

Université de Montréal

**Évaluation neurobiologique  
des souris spontanément hypertendues :  
Du vieillissement à la génomique comparative**

par

Stéphane Thifault

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Sciences Neurologiques

Décembre, 2007

© Stéphane Thifault, 2007

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Évaluation neurobiologique des souris spontanément hypertendues:  
du vieillissement à la génomique comparative

présentée par :  
Stéphane Thifault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent Castellucci, président-rapporteur  
Pavel Hamet, directeur de recherche  
Robert Lalonde, co-directeur  
Roger Godbout, membre du jury  
Guy Drolet, examinateur externe  
John Kalaska, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le but de cette thèse est premièrement d'évaluer l'effet du vieillissement sur les fonctions psychomotrices des souches de souris sélectionnées génétiquement en fonction de leur tension artérielle (TA); deuxièmement, de localiser les déterminants génétiques des phénotypes psychophysiologiques à partir de souches recombinantes congéniques (RCS). Ces travaux ont mené à la publication de 4 articles. Le premier article décrit l'évaluation des fonctions psychomotrices des souches avec une tension artérielle élevée (HBP), basse (LBP) et normale (NBP). La performance aux épreuves d'exploration, d'habiletés motrices et d'apprentissage spatial, a été mesurée sur deux cohortes âgées respectivement de 12 mois et de trois mois. Indépendamment de l'âge, les HBPs sont hyperactives dans l'open-field (OF), mais pas dans le test d'exploration de trous. Inversement, les LBP explorent moins d'espaces que les NBP et, à trois mois seulement, sont hypoactives dans l'OF. Par ailleurs, les HBPs et les LBP présentent des déficits précoces de coordination motrice et des fonctions visuo-motrices. Le second article concerne l'évaluation longitudinale de la coordination motrice, de l'anxiété et de l'apprentissage spatial des souches HBP, LBP et NBP, à l'âge de deux mois et de 12 mois. Le vieillissement accentue l'hyperactivité des HBPs dans l'OF. Par contre, l'hypoactivité des souris LBP est détectable seulement à l'âge de deux mois. Indépendamment de l'âge, les souris HBP et LBP montrent une perception réduite du danger dans l'épreuve d'anxiété et des dysfonctions visuo-motrices au labyrinthe aquatique. Enfin, des déficits précoces de coordination motrice se manifestent seulement chez les HBPs. Il reste à déterminer si les déficits observés sont liés à des déterminants génétiques indépendants ou secondaires aux altérations de la tension artérielle. Le troisième article présente la comparaison entre les souches consanguines A/J et C57Bl/6J (B6) aux épreuves de l'OF, de la planche à trous, du labyrinthe aquatique et du cintre (coordination motrice). Les B6 explorent davantage l'OF et la planche à trous. Les B6 sont moins rapides sur le cintre, mais supérieurs aux A/J dans le labyrinthe aquatique, avec une plate-forme invisible ou visible. Ces résultats démontrent l'implication de déterminants génétiques.

Cette thèse se termine par un quatrième article sur la localisation des déterminants génétiques de la susceptibilité au stress dans les RCS, dérivées de A/J et B6, et présentant un agencement spécifique de 12.5% du génome. La réactivité émotionnelle est évaluée dans l'OF et le *plus-maze*; la réponse de stress est mesurée par radio télémétrie de la température interne pendant le stress d'immobilisation (SI) sous diète régulière et riche en sel; l'excrétion des électrolytes urinaires est dosée après 24 heures de diète salée. Les *loci* les plus significatifs sont situés dans les régions suivantes: de l'émotivité dans l'OF (*Emo1*) sur le chr. 1 (LOD=4.6) correspondant à la région homologue impliquée dans la cohorte d'hypertension familiale du Saguenay; de la dopa décarboxylase (*ddc*) sur le chr. 11 pour l'émergence du *plus-maze* (LOD=4.7); de la protéine liant l'endotoxine (*lbp*) sur le chr. 2 pour l'hypothermie initiale en réponse au SI (LOD=4); et de HSP90 sur le chr. 12 pour l'excrétion de Ca<sup>++</sup> (LOD=4.6). Des banques de données sont ensuite interrogées pour recenser les polymorphismes des régions régulatrices ou codantes des gènes candidats chez les souches ancestrales A/J et B6, dont les séquences sont disponibles pour le génome entier. Des utilitaires web permettent de dévoiler les changements dans la structure secondaire de l'ARNm, l'interférence avec des microARN ou avec d'autres motifs de liaison. Plusieurs SNPs fonctionnels ont été identifiés pour le QTL du chr. 1, particulièrement dans les éléments de régulation; ceux-ci impliquant des gènes reliés avec les réponses inflammatoire/immunitaire ou avec le système cardiovasculaire. La quantification par la PCR confirme une régulation à la baisse d'*atp1a2* dans le cœur et le cerveau des souches susceptibles à l'anxiété. Ces résultats confirment l'intrication des altérations de la susceptibilité au stress et de la régulation de la TA.

**Mots-clés** : anxiété, exploration, coordination motrice, apprentissage spatial, vieillissement, souches recombinantes congéniques, *Locus* de trait quantitatif (*QTL*), hypertension, gènes candidats, polymorphismes sur un nucléotide.

## **Abstract**

Our studies in this thesis, which led to 4 publications, are divided in two parts. The first part describes the neuropsychological effects of aging in strains of mice genetically selected for high (HBP), low (LBP) or normal blood pressure (NBP). The second part focuses on the genetic determinants of these neuropsychological phenotypes in recombinant congenic strains (RCS) of mice. The first manuscript compares HBP or LBP mice to normotensive controls in tests of exploration, motor coordination, and spatial learning at two age levels: 3 and 12 months. At either age, HBPs were hyperactive in an open field (OF) but not in terms of hole-poking responses. On the contrary, LBPs were hypoactive in the OF and in the hole-board, with the effect on the former measure being limited to the younger cohort. In either cohort, HBP and LBP mice were deficient in subtle aspects of motor coordination, and visuomotor function. These strains may serve as experimental models for the evaluation of beneficial early antihypertensive or antihypotensive treatments on brain function. The second study uses a longitudinal design to compare either HBP or LBP mice to normotensive controls at 2 and 12 months of age for motor coordination, anxiety, and spatial learning. Hyperactivity of HBPs in the OF increased with aging; whereas LBP mice were hypoactive only at 2 months of age. At both age, HBP and LBP mice displayed reduced levels of anxiety in the elevated plus-maze (EPM), abnormal coordination and visuomotor guidance. It remains to determine if these strain-, age-, and test-specific abnormalities are genetically related or secondary to uncontrolled hypertension or hypotension. The following article compares the C57BL/6J (B6) to the A/J inbred mouse strain in exploration of the OF and the hole-board, in the coat-hanger coordination test, and in spatial learning of a water maze. B6 mice displayed a higher number of segment crossings in the open-field and of hole-poking responses than A/J mice. By contrast to their hypo activity, A/J strain were faster in the coat-hanger motor test, but deficient in the submerged but also in the visible platform version of the water maze. These results indicate

the considerable potential of genetic models derived from B6 and A/J mice for discerning the determinants of several behavioural phenotypes.

In the last manuscript, the genomic loci bearing stress-related phenotypes were dissected by genome wide analysis of linkage in the recombinant congenic strains (RCS), resulting from a cross of B6 and A/J progenitors, each strain bearing 12.5% of specific parts of one progenitor on the background of the other. Adult male mice from 14 A/J and 22 B6 background lines were evaluated for emotional reactivity in the OF and the EPM. Core temperature was monitored by radio-telemetry during immobilization (IM), under standard and salt-enriched diets. In addition, urinary electrolytes were measured. The highest LOD scores strengthen the evidence for a previously reported locus for emotionality in the open-field on Chr 1 (LOD=4.6), in the *Ddc* region encoding dopa decarboxylase, on Chr 11 in the EPM (LOD=4.7), near *Lbp* (lipopolysaccharide binding protein), on Chr 2 for initial hypothermia during IM (LOD=4), as well as in the region of *Hspca*, encoding heat shock protein 1 alpha (48.0 cM) on Chr 12 for  $\text{Ca}^{++}$  excretion after a 24 hr-salt load (LOD=4.6). RCS stress QTL overlapped with several candidate loci for cardiovascular disease. *In silico* evidence of functional polymorphisms by comparative sequence analysis of progenitor strains assisted to ascertain this convergence, then further tested using quantitative PCR for relevant genes mRNA. The anxious BcA70 strain showed down regulation of the *Atp1a2* gene expression in the heart ( $P < 0.001$ ) and brain ( $P < 0.05$ ) compared to its parental B6 strain, compatible with the enhanced emotionality described in knock out animals for this gene, also involved in the salt-sensitive component of hypertension. Functional polymorphisms in regulatory elements of candidate genes of the cardiovascular / inflammatory / immune systems support the hypothesis of genetically-altered environmental susceptibility in cardiovascular disease development.

**Keywords:** anxiety, exploration, motor coordination, spatial learning, aging, recombinant congenic strains, Quantitative Trait Loci (QTL), hypertension, candidate genes, single nucleotide polymorphisms.

## Table des matières

Titre de la thèse.....	i
Présentation des jurys.....	ii
Résumé en français.....	iii
Résumé en anglais.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xv
Liste des sigles et abréviations.....	xv
Dédicace.....	xix
Remerciements.....	xx
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1. Revue de la littérature.....	1
1.1.1. Définitions : hypertension artérielle et vieillissement.....	1
1.1.2. Principaux mécanismes de régulation de la TA.....	2
1.1.3. Démence et hypertension : conclusions des études cliniques.....	4
1.1.4. Démence et hypertension: modèles expérimentaux des rongeurs.....	7
1.1.5. Composante génétique de l’HTA essentielle.....	8
1.1.6. Génétique quantitative des traits complexes.....	9
1.1.7. Modèles de la génétique expérimentale.....	12
1.1.8. Génétique de l’hypertension.....	15
1.1.9. Génétique de l’anxiété: modèles chez les rongeurs.....	16
1.1.10. Stress, HTA expérimentale et physiopathologie.....	21
1.1.11. <i>CRF</i> et autres déterminants majeurs de la réactivité émotionnelle.....	23
1.1.12. La susceptibilité au stress comme variable intermédiaire associée à l’HTA essentielle.....	24
1.1.13. Effet de la diète salée sur la réponse au stress : un exemple d’interaction gènes/environnement en génomique comparative.....	25

1.2.	Fondements méthodologiques.....	30
1.2.1.	Modèles animaux génétiquement hypertendus .....	30
1.2.2.	Pertinence des modèles dérivés des souches consanguines A/J et C57Bl/6J pour l'étude des phénotypes liés au stress.....	30
1.2.3.	Outils biostatistiques de détection des QTL.....	33
1.2.4.	Outils bio-informatiques pour la détection de polymorphismes fonctionnels	34
1.2.5.	Méthode de quantification de l'analyse par amplification à la PCR.....	36
1.3.	Énoncé des objectifs de chaque article de la thèse.....	37
Chapitre 2.	ARTICLE 1 ÉVALUATION NEUROBIOLOGIQUE DES SOURIS GÉNÉTIQUEMENT HYPER/HYPOTENDUES .....	39
2.1.	Neurobehavioral Evaluation of High Blood Pressure and Low Blood Pressure Mice	39
2.2.	Abstract .....	40
2.3.	Introduction.....	41
2.4.	Method .....	43
2.4.1.	Animals .....	43
2.4.2.	Apparatus .....	43
2.4.3.	Procedure.....	44
2.4.4.	Statistical analyses .....	46
2.5.	Results.....	47
2.5.1.	Spontaneous alternation .....	47
2.5.2.	Inclined grid .....	47
2.5.3.	Coat-hanger .....	48
2.5.4.	Round bridge.....	48
2.5.5.	Motor activity.....	49
2.5.6.	Hole poking.....	49
2.5.7.	Water maze.....	50



2.6.	Discussion .....	51
2.7.	Acknowledgments.....	54
2.8.	References .....	55
Chapitre 3.	ARTICLE 2 ÉTUDE LONGITUDINALE DE L'ACTIVITÉ, LA COORDINATION MOTRICE, L'ANXIÉTÉ ET L'APPRENTISSAGE SPATIAL DES SOURIS GÉNÉTIQUEMENT HYPER/HYPOTENDUES .....	68
3.1.	Longitudinal analysis of motor activity and coordination, anxiety, and spatial learning in mice with altered blood pressure .....	68
3.2.	Abstract .....	69
3.3.	Introduction.....	70
3.4.	Materials and methods .....	71
3.4.1.	Animals .....	71
3.4.2.	Apparatus .....	71
3.4.3.	Procedure.....	72
3.4.4.	Statistical analyses .....	73
3.5.	Results.....	74
3.5.1.	Motor activity.....	74
3.5.2.	Coat-hanger .....	74
3.5.3.	Elevated +-maze.....	75
3.5.4.	Water maze.....	76
3.6.	Discussion .....	77
3.7.	Acknowledgments.....	79
3.8.	References .....	79
Chapitre 4.	ARTICLE 3 ACTIVITÉ ET COORDINATION MOTRICE, VISITES AUX TROUS ET APPRENTISSAGE SPATIAL DES SOUCHES DE SOURIS CONSANGUINES A/J ET C57BL/6J.....	90
4.1.	Comparisons between C57BL/6J and A/J mice in motor activity and coordination, hole-poking, and spatial learning.....	90

