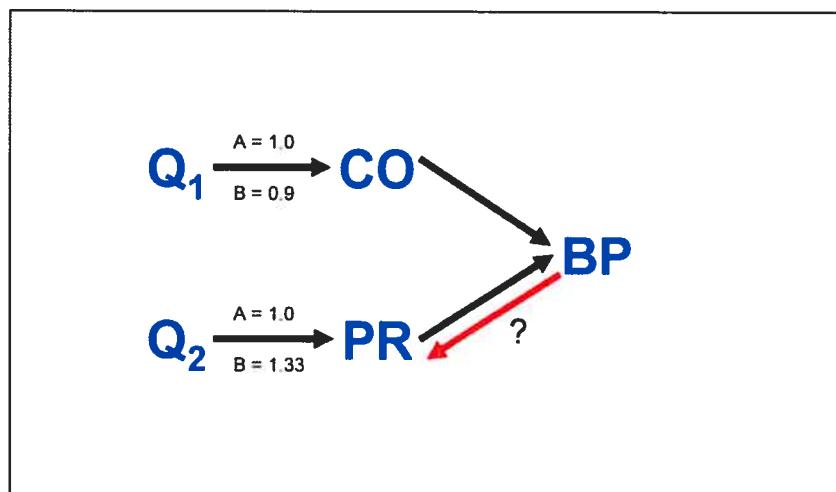
2. Singer JB, Hill AE, Burrage LC, Olszens KR, Song J, Justice M, O'Brien WE, Conti DV, Witte JS, Lander ES, Nadeau JH (2004). Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice. *Science* 304: 445-448.
3. Yang H, Bell TA, Churchill GA, Pardo-Manuel de Villena F (2007). On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nature Genetics*, doi:10.1038/ng2087

**Figure Legends**

Figure 1: A graphical model of blood pressure (BP) regulation showing blood pressure as the product of cardiac output (CO) and peripheral resistance (PR) and two QTL (Q1 and Q2) with allelic effects as indicated.

Figure 2: Scatter plot of cardiomyocyte (CM) length by normalized left ventricular mass, data from Llamas et al. Red and blue points indicate female and male data, respectively.

**Figure 1**



**Figure 2**