4.2.	Abstract .....	91
4.3.	Introduction .....	92
4.4.	Materials and Methods .....	93
4.4.1.	Animals .....	93
4.4.2.	Apparatus .....	93
4.4.3.	Procedure.....	94
4.4.4.	Statistical analyses .....	95
4.5.	Results.....	95
4.5.1.	Motor coordination.....	95
4.5.2.	Motor activity.....	96
4.5.3.	Spatial learning.....	96
4.5.4.	Hole-poking .....	96
4.6.	Discussion .....	97
4.7.	Acknowledgments.....	99
4.8.	References .....	99
Chapitre 5.	ARTICLE 4 QUÊTE DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE PHÉNOTYPES DE STRESS DANS LES SOUCHES DE SOURIS RECOMBINANTES CONGÉNIQUES AcB/BcA .....	110
5.1.	Genetic determinants of emotionality and stress response in AcB/BcA recombinant congenic mice and <i>in silico</i> evidence of convergence with cardiovascular candidate genes .....	110
5.2.	Abstract .....	111
5.3.	Introduction.....	112
5.4.	Results.....	113
5.4.1.	Exploration of environmental stimuli. ....	113
5.4.2.	Body temperature stress response under normal and increased salt diet. ...	115
5.4.3.	Circadian rhythm of baseline temperature before and during a high-salt diet.	
	116	

5.4.4.	Urinary volume and electrolytes after 24 hr of a high-salt diet. ....	116
5.4.5.	In silico exploration of putative candidate genes.....	117
5.4.6.	Quantitative real-time (RT) PCR validation of differential gene expression. 117	
5.5.	Discussion .....	117
5.6.	Materials and methods .....	123
5.6.1.	Animals. ....	123
5.6.2.	Exploration of environmental stimuli. ....	123
5.6.3.	Radio telemetry measures of stress-induced hypothermia before and after a high-salt diet.....	124
5.6.4.	Urinary volume and electrolytes with a salt diet.....	124
5.6.5.	Genotyping.....	125
5.6.6.	Statistical analyses. ....	125
5.6.7.	In silico exploration of putative candidate genes.....	126
5.6.8.	Preparation of total RNA and RT-PCR.....	127
5.7.	Acknowledgments.....	127
5.8.	References.....	129
5.9.	Abbreviations .....	151
Chapitre 6.	Discussion .....	152
6.1.1.	Retour sur chacune des publications : du vieillissement à la génomique ..	152
6.1.2.	QTL de la réactivité émotionnelle dans l' <i>open-field</i> : co-ségrégation ou pléiotropisme avec l'hypertension .....	163
6.1.3.	Limites et perspectives de l'approche in silico .....	165
6.1.4.	Vers une définition Lamarckiste du stress ? .....	167
Chapitre 7.	Conclusion .....	169
Appendice 2.	Loci de traits psychomoteurs dans les RCS .....	204
Appendice 3.	Article de collaboration (résumé seulement). IMAGERIE DE L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DANS LE CERVEAU DES SOURIS GÉNÉTIQUEMENT	

HYPERTENDUES À L'AIDE DU MARQUAGE DE LA CYTOCHROME OXIDASE.  
207

Appendice 4. CURRICULUM VITÆ ..... 209

## Liste des tableaux

### CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Tableau I. QTL sur le trait d'anxiété chez la souris ..... 19

Tableau II. QTL de stress pertinents pour l'étude de l'HTA essentielle ..... 27

### CHAPITRE 2. ARTICLE 1

Table 1. Mean Two-Trial Spontaneous Alternation Percentage and Mean (S.E.) Choice Latencies Summed over Days in a T-maze ..... 59

Table 2. Mean (S.E.) Latencies in S before Turning, Reaching the Top, and Falling Summed over Days on an Inclined Grid ..... 60

Table 3. Mean (S.E.) Latencies in S before Reaching the Diagonal Bar according to 2-, 3-, or 4-Paw Criteria, Latencies before Falling and Frequencies of Reaching the Half-Way Point or of the Top of the Bar on the Coat-Hanger..... 61

Table 4. Mean (S.E.) Quadrant Entries and Escape Latencies in S during Retention of Invisible Platform and Visible Platform Training..... 62

### CHAPITRE 3. ARTICLE 2

Table 1. Mean  $\pm$  S.E.M. MT and latencies before falling in s of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the coat-hanger test..... 84

Table 2. Mean  $\pm$  S.E.M. entries and duration (s) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the elevated +-maze test ..... 85

Table 3. Mean  $\pm$  S.E.M. latencies (s) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the elevated +-maze test ..... 86

Table 4. Mean  $\pm$  S.E.M quadrant entries and escape latencies (s) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age during the retention test and the visible platform test ..... 87

**CHAPITRE 5. ARTICLE 3**

Table 1. Mean $\pm$ S.E.M. movement times and latencies before falling in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice in the coat-hanger test .....	105
---	-----

**CHAPITRE 6. ARTICLE 4**

Table 1. Significant stress-related QTL with relevant candidate genes .....	140
Table 2. Significant diet-induced QTL after 24 hr on a high-salt diet .....	142
Table 3. Candidate genes within the 171-174 Mbp region of Chr 1 .....	144

**CHAPITRE 7. DISCUSSION**

Tableau III. Exemples de QTL de stress dans les RCS convergeant vers des loci associés à l'hypertension .....	156
Tableau IV. Matrice de corrélation de Pearson entre les phénotypes de stress .....	161

**Appendice 2.**

Tableau V. Loci significatifs des RCS aux épreuves motrice et visuo-spatiale .....	205
--	-----

## Liste des figures

### CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Figure 1. Schéma des croisements nécessaires à la production des RCS ..... 32

### CHAPITRE 2. ARTICLE 1

Figure 1. Latencies before falling in s and segments (means and S.E.) traversed on the round bridge in aged and young cohorts..... 63

Figure 2. Horizontal motor activity (means and S.E.) of aged and young cohorts ..... 64

Figure 3. Hole poking (means and S.E.) in the periphery and in the center of the hole-board of aged and young cohorts..... 65

Figure 4. Quadrant entries and escape latencies in s (means and S.E.) in the hidden platform condition of the water maze in young cohorts..... 66

Figure 5. Quadrant entries and escape latencies in s (means and S.E.) in the hidden platform condition of the water maze in aged cohorts..... 67

### CHAPITRE 3. ARTICLE 2

Figure 1. Horizontal motor activity (means  $\pm$  S.E.M.) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age ..... 88

Figure 2. Mean  $\pm$  S.E.M. values of quadrant entries and escape latencies in s of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the hidden platform condition of the water maze ..... 89

### CHAPITRE 5. ARTICLE 3

Figure 1. Mean  $\pm$  S.E.M. quadrant entries and escape latencies in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice in the hidden platform condition of the Morris water maze ..... 106

Figure 2. Mean  $\pm$  S.E.M. quadrant entries and escape latencies in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice during long-term retention of the Morris water maze ..... 107

Figure 3. Mean  $\pm$  S.E.M. quadrant entries and escape latencies in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice during the visible platform condition of the Morris water maze ..... 108

Figure 4. Mean $\pm$ S.E.M. number of hole-pokes in the periphery and in the center of the hole-board by C57BL/6J (B6) and A/J mice .....	109
---	-----

#### **CHAPITRE 6. ARTICLE 4**

Figure 1. Stress-related strain distribution pattern of progenitors and all 36 RCS .....	146
--	-----

Figure 2. Stress-related and metabolic SDP of progenitors and all 36 RCS on a high-salt diet .....	147
--	-----

Figure 3. Comparative genomic view of the mouse chromosome 1 region bearing QTL identified in this study .....	148
--	-----

Figure 4. <i>Atp1a2</i> gene expression profiling in the brain, heart and kidney by RT-PCR ..	149
---	-----

Figure 5. Integrative scheme of our step-wise approach aimed at narrowing down QTL to QTG .....	150
---	-----

#### **CHAPITRE 7. DISCUSSION**

Figure 2. Diagramme illustrant les connexions entre les structures cérébrales impliquées dans le contrôle du système nerveux autonome .....	154
---	-----

#### **APPENDICE 1.**

Supplementary Fig. 1 (article 5). Illustrations of secondary structure changes in <i>Crp</i> mRNA between A/J and B6 haplotypes .....	202
---	-----



## Liste des sigles et abréviations

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine  
 ACTH : hormone adrénocorticotrophine  
 ADN : Acide désoxyribonucléique  
 ANF : facteur natriurétique auriculaire ou ANP  
 ANOVA : Analyses de variance  
 ANP : *atrial natriuretic peptide*  
 ATP-ase : transporteur polypeptidique -adenosinetriphosphatase  
 AVC : accidents vasculaires cérébraux  
 B6 : souche consanguine C57Bl/6J  
 BC : *backcross* ou rétro-croisement  
 BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*  
 BP : blood pressure  
 Ca<sup>++</sup> : calcium  
 cM : centiMorgan  
 CO : cytochrome oxydase  
 Chr. : chromosome  
 CHUM : Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
 CREB : protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc  
 CRF : facteur de relâche de la corticotrophine  
 CV : cardiovasculaire  
 Emo : locus de la réactivité émotionnelle ou *emotionality*  
 EPM : *elevated plus-maze* ou *+maze*  
 ERK : *extracellular signal-regulated kinases*  
 GABA : acide gamma-amino-butyrique  
 GCA : récepteur guanylyl cyclase de l'ANP (gène *npr1*)  
 Gnb : guanine nucleotide binding protein  
 GR : récepteur des glucocorticoïdes  
 GTP : Guanosine-5'-triphosphate  
 H2 : hérabilité  
 HBP : lignée de souris *high blood pressure* avec hypertension artérielle  
 HHS : axe hypothalamo-hypophyso surrénalien  
 HSP: *heat-shock protein*  
 HSTF : facteur de transcription des Hsp  
 HTA : hypertension artérielle  
 IBD : *identical by descent*  
 IECA : inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine  
 IGF : insulin growth factor  
 IM : stress d'immobilisation  
 KO : knock-out  
 LBP : lignée de souris *low blood pressure* avec tension artérielle basse

LC : *locus caeruleus*  
LOD : *logarithm of the odds* ou probabilité statistique exprimée en base logarithmique  
LPS : lipopolysaccharides  
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*  
Mbp : million de paire de bases  
MGI : Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>)  
Micro ARN : acide ribonucléique d'interférence  
MR : récepteur des minéralocorticoïdes  
MRI : imagerie par résonance magnétique  
MT : *movement time* (latence)  
MUHC : *McGill University Health Centre*  
Na/K : sodium/potassium  
NBP : lignée de souris *normal blood pressure* avec tension artérielle normale  
NCBI : National Center for Biotechnology Information  
NO : oxyde nitreux  
NPY : neuropeptide Y  
OR : *odds ratio*  
OF : open-field  
PCR : réaction en chaîne de la polymérase  
PVH : noyau para-ventriculaire de l'hypothalamus  
QTG : gène du trait quantitatif  
QTL : locus de trait quantitatif  
RAA : système rénine/angiotensine/aldostérone  
RCS : souches recombinantes congéniques  
RFLP : *restriction fragment length polymorphism*  
RI : *recombinant inbred*  
SDP : *strain distribution pattern*  
SEM : erreur de mesure standard d'une moyenne  
SEMQ : Service d'évaluation en méthodes quantitatives de l'Université de Montréal  
SHM : souche de souris spontanément ou génétiquement hypertendus  
SHR : souche de rats spontanément ou génétiquement hypertendus  
SI : stress d'immobilisation  
SNP : *single nucleotide polymorphism*  
SSCP : *single-stranded conformational polymorphism*  
SSLP : *simple sequence length polymorphism*  
TA : tension artérielle  
TNF : tumor necrosis factor  
UTR : *untranscribed regions*  
VNTR : *variable-number tandem repeat*  
Wr : facteur de résistance à la Warfarin

*Au doux souvenir de ma mère, Monique Sauriol Thifault décédée le 12 avril 1997, après un dur combat de plus d'une décennie contre le cancer du sein.*

*À mon père qui m'a tout donné, y compris probablement une prédisposition héréditaire pour l'hypertension et le diabète.*

*À mon fils Guillaume, « persévère !!! »*

## Remerciements

Je remercie chaleureusement Dr. Hamet de m'avoir fait partager une partie de ses idées de visionnaire, pour son admirable ouverture à tout domaine des connaissances et pour son appui de tous les instants. Je dois aussi toute ma gratitude à Dr. Lalonde pour son soutien indéfectible, son inspiration et son efficacité. Je suis sincèrement reconnaissant à Dre Tremblay pour son souci constant de fournir à tous un environnement académique et matériel de haut niveau, pour la justesse implacable de ses commentaires scientifiques. Les chirurgies n'auraient pu se faire sans les nombreuses contributions de l'équipe de l'animalerie: Dre. Héon, Suzanne Carioto et particulièrement Nathalie Rousseau pour la réalisation et la rédaction des protocoles. Un grand merci à Ondrej Seda et Yulin Sun qui m'ont aidé à amener les résultats de génétique à un niveau supérieur de publication. Dr. Pierre Dumas, vous avez pavé le chemin à bien des égards! Merci à Pierre-Luc Brunelle, Alexandru Gurau et Bruno Lachance pour la générosité de leur participation à l'amélioration des outils informatiques. Merci à Monique Poirier, Gilles Corbeil et Suzanne Cossette pour les conseils judicieux, et à Carole Long pour la vérification des gènes candidats par RT-PCR. Merci aux professeurs/modèles de rôle: Tomas Reader, Roger Godbout, John Kalaska, Réjean Couture, Emil Skamene, Franco Lepore, Guy Drolet, Laurent Descarries, Vincent Castelluci, Jean-Claude Lacaille, Richard Robitaille, Gérard Plante, Pierre Larochelle, Denis Deblois, Francis Gossard, Pierre Moreau, Julie Lavoie, Lise Coderre, Zdenka Pausova, Christian Joyal, Sergei Orlov, Rhida Joober, Ken Morgan, Kathrin Gill, Suhayla Mukaddam-Daher, Yolanta Gutkowska, Sonia Lupien, Thérèse Botez, Michaël Messaoudi; aux collègues soutenant: Anny Fortin, Alan Boyle, Guylaine Gévry, Diane Hogue, Josée Bédard, France Robin, France Boulianne, Tran-Vihn Dam, Caroline Koch, Benoît Deslauriers, Nathalie Thorin, Sébastien Taurin, Pascaline Krémarik, Takahiro Ueno, Junzheng Peng, Julie Bérubé, Lucie Sedova, Anne-Marie Antchouey, Mounsiif Haloui, Olga Akimova, Céline Bourdon et Marie-Claude Brindisi. Merci infiniment à mes proches, particulièrement à toi, Sandra chérie pour l'ordinateur.

## Chapitre 1. Introduction

Cette thèse se divise en deux parties principales qui correspondent aux objectifs des articles présentés. Il est à noter que la participation de l'auteur principal à chacune des étapes de la réalisation des articles a été essentielle et déterminante. Son rôle a décrit une progression constante, jusqu'à l'exercice d'une responsabilité pleine et entière dans la dernière publication. Les deux premiers articles visent à établir la présence d'anomalies psychomotrices, pouvant modéliser les manifestations cliniques de la démence vasculaire, chez les souris spontanément hypertendues (SHM pour *Spontaneously Hypertensive Mice* ou HBP pour *Blood Pressure High*) vieillissantes. La deuxième partie comprend aussi deux articles qui concernent la localisation des déterminants génétiques des réponses psychophysiologiques caractéristiques des SHM. La revue des écrits couvrira donc dans un premier temps les liens connus entre l'hypertension et la démence vasculaire, en insistant sur la contribution des modèles animaux dans ce domaine. Par la suite, nous aborderons la composante génétique de l'hypertension, en révisant les méthodes et résultats des recherches expérimentales. Une emphase particulière sera placée à l'égard du paradigme de la susceptibilité au stress, qui se présente comme une variable intermédiaire, impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de l'hypertension, et pour laquelle la recherche de ses déterminants génétiques sera le cœur de notre propos.

### 1.1. Revue de la littérature

#### 1.1.1. Définitions : hypertension artérielle et vieillissement

La tension artérielle (TA) varie en fonction de la balance entre le débit cardiaque et la résistance des artères périphériques. La Société Canadienne d'hypertension définit l'hypertension artérielle (HTA) par des valeurs de TA systolique/diastolique supérieures ou égales à 140/90 mm Hg (Société québécoise d'hypertension artérielle, 2002). Cette condition affecterait environ 15-20% de la population mondiale et représente donc un enjeu socio-économique important. L'observation régulière de la TA est d'autant plus importante du fait que 50% des patients avec TA normale élevée évoluent vers l'HTA avec l'âge. Depuis 1992 (Joffres et al., 1992), les enquêtes du CHHS (*Canadian Heart Health Surveys*)

ont dévoilé une prévalence très élevée d'HTA systolique non contrôlée chez les patients âgés de 65 à 74 ans. Ainsi, la prévalence de l'HTA est de 50% après l'âge de 70ans. Des résultats plus récents de ces enquêtes montrent que la conscientisation est très lente puisque 42% des sujets hypertendus ignorent leur état (Joffres et al., 1997). Enfin le Canada montre certains retards par rapport aux États-Unis dans le dépistage et le contrôle de l'HTA systolique chez les personnes âgées, et ce particulièrement chez les patients diabétiques (Joffres, Hamet, Maclean, L'Italien, & Fodor, 2001). L'HTA systolique est le premier facteur de risque pour l'incidence d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) et autres pathologies cardiovasculaires; cependant, la diminution concomitante de la TA diastolique après 60 ans, produit souvent une augmentation de la pression différentielle qui constitue un facteur de risque supplémentaire (Société québécoise d'hypertension artérielle, 2002).

### **1.1.2. Principaux mécanismes de régulation de la TA**

Ce résumé succinct tiré de Marieb (Marieb & [traduction: Jean-Pierre Artigau et al.], 1993) ne vise qu'à introduire le lecteur et définir la terminologie, des précisions seront ajoutées par la suite.

La TA est soumise au contrôle du système neuroendocrinien et des fonctions rénales qui régulent le débit cardiaque, la résistance périphérique et le volume sanguin.

Le système nerveux autonome permet d'ajuster rapidement l'apport sanguin, selon les demandes de l'organisme, en modifiant le diamètre des artérioles. Les fibres efférentes du sympathique agissent localement sur les muscles lisses vasculaires via l'effet vasoconstricteur de la noradrénaline.

Le réseau complexe de noyaux du bulbe rachidien comprend une région d'intégration sensorielle (A 2), dans la région du tractus solitaire, qui reçoit des signaux du nerf vague (fonctions végétatives), des barorécepteurs des grandes artères centrales, des hormones circulantes et des centres supérieurs. Cette intégration permet de réguler la région C1 (cellules noradrénergiques) qui stimule les fibres vasomotrices sympathiques, et la

région A1 qui exerce un contrôle inhibiteur sur C1 (effet vasodilatateur) (Guyton, 1987). Ce système permet un ajustement réflexe de la TA en adaptant le débit cardiaque et la résistance périphérique en fonction des inputs des barorécepteurs sensibles à l'étirement. Une vasoconstriction réflexe peut également être provoquée par une diminution du pH ou de la concentration sanguine en O<sub>2</sub> (ou augmentation du CO<sub>2</sub>) qui sera détectée par des chémorécepteurs. Enfin, les centres supérieurs et particulièrement l'hypothalamus (noyaux latéraux et tubéraux) envoient différents relais de façon à moduler la TA en fonction des besoins de l'organisme. Deux circuits presseurs descendants y sont dédiés (Strazielle, Lalonde, Thifault, & Hamet, 2004): (1) cortex insulaire, hypothalamus, partie rostrale ventrolatérale du bulbe; (2) septum latéral, locus coeruleus (via habénula), partie rostrale ventrolatérale du bulbe.

Divers facteurs hormonaux exercent également leurs influences sur la TA. Les surrénales induisent la vasoconstriction par la sécrétion de noradrénaline dans la circulation; tandis que l'adrénaline provoque une augmentation du débit cardiaque et une vasoconstriction généralisée. Le peptide natriurétique auriculaire (ANP) est libéré lors d'une distension des oreillettes due à une augmentation de la TA. L'ANF augmente l'excrétion du sodium et de l'eau par les reins (effet inverse de celui de l'aldostérone), ce qui résulte en une diminution du volume sanguin et de la TA. L'ANF suscite également une vasodilatation généralisée et inhibe la production de liquide céphalo-rachidien. L'hormone antidiurétique, produite par l'hypothalamus, réduit la diurèse et provoque une intense vasoconstriction lors de chute de la TA. L'endothélium vasculaire peut produire de l'endothéline, un peptide aux effets vasoconstricteurs puissants qui agit sur la perméabilité au calcium des cellules musculaires lisses des vaisseaux, ou par contraste, l'oxide nitreux qui induit une vasodilatation brève et très localisée.

Les mécanismes rénaux de régulation de la TA s'expriment de façon soutenue et durable. D'une part, les reins ajustent directement l'excrétion ou la rétention d'eau en fonction de la TA et du volume sanguin. D'autre part, le système rénine/angiotensine/aldostérone (RAA) opère via l'appareil juxta glomérulaire du rein, pour

libérer la rénine lorsque la TA diminue. La rénine déclenche alors une cascade enzymatique qui permet la production de l'angiotensine II; en plus de son effet vasoconstricteur, celle-ci stimule la production d'aldostérone par la corticosurrénale pour favoriser la réabsorption du sodium et de l'eau par le rein. De nombreuses évidences témoignent du rôle crucial de la rétention du sodium en situation de stress (Harshfield et al., 2003). La revue exhaustive des gènes candidats et des études d'association concernant la portion d'hypertension induite par le stress reprend les mécanismes évoqués ici (Imumorin et al., 2005). Cette dernière revue nous sera d'un grand secours puisque la composante de stress (endophénotype) relié à l'hypertension sera le sujet principal de la partie génétique de la thèse.

### **1.1.3. Démence et hypertension : conclusions des études cliniques**

Au cours de la décennie 60-70, les tenants d'un traitement plus agressif de l'HTA ont rassemblé beaucoup d'évidences suggérant un lien entre l'HTA, le vieillissement et le développement de troubles cognitifs d'attention, d'abstraction, de mémoire et d'habiletés sensori-motrices (Abate, Zito, Ferrari-Ramondo, & Di Iorio, 2001). Les études standardisées ((Farmer et al., 1990); (Kilander, Nyman, Boberg, Hansson, & Lithell, 1998)) confirment le rôle de l'HTA comme facteur majeur de risque et d'aggravation des accidents vasculaires cérébraux (AVC), suite au rétrécissement des artérioles (remodelage vasculaire) et à l'athérosclérose des gros vaisseaux. Aussi, l'occlusion des petites artères pénétrantes et la réduction de l'apport sanguin (ischémies) ou épanchement (extravasation) des fluides provoquent des dommages multiples tant au niveau cortical que sous-cortical (raréfaction de la matière blanche ou lésions ischémiques dites états lacunaires des ganglions de la base ou du thalamus).

Le rôle de l'HTA comme facteur d'aggravation de la démence s'avère complexe à démontrer en raison d'une relation inverse entre la sévérité des démences et la TA (hypotension), qui s'explique par la présence de conditions de co-morbidité telles que



l'apathie, la malnutrition et l'Alzheimer (Skoog, Andreasson, Landahl, & Lernfelt, 1998). L'Alzheimer se distingue de la démence vasculaire en histopathologie par la présence de plaques séniles (dépôt d'amyloïde), mais comporte également des composantes vasculaires/inflammatoires importantes (Anisman, Merali, & Hayley, 2008; Tong, Nicolakakis, Kocharyan, & Hamel, 2005). Les critères classiques du diagnostic différentiel de démence vasculaire (Hachinski et al., 1975) concernent les aspects focalisé et épisodique des atteintes, qui correspondent à des anomalies du flot sanguin cérébral (conditions cardiovasculaires antécédantes) ou à la détection d'infarctus cérébraux par tomographie par émission de positons (Huff & Boller, 1987). En pratique, l'identification précoce de la démence vasculaire pose toujours de nombreux défis méthodologiques (Wiederkehr, Simard, Fortin, & van Reekum, 2008).

Plusieurs études importantes ont contribué à documenter le lien entre l'HTA et les démences. En 1997, l'étude rétrospective "*nun study*" (Snowdon, Greiner, Mortimer, & et al., 1997) démontre que l'expression clinique de la démence est plus fréquente dans les cas où des dommages vasculaires sont présents, en plus des critères histopathologiques associés à l'Alzheimer. Plus précisément, le risque de démence est de 20.7 fois dans le cas d'atteintes sous-corticales du thalamus/noyaux gris/matière blanche versus de 6.7 fois pour les atteintes corticales. Ainsi, les démences dites vasculaires tendent à évoluer « en escalier » par rapport à la progression régulière d'Alzheimer avec ou sans accidents cérébrovasculaires majeurs. Dans la même perspective, l'étude prospective longitudinale «Göteborg» (Skoog, 1997) retrouve l'association entre la manifestation clinique d'Alzheimer, le passé d'hypertendu et les dommages sous-corticaux d'origine vasculaire. L'étude «Rotterdam» confirme l'association entre l'athérosclérose et l'Alzheimer (Hofman et al., 1997). De plus, les patients Alzheimer ayant souffert d'HTA ou d'hyperinsulinémie montrent une plus grande densité de plaques séniles et des atteintes cérébrales plus sévères en résonance magnétique (Abate et al., 2001).

Le projet "démence vasculaire" (Forette et al., 1998) de l'étude randomisée à double insu *Syst-Eur* (*Systolic Hypertension in Europe*), démontre qu'un traitement de

l'HTA principalement avec un inhibiteur calcique réduit de 50% l'incidence de la démence chez les hypertendus de plus de 60 ans. D'autres résultats semblent confirmer l'effet de neuro-protection des inhibiteurs calciques, et ce autant dans les essais expérimentaux (Gould, Murphy, & Snyder, 1985; Disterhoft, Thompson, Weiss, & et al., 1995), que dans les essais cliniques (Morich, Bieber, & Lewis, 1996). Dans cette perspective, STONE (*Shanghai Trial Of Nifedipine in the Elderly*) fût la première démontrer l'avantage de la nifédipine (Haïat & Leroy, 2004), en première intention de traitement (malgré la controverse toujours existante quant à son innocuité), avec une diminution significative des évènements cardiovasculaires individuels ou combinés tels que les troubles du rythme et les AVC (Gong et al., 1996; Hamet & Gong, 1996). Ces évidences ont été maintes fois confirmées depuis, notamment par l'étude CONVINCENCE (*Controlled ONset Verapamil INvestigation of Cardiovascular End points*) (Black et al., 2003). Par ailleurs, les traitements avec des antihypertenseurs classiques comme dans SHEP (*Systolic Hypertension in the Elderly Program*, (SHEP Cooperative Research Group, 1991)), ou plus récents (tels que les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine) comme dans l'étude SCOPE (*Study on Cognition and Prognosis in the Elderly*, (Sever, 2002)), n'ont pas démontré d'efficacité jusqu'à présent pour prévenir la démence.

L'étude ALLHAT (*Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial*), menée avec plus de 33 000 hypertendus de 55 ans et plus, démontre l'équivalence entre les traitements avec un diurétique (chlorthalidone), les IECA (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) ou les bloqueurs calciques pour la prévention des issues primaires et secondaires comme l'AVC (Appel, 2002). Par contre, l'étude ANBP-2 (*Second Australian National Blood Pressure Study*) rapporte une plus grande réduction de l'incidence d'infarctus avec un traitement à base d'IECA, en comparaison avec celui à base d'un diurétique (hydrochlorothiazide), sans différence sur l'incidence d'AVC ou de la mortalité chez des hypertendus de 65 à 84 ans (Wing, Reid, Ryan, & et al., 2003). ASCOT (*Anglo-Scandinavian Cardiac Outcome Trial*) montre la supériorité de la combinaison des médicaments récentes (amlodipine/perindopril) versus

classiques (atenolol/thiazide) quant à l'incidence des AVC, des événements cardiovasculaires, de l'apparition du diabète et de la mortalité toute cause confondue (Dahlof et al., 2005).

Les effets du vieillissement, comme le développement de l'HTA, étant la résultante de processus complexes qui s'échelonnent sur toute la vie; les modèles animaux s'avèrent une nécessité pour décortiquer les effets de la génétique et de l'environnement qui s'y enchevêtrent d'une façon complexe (Hamet, Pausova, Adarichev, Adaricheva, & Tremblay, 1998). Dans ce contexte, une stratégie possible consiste à identifier les déterminants de variables intermédiaires telles que les effets de la diète (Dumas et al., 2002) ou de la susceptibilité individuelle au stress (Hamet & Tremblay, 2002b). C'est donc avec l'intention de simplifier les questions que nous abordons la combinaison vieillissement et HTA chez l'animal.

#### **1.1.4. Démence et hypertension: modèles expérimentaux des rongeurs**

L'idée développée précédemment, selon laquelle l'hypertension peut amplifier les effets du vieillissement sur la cognition (effet additif), n'est pas étrangère au fait que plusieurs équipes de recherche ont choisi les SHR pour tenter de modéliser l'interaction vieillissement et HTA. Ainsi, un accroissement des déficits d'apprentissage en fonction de l'âge a été décrit lors du conditionnement opérant des SHR (Meneses, Castillo, Ibarra, & Hong, 1996). Certains ont rapportés des déficits semblables dans un labyrinthe radial (Mori, Kato, & Fujishima, 1995), ou dans le labyrinthe aquatique de Morris (Diana, 2002). D'autres ont décrit des altérations cérébrales dans la distribution des récepteurs GABA(B) (Ichida et al., 1996) ou des récepteurs nicotiques (Terry, Jr., Hernandez, Buccafusco, & Gattu, 2000). Or ces études ont toutes la faiblesse majeure de prendre les rats WKY comme groupe contrôle; alors que ces derniers, comme les SHR, démontrent également une grande susceptibilité au stress et à la dépression comportementale (Pare & Redei, 1993) et des déficits à l'épreuve de Morris dès l'âge adulte ((Grauer & Kapon,

1993); (Diana, Scotti de Carolis, Frank, & et al., 1994)), les deux souches ayant le même fondement génétique du rat Wistar. Dans le cas des SHR comme modèle du déficit d'attention avec hyperactivité, rappelons ici que l'usage des Wistar-Kyoto (WKY) comme groupe contrôle est controversé, parce que les WKY sont moins actifs que d'autres souches normotendues telles que Wistar et présentent des singularités dans la réponse du système dopaminergique au Methylphenidate (Drolet, Proulx, Pearson, Rochford, & Deschepper, 2002). À ce titre, le modèle des souris génétiquement hypertendues peut être considéré comme avantageux par rapport à celui du rat SHR, dans la mesure où deux souches contrôles (hypotendue, normotendue) de même background génétique permettent d'évaluer l'effet différentiel de l'hypertension.

Enfin, les anomalies comportementales des SHR apparaissent dès l'âge adulte ((Diana, 2002); (Meneses et al., 1996); (Sagvolden et al., 1992)) et sont généralement interprétées comme une incapacité à composer avec des situations dangereuses ((Docherty, 1990); (Knardahl & Sagvolden, 1979); (LeDoux, Sakaguchi, & Reis, 1982); (Soderpalm, 1989); (Svensson, Harthorn, & Linder, 1991)). Bref, la littérature sur les SHR dans le domaine comportemental ne nous fournit pas de modèle pour l'étude de la démence, mais nous amène à nous pencher sur les déterminants génétiques de la susceptibilité au stress. Il est par ailleurs notable que le modèle génétique d'HTA chez le rat SHR (*spontaneously hypertensive rats*) nous ramène à l'effet du vieillissement; alors que l'on pose l'hypothèse d'un vieillissement "cellulaire" accéléré, en raison d'un déséquilibre des processus prolifératifs versus apoptotiques (Hamet et al., 2001; Simon et al., 2006).

### **1.1.5. Composante génétique de l'HTA essentielle**

Les premières évidences d'une composante génétique dans l'HTA proviennent des études épidémiologiques qui démontrent une plus grande prévalence pour les personnes provenant de familles où la maladie est présente. Ainsi, pour les individus de 55 ans et moins, la probabilité de développer l'HTA sera quatre fois plus élevée en présence d'une histoire familiale « positive » (Hamet, Pausova, Tremblay, & Deng, 2002a). Les études de

jumeaux montrent une fréquence plus élevée d'HTA chez les jumeaux identiques que chez les hétérozygotes et permettent d'estimer que la composante génétique explique 49% des ces différences (héritabilité). Les études sur les enfants adoptés, telles que le *Montreal Adoption Survey* (Biron, Mongeau, & Bertrand, 1976), démontrent que l'incidence de l'HTA est de deux fois supérieure chez les enfants naturels de familles « hypertendues » en comparaison à ceux qui sont adoptés. Ainsi, ces dernières études permettent d'évaluer que la composante génétique explique 61% de la variabilité sur la mesure de TA systolique, contre 39% pour la composante environnementale (Mongeau, Biron, & Sing, 1986).

Comme pour la plupart des pathologies, les formes monogéniques (mutation d'un seul gène) représentent moins de 5% des cas d'HTA. Ces mutations sont bien documentées (Hamet et al., 2002a), et produisent un effet marqué sur la TA en agissant sur les voies métaboliques des stéroïdes surréniaux ou sur des transporteurs rénaux des électrolytes. La plupart des gènes impliqués ont été écartés des recherches sur l'HTA essentielle à part de la 11 $\beta$ -hydroxylase (enzyme de dégradation du cortisol) qui demeure un gène candidat pour l'HTA essentielle (Rapp, 2000). L'HTA essentielle ou primaire se définit donc par son développement lent, sous l'influence de plusieurs gènes (polygénique) en interaction (épistasies), dont les effets individuels sont plus ou moins remarquables. Le caractère polygénique du trait de la TA se démontre également par l'observation à l'effet que la mesure de la TA dans la population générale varie de façon continue et décrit une courbe normale de Gauss. Dans ce contexte, le trait sera dit complexe du fait qu'il ne suit pas les règles Mendéliennes de la transmission d'un trait monogénique, c'est-à-dire déterminé par un seul gène causal.

### **1.1.6. Génétique quantitative des traits complexes**

Les analyses mendéliennes de ségrégation demeurent le modèle de base pour localiser les déterminants génétiques des traits complexes (Lander & Schork, 1994). Par

contre, d'autres méthodes peuvent être employées: les études d'association et l'approche des allèles partagées.

Les études d'association relèvent de l'épidémiologie génétique qui s'appuie surtout sur des "*case control studies*" (Seda, Tremblay, Sedova, & Hamet, 2005). Ces études comparent les différences entre les individus sains et affectés dans la population générale quant à la fréquence de certains allèles d'intérêt physiopathologique. Une association positive peut s'interpréter de différentes façons: si l'allèle identifiée est la cause du trait, une forte association devrait pouvoir être reproduite dans différentes populations. Une autre possibilité est d'avoir identifié un marqueur très près du gène causal et qui coségrègue parcequ'il n'a pas encore été séparé par les recombinaisons méiotiques. Enfin, il est toujours possible qu'une association reflète une caractéristique historique propre à la population étudiée et que le trait n'ait en fin de compte aucun déterminant génétique. Les populations homogènes sont plus faciles à analyser (ex.: population du lac St-Jean). L'ADN des géniteurs est nécessaire pour effectuer des contrôles négatifs (identification des allèles sains) ou positifs (le parent hétérozygote a plus de chance d'avoir transmis un allèle coupable à l'enfant atteint) sur différents marqueurs. Un exemple d'association concerne l'alcoolisme et le récepteur dopaminergique D2. La fréquence de ce polymorphisme varie tellement chez différents groupes contrôles qu'il est impossible de vérifier cette hypothèse d'association (Blum et al., 1995).

L'approche non-paramétrique des allèles partagés consiste à démontrer que la fréquence d'un allèle particulier chez les parents affectés n'est pas due au hasard. Plus précisément, il s'agit de dénombrer les copies reçues (0 ou 1 ou 2) de différents marqueurs chromosomiques (sur un chromosome en particulier ou sur tout le génome), et à évaluer la corrélation entre le nombre d'allèles partagés à un locus donné et le carré de la différence phénotypique. Cette opération sera répétée avec une densité croissante de marqueurs, de manière à restreindre de plus en plus une région chromosomique, et ce pour révéler un locus et éventuellement isoler le gène. L'application la plus utilisée est l'analyse des "*sib-*

*pairs*”. Par exemple, cette approche a permis d’isoler le facteur angiotensinogène qui explique certains cas d’HTA (Lifton & Jeunemaitre, 1993).

Le raffinement des analyses mendéliennes de ségrégation dans les études animales de croisement offre maintenant des possibilités nouvelles d’étudier les traits complexes. Ceux-ci seront disséqués en termes de leurs composantes monogéniques. La stratégie optimale consiste à générer des souches consanguines, sélectionnées pour différer sur le trait d’intérêt (Mormede et al., 2002), de les croiser ensemble pour produire une première génération filiale (F1) d’hétérozygotes; puis, en croisant les “F1” ensemble, les hybrides de seconde génération filiale “F2” seront homozygotes sur 50% du génome. Ainsi, chaque individu de “F2” représentera une recombinaison unique de l’héritage parental, ce qui permet d’identifier quel loci ou segments chromosomiques sont associés à l’augmentation ou la diminution sur la mesure d’un trait (QTL ou *quantitative trait locus*).

L’analyse de liaison permet d’établir la concordance entre les variations du trait (ou phénotype) et certaines variations du génotype, en se basant sur le principe que les marqueurs anonymes à proximité du gène causal vont co-ségrégé ou voyager avec lui pour servir d’indicateur et faciliter sa localisation par le phénomène du déséquilibre de la liaison. Les marqueurs anonymes sont des éléments hautement polymorphiques de l’ADN de type RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) ou VNTR (*variable-number tandem repeat*). Ces éléments permettent de différencier les individus en fonction respectivement du nombre de sites de restriction (zone d’action des enzymes) ou du nombre de répétitions de certaines séquences contenues dans le segment. Les VNTRs peuvent être longs (mini satellites) ou courts (microsatellites et *simple sequence length polymorphism* ou SSLP) et ces différences seront révélées par PCR (*polymerase chain reaction*) ou sur gel d’électrophorèse (Hamet et al., 2002a). Par ailleurs, la position d’un locus ou QTL se définit en termes statistiques par la probabilité associée au test statistique paramétrique qui évalue l’effet du génotype sur la valeur du phénotype. Les QTL seront rapportés à l’aide de scores LOD (*logarithm of the odds*) qui correspondent au logarithme base 10 du «likelihood ratio» se rapportant à l’hypothèse de linkage. Cette définition statistique varie à

l'intérieur d'un intervalle de confiance, qui dépend de la taille de l'échantillon testé, de la magnitude de l'effet sur le phénotype et de la densité des marqueurs génétiques employés. En prenant l'exemple de la TA, puisque la majorité des effets rapportés dans les populations ségrégantes expliquent de 5-15% de la variance; on peut estimer que la précision de l'intervalle d'un QTL correspond à un segment de 20-35 cM (pour un échantillon de 200-300 hybrides F<sub>2</sub>). Or une précision de 1 cM est nécessaire pour considérer des études de séquençage, puisqu'une telle région peut contenir environ 40 gènes. Il faudra donc restreindre l'étendue des régions concernées (Rapp, 2000).

Maintenant, les déterminants des traits complexes peuvent être localisés dans le génome entier (*where*) sans même savoir quel système physiologique est impliqué (*what*) (Mormede et al., 2002). Cette approche est nommée « *total genome scan* » ou « *interval mapping* », par contraste avec l'approche des gènes candidats, et s'appuie sur la disponibilité récente de carte de linkage avec un grand nombre de marqueurs sur tout le génome de la souris permet de synthétiser les données connues sur les gènes humains (<http://www.informatics.jax.org>). De plus, le transfert de connaissances inter espèces se décrit comme l'approche de la «génomique comparative» et permet de prendre avantage des nombreuses homologies ou synthénies dans l'ordre des gènes chez l'humain et la souris ((Sugiyama et al., 2001); (Wehner, Radcliffe, & Bowers, 2001); (Moore & Nagle, 2000)).

### **1.1.7. Modèles de la génétique expérimentale**

Les souches recombinantes consanguines ont été créées pour faciliter l'étude des traits complexes. Les souches progénitrices parentales sont choisies, l'une comme modèle de pathologies humaines (hypertension, dyslipidémie..) et l'autre, son contrôle, idéalement pour sa distance génétique. Le premier croisement (F<sub>1</sub>), réciproque si possible, est suivi d'un deuxième aléatoire (F<sub>2</sub>).

Les représentants de "F<sub>2</sub>" sont croisés entre frères et sœurs sur plus de 20 générations, afin d'atteindre une homozygotie sur l'ensemble des loci. Ceci permet de



séparer les composantes des traits polygéniques d'un trait complexe en plusieurs regroupements contribuant aux phénotypes intermédiaires, qui eux contribuent au phénotype complexe de la pathologie sous étude. Il est à noter que plusieurs allèles peuvent contribuer au phénotype intermédiaire. L'établissement des lignées consanguines permet aussi de disposer de souches reproductibles, ce qui rend possible l'analyse des phénotypes dont la mesure est plus variable, en plus de pouvoir tester nombres d'hypothèses sur l'ontogenèse des physiopathologies ou sur tout phénotype évoluant avec l'âge ((Rapp, 2000); (Hamet et al., 2002a)). C'est dans cette perspective qu'une série de lignées recombinantes consanguines ont été développées spécifiquement pour l'étude de l'HTA essentielle, à partir du croisement des souches SHR et BN (Pravenec, Klir, Kren, Zicha, & Kunes, 1989) et utilisée comme modèle d'identification des déterminants génomiques de la période périnatale à l'adulte, particulièrement ceux affectant les fonctions rénales (Hamet et al., 1998).

Plus récemment, des souches congéniques ont été conçues dans le but de restreindre ou préciser les régions chromosomiques détectées par les modèles précédents jusqu'à un intervalle d'environ 1cM ((Rapp, 2000); (Hamet et al., 2002a)). La procédure consiste à sélectionner des souches qui diffèrent sur le trait d'intérêt, pour générer des hybrides de première génération (F1), qui seront rétro croisés (backcross) à l'un ou l'autre des parents d'origine et ce, sur plus de huit générations. Ceci permet, par exemple, de transférer une allèle causant l'HTA sur un background normotendu (ou l'inverse) et ainsi confirmer l'implication de la région concernée (Rapp & Deng, 1995). Une variante du modèle, appelées souches consomiques consiste à transférer un chromosome entier; ce qui a permis de démontrer l'existence de déterminants de la TA sur le chromosome Y (Ely, Daneshvar, Turner, Johnson, & Salisbury, 1993; Dumas et al., 2000a). Enfin, une autre variante, nommées souches congéniques doubles, permet d'étudier les interactions entre loci par le transfert simultané de deux régions chromosomiques. Par exemple, ceci a permis d'établir que ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine) peut modifier l'expression du récepteur A de l'ANP (*atrial natriuretic peptide* ou GC-A pour guanylyl cyclase) pour déterminer

l'occurrence de l'HTA sensible au sel (Garrett et al., 1998b). Cette interaction entre les gènes *ACE* et *Npr1* (*Natriuretic peptide receptor 1*), a été confirmée par la présence d'un SSCP (*single-stranded conformational polymorphism*) dans une séquence répétitive de dinucléotide dans le promoteur du gène *Npr1*, qui diffère entre les rats SHR et BN-Lx (Tremblay et al., 2003). Ce polymorphisme est associé à une activité cyclase basale accrue du récepteur GC-A, une expression augmentée de l'ARNm (acide ribonucléique messenger) codant pour ce récepteur et une TA diastolique plus faible chez les lignées RI (*recombinant inbred*) possédant l'allèle BN (plutôt que l'allèle SHR et inversement) sur les deux gènes : *ACE/Npr1*.

L'approche des gènes candidats, s'appuie sur la connaissance à priori de la fonction d'un gène (candidat indépendant) ou de sa localisation dans le génome (candidat positionnel), et consiste à détecter les variations alléliques entre sujets sains et affectés. Dans le domaine de l'HTA, ces études se sont concentrées sur le système RAA : des mutations dans le gène  *$\alpha$ -adducin* ont été associées à l'HTA essentielle; la composante sensible au sel de l'HTA dans les études expérimentales de ségrégation a été associée à des variations alléliques dans les gènes de la rénine, de la 11 $\beta$ -hydroxylase et de *gca*. Cependant, ces études ne peuvent exclure la contribution d'autres gènes, puisqu'elles ne couvrent que 5-10% des gènes possibles (Hamet et al., 2002a). Paradoxalement, la contribution de certains gènes peut aussi être occultée par l'approche du « *total genome scan* », puisque l'effet positif d'un locus sur le trait peut annuler l'effet négatif d'un autre locus (Rapp, 2000); c'est pourquoi les deux approches sont complémentaires, il est essentiel de comparer différents modèles de croisements. Aussi, les gènes candidats devront être confirmés à l'aide de souches congéniques ou transgéniques.

Le modèle des animaux transgéniques consiste à introduire un gène dans les cellules germinales sexuelles, de façon à ce que 50% des animaux produits seront hétérozygotes pour le transgène ((Kuhn, Schwenk, Aguet, & Rajewsky, 1995); (Smithies, Kim, Takahashi, & Edgell, 2000)). Après une série de croisements, des homozygotes seront obtenus et maintenus par croisements consanguins. Ces derniers exprimeront le nouveau

gène dans toutes leurs cellules (ou dans certains tissus spécifiques). Ces études sont complémentaires aux autres modèles présentés et permettent de confirmer le rôle des gènes candidats. Encore une fois, les études concernant l'HTA se sont concentrées principalement sur le système RAA (Hamet et al., 2002a). En outre, plusieurs modèles transgéniques concernent l'axe hypophyso-cortico-surrénalien (Steckler, 2001).

Enfin, il importe de souligner qu'après l'identification d'un gène candidat, plusieurs étapes restent encore à franchir avant le séquençage du gène (Hamet et al., 2002a). Les analyses des RFLP (*restriction length polymorphisms*) chez des parents affectés permettent de découvrir des marqueurs en bordure du locus et d'en restreindre l'étendue. L'intervalle est exploré à l'aide de sondes propres à cette région candidate, puis la séquence est reconstituée et les mutations recherchées. Cette démarche fastidieuse est cependant grandement facilitée depuis que nous pouvons comparer les séquences entre les espèces.

### **1.1.8. Génétique de l'hypertension**

L'analyse de liaison a été abondamment utilisée et documentée dans le domaine de l'HTA, notamment dans les études de croisements chez le rat; et des revues extensives sont disponibles ((Rapp, 2000); (Hamet et al., 2002a)), dans lesquelles des QTL sont rapportés sur presque tous les chromosomes (chr.) du rat. Brièvement, le chr.1 contient un QTL confirmé par trois croisements F2 et comprend le gène candidat *Sa*, sur exprimé chez SHR (versus WKY); le même QTL renferme également les sous-unités  $\gamma$  et  $\beta$  des canaux sodiques épithéliaux impliqués dans l'HTA monogénique du syndrome de Liddle. Un QTL sur le chr.2 est à proximité des gènes *gca* (récepteur de ANP) et carboxypeptidase B. Une région spécifique du chr.4 contient des QTL d'HTA, de résistance à l'insuline et d'hypertriglycémie des SHRs. Le chr.10 possède un QTL dans la région des gènes ACE, la sous-unité  $\beta_2$  du transporteur ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et la NO synthase inductible. Le chr.12 renferme un QTL dans la région de *hsp27* (*heat shock protein*). Le chr.13 renferme un QTL dans la région du gène de la rénine, confirmé par quatre croisements F2 et une étude avec des souches congéniques.

Chez la souris cette fois, un croisement F2 entre les souches consanguines BPH/2 et BPL/1 a permis de rapporter un QTL sur le chromosome 10 (LOD=4.9) (Wright et al., 1999). Cependant, le protocole employé pour mesurer la TA chez la souris nécessite de chauffer et d'immobiliser les animaux pendant la mesure de la TA par plétismographie sur la queue. Nous pensons que dans ce contexte, le QTL mentionné correspond du moins en partie à un trait de susceptibilité au stress. La même réflexion s'applique quant à la sélection initiale des SHM en fonction de leur TA, car le même protocole de plétismographie (avec chauffage et contention) a été employé par Schlager (Schlager, 1974). À cet effet, dix jours d'entraînement à l'immobilisation n'habituent pas les réponses de TA et du rythme cardiaque qui demeurent aussi élevés qu'au premier jour, lorsque mesurées par télémétrie (Gross & Luft, 2003). Toujours dans cette même perspective, un rétro croisement dérivé des souches de souris A/J et C57BL/6J (sensible au sel) révèle six QTL d'HTA induite par le sel (Bpq1-6) sont synténiques ou correspondent avec des QTL d'HTA retrouvés chez l'humain et le rat (Sugiyama et al., 2001). De plus, Bpq2 et Bpq6 correspondent respectivement aux régions impliquées dans l'émotionnalité, sur les chr. 1 et 15 de la souris (Flint, 2003). Encore une fois, notons que les QTL de TA rapportés chez la souris se rapportent à une mesure de la TA par plétismographie, avec chauffage et immobilisation des animaux. Ceci pourrait expliquer la convergence vers des régions impliquées dans le stress ou l'anxiété; nous y reviendrons.

### **1.1.9. Génétique de l'anxiété: modèles chez les rongeurs**

L'expression pathologique de l'anxiété regroupe des symptômes psychiatriques dont la prévalence est la plus élevée. Les études sur l'hérédité familiale, les jumeaux ou l'adoption démontrent un rôle important des facteurs génétiques; tandis que l'hétérogénéité des troubles liés à l'anxiété reflète l'origine polygénique de cette entité (Torgersen, 1990). Les tests comportementaux d'approche/évitement chez les rongeurs constituent un des paradigmes les mieux documentés en génétique du comportement et permettent d'illustrer l'évolution des méthodes en génétique. L'open-field, développé par Hall en 1934 (Wehner

et al., 2001), est le test le plus fréquemment employé pour mesurer la réactivité émotionnelle des rongeurs, ou la peur des espaces ouverts (agoraphobie). Plus précisément, l'anxiété se manifeste par une diminution de la locomotion et une augmentation de la défécation liée à l'activation du système nerveux sympathique. Dans nos études, nous utilisons une boîte carrée de 60 cm de côté, en fibre de verre, pour effectuer cette épreuve.

L'équipe de DeFries (DeFries, Gervais, & Thomas, 1978) fut une pionnière dans ce domaine, en démontrant que la corrélation négative entre les degrés d'activité et de défécation est préservée par co-ségrégation, par le biais de souches de souris consanguines qui diffèrent par leur degré d'activité élevé et faible respectivement (F3 C57BL/6J x BALB/cJ).

Trullas et Skolnick (Trullas & Skolnick, 1993) ont comparé l'anxiété de 16 souches de souris consanguines dans l' open-field et le labyrinthe en croix surélevé. Cette dernière épreuve d'agoraphobie est sensible aux benzodiazépines et repose sur la préférence des rongeurs pour des compartiments fermés par rapport à des compartiments ouverts. Dans cette étude, la portion de la variabilité inter souche qui s'explique par les déterminants génétiques (héritabilité ou  $h^2$ ), est de 69% pour la durée et de 78% pour la fréquence des visites dans les compartiments ouverts. Dans l'open-field,  $h^2$  est de 75% sous une lumière intense et de 44% sous une illumination faible. Les différences entre les souches extrêmes A/J et C57BL/6J disparaissent sous une lumière infrarouge dans l' open-field, dans lequel la sensibilité à la lumière est fortement déterminée par la mutation récessive de la tyrosinase (chr.7 :44 cM des albinos A/J (DeFries, 1969)). Par contre, la préférence des A/J pour les bras fermés du labyrinthe en croix se maintient sous la lumière infrarouge et dépend de facteurs indépendants du système visuel (Cohen, Kang, & Gulick, 2001), comme c'est le cas également pour l' open-field ((Gershenfeld et al., 1997a); (Gershenfeld & Paul, 1997b)). Ces deux épreuves semblent toutefois déterminées par un agencement unique des facteurs génétiques, puisque l'ordre des souches consanguines testées par Trullas et Skolnick (Trullas et al., 1993) (ou le SDP, *strain distribution pattern*) diffère entre les deux

épreuves. Un SDP unique est également obtenu pour l'effet des benzodiazépines sur la performance à ces épreuves anxiogènes (Griebel, Belzung, Perrault, & Sanger, 2000).

Les analyses des QTL liés à l'anxiété, proviennent principalement de deux populations d'animaux, soit de croisements entre les lignées sélectionnées de DeFries (Flint, 2003), ou soit de croisements entre les souches A/J et C57BL/6J. Les premiers QTL "putatifs" ou probables, caractérisent les lignées RI BxA, AxB (Mathis, Neumann, Gershenfeld, Paul, & Crawley, 1995). A/J et C57BL/6J seront ensuite utilisées dans différents croisements F2 pour localiser les QTL des chr. 1(101 cM) et 10(74 cM) sur l'épreuve de l'open-field ((Gershenfeld et al., 1997a); (Gershenfeld et al., 1997b)). La position du QTL sur le chr.1 a été précisée à  $73 \pm 0.8$  cM (emo3), à l'aide d'une population hétérogène dérivée de huit souches consanguines (Talbot et al., 1999). Enfin, l'étude de quatre épreuves différentes mesurant le trait d'anxiété dans un croisement F2 à partir des lignées de DeFries, décrit des QTL qui convergent sur les chr. 1 et 15 (Flint, 2003). Ce dernier auteur fait également une revue exhaustive et très détaillée de tous les QTL concernant des traits comportementaux; le Tableau I en présente une synthèse se limitant au phénotypes liés à l'anxiété chez la souris.

**Tableau I. QTL sur le trait d'anxiété chez la souris (adapté de Flint, 2003)**

Phénotype	Méthode	Références	Chr.	Position (cM)	Log. (P)
Activité dans l'open-field	F2 (DeFries HxL)	(Turri, Henderson, DeFries, & Flint, 2001)	1	74	27.4
			7	52	13.0
			15	20	12.5
Défécation dans l'open-field	F2 (A/JxC57BL6J)	(Gershenfeld et al., 1997a)	1	100	7.1
			10	74	8.8
Visites au centre de l'open-field	F2 (DeFries HxL)	(Turri et al., 2001)	1	74	14.5
			14	20	9.4
			X	50	5.4
Transitions "Light-to-Dark"	F2 (A/JxC57BL6J)	(Gershenfeld et al., 1997b)	1	73	7.7
			10	74	9.5
Labyrinthe en croix Visites bras ouverts (%)	F2 (DeFries HxL)	(Turri et al., 2001)	1	80	15.4
			15	22	12.9

Tableau I. Suite ...

Phénotype	Méthode	Références	Chr.	Position (cM)	Log. (P)
Chambre au miroir		(Turri et al., 2001)	18	22	7.9
Peur acquise ( <i>Fear Conditioning</i> )	BC (C57BL6JxC3H/He)	(Caldarone et al., 1997)	1	30	5.9
Contextuelle	F2 (C57BL6JxDBA/2)	(Wehner et al., 1997)	1	70	5.1
			3	30	4.1
			10	15	4.7
			16	58	4.5
Indicielle (Cued)	F2 (C57BL6JxDBA/2)	(Wehner et al., 1997)	1	78	5.6
			10	28	4.6
Épreuve de nage forcée (dépression)	F2 (C57BL6JxC3H/He)	(Yoshikawa, Watanabe, Ishitsuka, Nakaya, & Nakatani, 2002)	8	51	4.2
Période naturelle d'activité en nombre d'heures	F2 (C57BL6JxBALB/cJ)	(Shimomura et al., 2001)	4	31	5.5
Activité spontanée	F2 (C57BL6JxDBA/2)	(Hitzemann et al., 2000)	1	70	6.5



### 1.1.10. Stress, HTA expérimentale et physiopathologie

Henry propose une revue des différents modèles animaux d'HTA expérimentale sans manipulation génétique et de leurs contributions dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui lient l'HTA au stress (Henry, Liu, & Meehan, 1995). C'est à l'époque des travaux russes sur la dépression comportementale acquise (*learned helplessness*) pendant l'acquisition de tâche discrimination hautement conflictuelle, que l'on publia la première monographie sur l'HTA essentielle ou neurogénique (Pickering, 1961), qui reconnaît une composante émotionnelle dans le développement de la maladie. En partant des primates utilisés par la NASA, en passant par diverses stimulations aversives chez le rat, il fut démontré chez la souris qu'un stress psychosocial soutenu (environnement restreint qui force les interactions et la compétition) peut induire une HTA durable qui peut être prévenue à l'aide de  $\beta$ -bloqueurs ou contrôlée par un traitement aux IECA. Ces évidences suggèrent que les mécanismes en cause sont l'hypersensibilité vasculaire à l'angiotensine II, conséquence de l'hyperactivité soutenue du sympathique, lui-même provoqué par la stimulation du *locus caeruleus* et du noyau amygdalien central. Certains ont proposé que le noyau amygdalien central joue un rôle cardinal dans l'ajustement des réponses du sympathique (via des projections vers l'hypothalamus latéral) au stress psychogénique (Reis & LeDoux, 1987). Dans un contexte normal, un réajustement réflexe est effectué par le noyau adrénergique C1 du bulbe rachidien (comme dans le baro-réflexe); mais il semble que chez les animaux hypertendus, l'ajustement réflexe est contourné par les mécanismes centraux lors des réponses émotionnelles.

Le modèle explicatif de l'HTA expérimentale de Henry reprend les phases successives du syndrome général d'adaptation au stress de Selye : alarme/résistance/épuisement (Selye, 1976); auxquelles se greffent une adaptation du système cardio-vasculaire (Folkow, 1990), qui évolue vers une augmentation de la résistance vasculaire périphérique via un remodelage vasculaire (rétrécissement de lumière des vaisseaux) en faveur de la prolifération des cellules musculaires lisses (Hamet et al., 2001). On peut souligner au passage que le recrutement du système de défense est favorable pour la préservation de l'espèce à l'âge de la reproduction (la synthèse accrue des catécholamines par la médullosurrénale et le système sympathique mobilise les ressources

du système immunitaire, favorise la glycolyse et la conservation des électrolytes/fluides par l'activation du système RAA), mais contribue peut-être à l'usure des organes cibles.

Quand la perception d'une menace se maintient dans le temps, parce que le challenge dépasse les ressources de l'individu ou lui rappelle des expériences douloureuses; la réponse active de défense (*fight or flight*) ne trouvant aucun exutoire, elle fait place à la défaite et au recrutement de l'axe hypophyso-cortico-surrénalien, sur laquelle Selye a consacré ses travaux (Selye, 1976). Certains continuent de lui attribuer un rôle dans les pathologies liées à l'anxiété et à la dépression ((Arborelius, Owens, Plotsky, & Nemeroff, 1999);(Johansson et al., 2001)) ou à l'interaction avec le système immunitaire ((Marchetti et al., 2001);(Bonneau, Mormede, Vogler, McClearn, & Jones, 1998)). Par contre, la question de la spécificité des réponses à différents stress demeure ouverte. À cet égard, l'expression de *c-fos* chez les animaux normaux montre un marquage spécifique et sélectif de différentes régions cérébrales en fonction de différents stress tels que l'immobilisation, la douleur, le froid ou l'hypoglycémie ((Dampney & Horiuchi, 2003);(Pacak & Palkovits, 2001)). Sur le plan cardio-vasculaire, Folkow résume les conséquences physiologiques du stress de la vie moderne de la façon suivante (Folkow, 2001): chez les individus génétiquement susceptibles, la balance entre le recrutement des systèmes de défense ou de défaite respectivement, déterminera les manifestations cliniques en faveur de l'HTA ou des maladies métaboliques (dyslipidémies, résistance à l'insuline, dépôt de gras abdominal et athérosclérose) ou souvent une combinaison des deux tableaux. Les travaux de Pausova et al. ((Pausova et al., 2000);(Pausova et al., 2003)) concordent avec ces dernières observations.

L'innervation des surrénales par le sympathique module l'intensité de la réponse hormonale au stress. La sécrétion d'ACTH (hormone adrénocorticotrophine), par l'hypophyse antérieure, régule la synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes cortisol et corticostérone par le cortex surrénal. La production d'ACTH est sous le contrôle des hormones CRF (facteur de relâche de la corticotrophine) et vasopressine du noyau paraventriculaire (PVH) de l'hypothalamus (Mormede et al., 2002).. Ce dernier noyau (PVH)

reçoit des afférences des autres noyaux hypothalamiques (intégration et régulations des fonctions métaboliques et circadiennes), de différents noyaux du bulbe rachidien (intégration des fonctions vitales) et du système limbique des émotions (Choi et al., 2007). Les récepteurs intracellulaires des glucocorticoïdes ont la capacité de modifier l'expression de certains gènes et ce faisant joue un rôle cardinal dans la réponse au stress en potentialisant l'effet des catécholamines sur l'activité métabolique du cerveau et des organes vitaux, via le récepteur des glucocorticoïdes (GR) à basse affinité et spécifique au cortisol. Le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) possède une haute affinité pour le cortisol et l'aldostérone et régule le métabolisme des électrolytes et du volume liquidien (Huang, Amin, & Leenen, 2006).

Une grande variabilité génétique dans les mécanismes de la réponse neuroendocrinienne au stress a été rapportée tant chez l'humain que chez l'animal (Mormede et al., 2002; Hamet et al., 2002b). Par exemple, des effets différentiels du sexe et du background génétique sur la réponse neuroendocrinienne à l'immobilisation répétée ont démontré, avec les souches de souris consanguines C57BL/6 et DBA/2 (Jones, Sarrieau, Reed, Azar, & Mormede, 1998). Cette dernière équipe s'est également intéressée aux déterminants génétiques de la réponse (neuroendocrinienne) au stress d'immobilisation chez le rat. Le transporteur spécifique au cortisol, transcortine est leur principal gène candidat (Mormede et al., 2002).

### **1.1.11. *CRF* et autres déterminants majeurs de la réactivité émotionnelle**

D'autres groupes se sont intéressés à la génétique des troubles anxieux. Smoller et al. (Smoller et al., 2001b) ont basé leurs études d'association en partant des gènes candidats découlant des études animales (Gershenfeld & Paul, 1998). Ce groupe a utilisé le phénotype intermédiaire de l'inhibition comportementale qui semble conservé et bien caractérisé tant chez l'humain que chez les rongeurs. Une inhibition de l'activité lors de situations nouvelles a en effet été observé chez des souris transgéniques sur-exprimant *CRF*

(Bakshi & Kalin, 2000). Plusieurs études rapportent que cette symptomatologie est un facteur de risque chez les enfants de parents souffrants de troubles de panique ou de phobie sociale (Smoller et al., 2001b). À partir d'analyse de fréquence des haplotypes, une association a finalement été confirmée dans ces familles à risque, entre un polymorphisme dans la région codante de *CRF* et l'inhibition comportementale (Smoller et al., 2005).

Par ailleurs, depuis le début de notre projet en 1996 jusqu'à aujourd'hui, un grand nombre d'évidences (Nemeroff, 1996) ont impliqué les éléments du système *CRF* (peptides reliés au *CRF*, ses récepteurs et la protéine liant celui-ci), pour enfin proposer des antagonistes comme alternative pour le soulagement de l'anxiété et de la dépression (Keck, Ohl, Holsboer, & Muller, 2005; Sapolsky, 2003). Dans la même veine, des essais cliniques ont aussi cours avec un antagoniste sélectif du récepteur V1b de la vasopressine (Serradeil-Le Gal et al., 2005) et pour bien d'autres systèmes de neurotransmission/neuromodulation tel que le glutamate (Mathew, Price, & Charney, 2008).

### **1.1.12. La susceptibilité au stress comme variable intermédiaire associée à l'HTA essentielle**

Plusieurs études de santé publique suggèrent une association entre le stress professionnel, plus précisément le manque de contrôle décisionnel, et la prévalence des pathologies cardiovasculaires (Karasek et al., 1988; Marmot, Bosma, Hemingway, Brunner, & Stansfeld, 1997). Streptoe précise que des facteurs individuels liés à la personnalité, tels que le refoulement de la colère peuvent potentialiser les effets d'un environnement social hostile (Streptoe, 1997). La réponse cardiovasculaire aux stress physiques tels que la stimulation par le froid, ou aux stress psychogéniques (tests arithmétiques) sont maintenant employés pour déterminer la prédisposition génétique (ou héritabilité familiale) pour le développement des pathologies vasculaires (Hamet et al., 2002b).

Pour remettre en perspective l'importance du stress comme facteur de risque pour le développement des troubles cardiovasculaires, l'étude INTERHEART place ce dernier au

troisième rang, avec un risque augmenté (*odds ratio* ou OR) d'infarctus du myocarde de 2.67, après les dislipidémies (OR = 3.25) et le tabagisme (OR = 2.87), mais loin devant la diète, l'exercice et la consommation d'alcool ayant tous un OR en bas de un (Yusuf et al., 2004). Rappelons que cette étude s'appuie sur des mesures objectives et subjectives du stress relié au travail et à la vie privée, sur plus de 24 000 cas/témoins dans 52 pays (Rosengren et al., 2004). Une étude récente suggère également un risque augmenté de plus du double pour le développement du syndrome métabolique en présence de stress chronique au travail (Chandola, Brunner, & Marmot, 2006).

Sur le plan expérimental, les SHRs et SHM démontrent une hyper réactivité aux stress (Hamet et al., 2002b). Ainsi, il fut démontré qu'un locus de thermosensibilité (*tms*) chez les SHM coségrègue ou est associé à la TA élevée, à l'aide de croisements hybrides F2 de seconde génération filiale (Malo, Schlager, Tremblay, & Hamet, 1989). Cette thermosensibilité a également été observée chez les patients hypertendus (Kunes, Tremblay, Bellavance, & Hamet, 1991). De plus, l'exposition à des stress psychogéniques, tels que les changements de cage, la manipulation, le placement dans l'open-field ou l'immobilisation, résulte en une augmentation plus importante du rythme cardiaque, de la TA et de la température chez les animaux génétiquement hypertendus (Morimoto, Watanabe, Morimoto, Nakamori, & Murakami, 1991).

### **1.1.13. Effet de la diète salée sur la réponse au stress : un exemple d'interaction gènes/environnement en génomique comparative**

Les études épidémiologiques et essais cliniques n'ont pas démontré d'effet marqué du sodium nutritionnel sur la TA dans la population générale (Hamet et al., 2002b). Cependant, certains individus semblent plus susceptibles à cet effet, pour lequel le degré différentiel d'activation du système nerveux sympathique (et du système RAA) serait le mécanisme principal ((Poulter, Shipley, Bulpitt, Markowe, & Marmot, 1988); (Staessen et

al., 1989); (Staessen et al., 1991)). De plus, plusieurs études tant chez l'humain ((Rollnik, Mills, & Dimsdale, 1995); (Staessen et al., 1994); (Williams et al., 1992)) que chez l'animal ((Anderson, Dietz, & Murphy, 1987); (Bensi, Bertuzzi, Armario, & Gauna, 1997); (Bourjeili, Turner, Stinner, & Ely, 1995); (Dibona & Jones, 1995)) suggèrent une interaction entre les effets du stress psychogénique et de la diète sodée. Ceci de telle sorte que certains individus, dits non-modulateurs, deviennent hypertendus car ils réduisent leur excrétion, ou même augmentent leur consommation de sodium en situation de stress. Ainsi, on a pu sélectionner une sous population de SHRs sensibles au sel dont l'intensité de la réponse au stress d'immobilisation (température corporelle et TA) est modulée par le ratio sodium/calcium de la diète (Dumas, Tremblay, & Hamet, 1994).

On peut donc concevoir que certains gènes de susceptibilité déterminent le seuil de sensibilité aux stimulations environnementales (Dumas, 2001). Dans cette perspective, l'augmentation de la température corporelle en réponse au stress d'immobilisation est déterminés par des QTL sur les chromosomes 10, 12 et Y du rat, dans les lignées recombinantes consanguines dérivées de SHR et BN soumises à une diète riche en sodium (Dumas et al., 2000a). Le locus du Chr. 10 a récemment été confirmé chez des hybrides F2 dérivés de BN et hHTg (hypertriglycéridémique) (Klimes et al., 2005). Par ailleurs, l'étude de Dumas et al. (Dumas et al., 2000a) nous enseigne que les gènes de susceptibilité s'expriment (ou deviennent détectables) en relation avec certaines stimulations spécifiques telles qu'une diète riche en sel, dans le cas des déterminants de la réponse au stress. C'est d'ailleurs une des premières études sur les déterminants génétiques de la réponse au stress (Hamet et al., 2002b). Le Tableau II présente les QTL de stress pertinents à l'étude de l'HTA essentielle.

**Tableau II. QTL de stress pertinents pour l'étude de l'HTA essentielle**

Phénotypes	Méthodes	Références	Chr.	Position	Homologies (souris/rats)	Gènes Candidats
HTA	RFLP	(Hamet et al., 1992)	20 du rat	0.8 cM	chr.17(18.95 cM)	TNF $\alpha$ /Hsp70
Hypertrophie cardiaque	F2 (SHRxWKY) RI (BNxSHR)	(Hamet et al., 1996)	12 du rat	3000 cR	chr.9(29 cM)	Hsp27
Augmentation de la température (endotoxine)	Congéniques	(Pausova et al., 1999a)	20 du rat	0.8 cM	chr.17(19 cM)	TNF $\alpha$ /Hsp70
Augmentation de la température (immobilisation)	RI (BNxSHR)	(Dumas et al., 2000a)	10 du rat 12 du rat Y du rat	43.5 cM 3000 cR ?	chr.11(35 cM) chr.9(29 cM)	myh3 Hsp27
Expression des hsp(s)	RI (BNxSHR)	(Dumas et al., 2000b)	7 du rat	q33-q34	chr.15(43 cM)	HSTF1
HTA sensible au sel, par plétismographie	BC (A/JxC57BL6J)	(Sugiyama et al., 2001)	4 de souris 6 de souris	18-38 cM (Bpq3) 66-80 cM (Bpq5)	chr.5q23-q31 chr.4q22	Npr2 ((Deng, Dene, Pravenec, & Rapp, 1994); (Garrett et al., 1998b)) Gnb3 (Siffert et al., 1998)
HTA par plétismographie	F2 (BPH/2xBPL/1)	(Wright et al., 1999)	10 de souris	4-48 cM	chr. 6q, 7q, 10q, 19p, 21q, 22q	IGF1 (Tivesten, Bollano, Andersson, & et al., 2002)

Tableau II. QTL de stress pertinents pour l'étude de l'HTA essentielle (... suite)

Phénotypes	Méthodes	Références	Chr.	Position	Homologies (souris/rats)	Gènes Candidats
«Airpuff startle reaction» bradycardie (1eressai) tachycardie (essais suivants)	RI (BNxSHR)	(Jaworski et al., 2002)	2 du rat	q24-q34	chr.3 (48.4 cM)	ATP-1 $\alpha$ 1 (Samani et al., 1996) Système Cholinergique (Taylor, Holloway, & Printz, 1994)
TA de base			1 du rat	D1Rat287-D1Rat292 (Chr.1q41)	chr.7 (62; 69.1 cM)	Wr ( <a href="http://www.jax.org">www.jax.org</a> ) IGF2
			8 du rat	D8mgh9-D8Rat40	chr.9 (28 cM)	Drd2 (Garrett, Saad, Dene, & Rapp, 2000)
			10 du rat	D10Rat26-D10Rat267	chr.11 (45-65 cM)	ACE; NO synthase (Garrett et al., 1998b)
Effet du stress sur la TA			6 du rat	D6Rat80-D6Rat171	?	sans lien connu avec HTA
Augmentation de la TA	Association	(Nakano et al., 1997)				
Hypertrophie cardiaque	Association	(Sasaki et al., 1996)	Chr.17q23 (humain)	Chr. 10 (82.5 cM) du rat	chr.11 (65 cM)	ACE ((Jacob et al., 1991);(Hilbert et al., 1991))
Dommages rénaux	Association	(Haas et al., 1998)				



**Légende du Tableau II.** HTA : hypertension; Hsp : protéine de choc thermique (heat shock); TA : tension artérielle; RFLP : restriction fragment length polymorphism; SNPs : single nucleotide polymorphisms; F2 : hybrides de seconde génération filiale; RI : recombinant inbred ou recombinantes consanguines; BC : backcross ou rétro-croisement; TNF : tumor necrosis factor ; myh : myosin heavy chain ; HSTF : facteur de transcription des Hsp(s) ; Npr : récepteur du peptide natriurétique atrial; Gnb : guanine nucleotide binding protein; IGF : insulin growth factor; ATP-1 $\alpha$ 1 : transporteur polypeptidique sodium/potassium-adenosinetriphosphatase ; Wr : résistance à la Warfarin; ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine; NO : oxyde nitreux; Drd2 : récepteur dopaminergique d2;  $\beta$ -2 AR : récepteur adrénérgique  $\beta$ 2.

## **1.2. Fondements méthodologiques**

### **1.2.1. Modèles animaux génétiquement hypertendus**

La majorité des modèles animaux pertinents pour l'étude de l'HTA sont des lignées consanguines de rongeur sélectionnées en fonction de leur TA. Une revue exhaustive des souches disponibles a été faite (Rapp, 2000). Bien que la vaste majorité des publications concernent les rats spontanément hypertendus (SHR); nous prendrons l'exemple des souris spontanément hypertendues (SHM ou BPH, pour *blood pressure high*) pour décrire la production de ces lignées. Les SHM (Schlager, 1974) ont été développées en sélectionnant les souris avec TA élevée, basse ou normale à partir du croisement aléatoire de huit souches consanguines d'origine différente (LP/J, SJL/J, BALB/cJ, C57BL/J, 129/J, CBA/J, RF/J et BDP/J), poursuivi par sélection positive jusqu'à la stabilisation de l'expression des phénotypes de TA (hypertendue, hypotendue, normotendue), pour ensuite produire des souches consanguines (*inbred*), en reproduisant frères et sœurs de même phénotype pendant plus de 20 générations. Par ailleurs, l'étude des souches consanguines est l'équivalent expérimental des études sur les jumeaux humains; par contre, elle a pour avantages de contourner le problème de l'hétérogénéité génétique des populations humaines, et d'avoir un meilleur contrôle sur les facteurs environnementaux.

### **1.2.2. Pertinence des modèles dérivés des souches consanguines A/J et C57Bl/6J pour l'étude des phénotypes liés au stress**

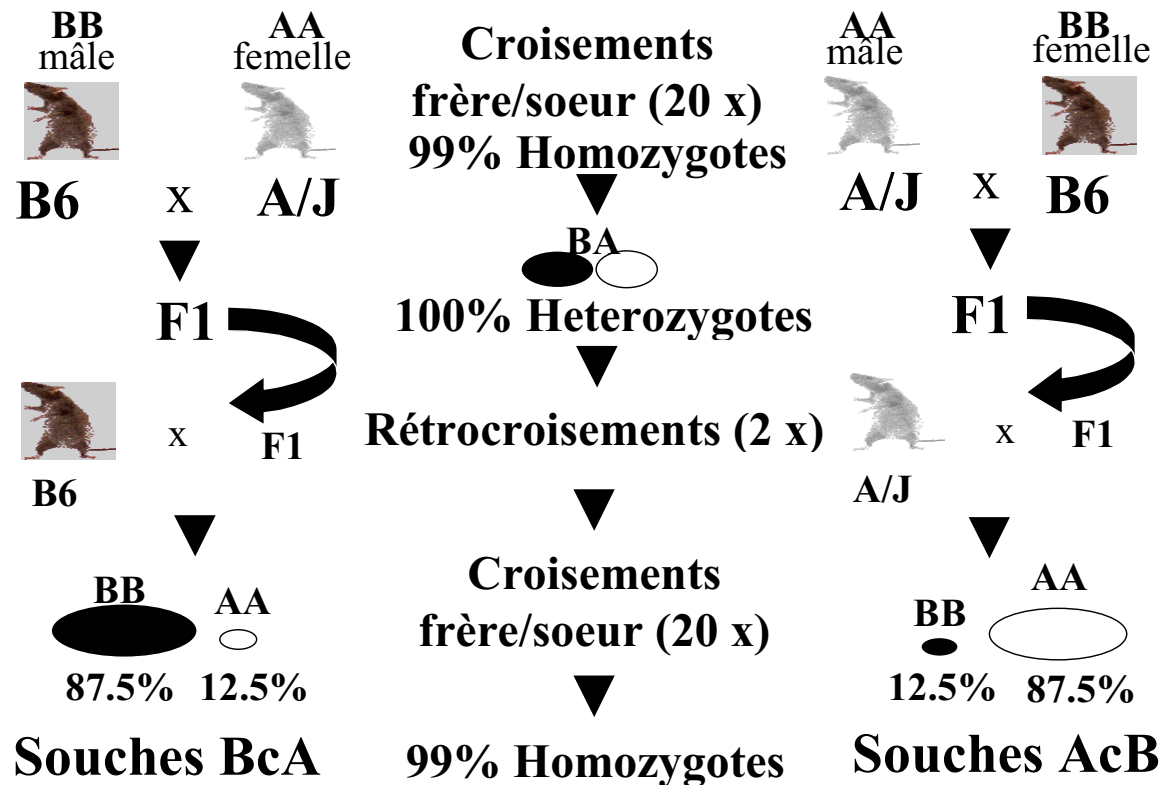
Nous avons choisi d'évaluer le comportement des souches consanguines A/J et C57Bl/6J pour plusieurs raisons. Des différences ont été décrites entre ces souches concernant les épreuves comportementales d'anxiété ((Flint et al., 1995); (Flint, 2003); (Garrett, Niekrasz, Haque, Parker, & Seale, 1998a); (Mathis, Paul, & Crawley, 1994), (Mathis et al., 1995); (Trullas et al., 1993); (Turri, Talbot, Radcliffe, Wehner, & Flint, 1999)) et d'apprentissage spatial (*place learning*) ((Crabbe, Wahlsten, & Dudek, 1999); (Crawley et al., 1997); (Owen, Logue, Rasmussen, & Wehner, 1997)).

A/J et C57Bl/6J diffèrent également dans leur réponse au stress d'immobilisation ou à l'injection d'endotoxine (Pausova, Richard, Dumas, Tremblay, & Hamet, 1999c) et dans leur susceptibilité à l'HTA induite par le sel (Sugiyama et al., 2001). Un des objectifs est donc de reprendre l'étude de Dumas et al. (Dumas et al., 2000a) chez la souris, dans le but de confirmer ou de préciser nos QTL de la température corporelle en réponse au stress d'immobilisation obtenus chez le rat, avec une diète riche en sel. Nous avons choisi la mesure de la température corporelle interne (*core temperature*) par radio télémétrie comme paramètre de la susceptibilité au stress, en partie parce que la mesure de la TA par radio télémétrie n'était pas encore disponible chez la souris lors de l'initiation du projet. La mesure de la température corporelle interne décrit des réponses similaires en réponse aux stress thermique, d'immobilisation (McMurtry & Wexler, 1981) ou à l'injection d'endotoxine (Pausova et al., 1999b). De plus, la télémétrie constitue une méthode non invasive de premier choix qui permet de distinguer les effets attribuables au stress ((Morley, Conn, Kluger, & Vander, 1990); (Butz & Davisson, 2001)).

Enfin, nous avons un accès privilégié au modèle génétique des RCS dérivées du croisement de A/J et C57Bl/6J, pour lequel peu de données comportementales ont été publiées (Jooper, Zarate, Rouleau, Skamene, & Boksa, 2002).

Le modèle des recombinantes congéniques (RCS pour *Recombinant Congenic Strains*), que nous avons utilisé, est une combinaison des modèles des souches recombinantes consanguines et des souches congéniques. Les principes d'application des RCS ont été développées par Demant pour la dissection de traits polygéniques (Demant & Hart, 1986); plus précisément, pour étudier les multiples facteurs de susceptibilité au cancer. Ce modèle a été repris par le groupe de Emil Skamene (Hôpital Général de Montréal de l'Université McGill) en rétro croisant à deux reprises la première génération issue du croisement de A/J et C57Bl/6J avec l'une ou l'autre de celles-ci, puis en fixant les souches obtenues par croisements consanguins sur plus de 25 générations (Fortin et al.,

2001). Ainsi, chaque lignée possèdera un agencement particulier de 12.5% du génome d'un des parents sur le background de l'autre et vice versa (fig.1).



**Figure 1. Schéma des croisements nécessaires à la production des RCS**

Ce modèle s'avère particulièrement utile dans le cas des phénotypes comportementaux pour lesquels il est statistiquement plus efficace de comparer des souches plutôt que des individus. L'analyse du "strain distribution pattern" ou SDP permet de calculer un indice d'héritabilité des phénotypes comportementaux (ratio des variances inter souches/intra souches, (Falconer, 1960)) et d'identifier des souches informatives dans chacun des backgrounds. Une souche sera informative dans la mesure où son phénotype est

statistiquement différent (selon un test t avec correction de Satterthwaite-Welsh sur la valeur p pour tenir compte de l'hétérogénéité des variances selon notre consultation auprès de Miguel Chagnon, expert du Service de consultation en méthodes quantitatives ou SEMQ de l'Université de Montréal), de celui de son géniteur (A/J ou C57Bl/6J). Ceci signifie qu'elle a hérité de facteur(s) génétique(s) déterminant(s) dans le 12.5% qui la caractérise sur le plan génétique. Enfin, nous pourrions identifier les régions chromosomiques impliquées en visualisant la distribution des allèles parentales sur plus de 620 marqueurs et en identifiant les régions dans lesquelles les souches informatives diffèrent (Fortin, Stevenson, & Gros, 2002).

### 1.2.3. Outils biostatistiques de détection des QTL

Les épreuves statistiques qui permettent la détection des QTL doivent évaluer l'importance de l'effet sur le trait et la localisation des marqueurs associés à cet effet (Rapp, 2000). Des ouvrages de référence ((Lynch & Walsh, 1997); (Silver, 2001)) et différents articles de revue ((Flint, 2003);(Moore et al., 2000)) ont été consultés à ce sujet. Cependant, la façon de procéder la plus simple est d'effectuer des tests t en considérant chacun des marqueurs comme une variable indépendante (Rapp, 2000). De plus, l'usage des tests t nous permet de postuler des variances inégales dans le calcul du test t (SEMQ). Les résultats seront rapportés à l'aide logarithme de la valeur de la probabilité (Flint, 2003).

Pour déterminer le seuil de signification, la valeur de  $\alpha=0.05$  peut être divisée par le nombres de tests effectués selon la correction de Bonferroni (Joobert et al., 2002). Lander et Kruglyak ont établi des normes de signification pour les études de QTL qui varient en fonction du modèle de croisement employé (Lander & Kruglyak, 1995): pour le modèle des lignées recombinantes consanguines (modèle le plus près des recombinantes congéniques), un QTL sera considéré significatif à partir d'un LOD (*logarithm of the odds*) de 3.2, selon le critère d'une fausse détection sur 20 «*genome scan*»; et un QTL sera considéré suggestif à partir d'un LOD de 1.9, selon le critère d'une fausse détection par «*genome scan*» (Flint, 2003). Bien que ces normes soient bien respectées par la plupart des publications,

l'utilisation des tests de permutations (Doerge & Churchill, 1996) sont de plus en plus employés parce qu'ils permettent de calculer un seuil de signification pour chaque phénotype et selon les paramètres du modèle de croisement utilisé (Moore et al., 2000); tant et si bien que cette option est maintenant incluse dans le logiciel spécialisé que nous avons utilisé.

Il est de rigueur d'utiliser deux méthodes d'analyse pour confirmer les QTL obtenus ((Joover et al., 2002);(Moore et al., 2000)). Nous avons donc utilisé le logiciel spécialisé de génétique quantitative, MapManager QTX (Manly, Cudmore, Jr., & Meer, 2001) pour différentes raisons : le logiciel a été développé pour fonctionner sur des ordinateurs personnels, et sur les plates-formes courantes (Macintosh et Windows); il rencontre les normes énoncées précédemment et permet une visualisation graphique des résultats qui rencontre aussi les normes de publication courantes. Il nous permet d'utiliser la variance des groupes en plus des simples moyennes, ce qui rend l'analyse plus performante (celle-ci est basée sur des régressions multiples) et comparable avec la méthode des tests t.

#### **1.2.4. Outils bio-informatiques pour la détection de polymorphismes fonctionnels**

Nous profiterons ici de l'occasion pour illustrer quelques applications découlant de l'avènement du séquençage des génomes humain (Lander et al., 2001), de la souris (Waterston et al., 2002) et du rat (Gibbs et al., 2004). Depuis, des banques de données sur les polymorphismes (*SNP* ou *single nucleotide polymorphism*) ont été constituées pour les principales souches consanguines, dont A/J et B6, si bien qu'une région de quelques centimorgans peut être décortiquée en quelques gènes candidats (Marshall et al., 2002). Plusieurs outils informatiques dits *in silico*, qui peuvent être interrogés directement sur internet. Le rationnel consiste à utiliser les séquences des souches ancestrales A/J et B6 qui sont disponibles pour le génome entier, pour tenter de débusquer les variations à l'origine des différences dans les phénotypes (Marshall et al., 2002; Hitzemann et al., 2003; Yalcin, Flint, & Mott, 2005). En outre, les éléments de régulation de l'ARNm en 5' et en 3'

correspondent à des séquences précises : la structure en tige et boucle de l'ARN (*stem-loop*) (Svoboda & Cara, 2006), les motifs de liaison aux protéines régulatrices et les cibles des microARNs répriment la traduction des ARNm en formant des barrières structurales (Wilkie, Dickson, & Gray, 2003), affectant ainsi à la baisse l'expression du gène concerné. Nous nous sommes centrés à détecter les éléments pour lesquels des ressources étaient disponibles.

Dans le premier cas du locus d'émotionnalité (Chr 1: 171-174 Mb), la liste des gènes candidats possédant des variants distincts chez AJ et B6 a été obtenu à l'aide d'un abonnement au Celera Discovery System (<http://cds.celera.com>). La traduction en paire de bases à partir de la localisation des marqueurs anonymes en bordure du QTL s'est effectuée à partir des données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dérivée de cette dernière ressource publique, la banque de données *dbSNP Genome Build 36.1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/MouseSNP.cgi>) a été interrogée pour repérer les SNPs (A/J versus B6) compris dans chacun des autres QTL, soit dans la région codante des gènes, les régions non-traduites (UTRs) en 5' et 3' et à l'intérieur de 2 kb dans la région du promoteur. Le 2 kb correspondant à la valeur par défaut dans NCBI pour définir la limite supérieure du locus d'un gène. La localisation exacte des SNPs se vérifie avec l'option de visualisation « variation » de *Map Viewer* pour la région promotrice ou avec *Blast 2 Sequences* du NCBI, pour les éléments inclus dans la séquence de l'ARNm.

En relation avec les régions d'occurrence des SNPs, soit codante ou régulatrices (promoteur et UTRs), leur valeur fonctionnelle est respectivement évaluée en fonction des domaines de la protéine (*PROSITE*) ou des motifs de l'ADN (*TRANSFAC vertebrate motif Library*); ces deux outils étant compris dans la même banque de données (<http://motif.genome.jp/>). À cette étape, les gènes candidats d'intérêt sont sélectionnés en fonction des évidences de la littérature en lien avec le phénotype, en s'appuyant principalement sur *Entrez Gene* du NCBI. Par la suite, l'impact des SNPs en 3' est estimé

avec l'interface web du programme *Vienna RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi/>). Ce-dernier permet de visualiser les changements induits par l'ensemble des SNPs (haplotype) sur la configuration de la structure secondaire de l'ARNm. De plus, un programme maison de reconnaissance de patrons de séquence a été créé afin de détecter les séquences consensus des cibles pour les ARN d'interférence (Xie et al., 2005), particulièrement aux sites des changements de structure. Enfin, les patrons de séquence AUUUA et AAUAAA ont été ajoutés à notre librairie en raison de leur importance fonctionnelle (Wilkie et al., 2003). Le motif AUUUA expliquerait l'instabilité des ARNm dans les cascades inflammatoires associées et stabilisées par la voie p38 MAPK (Saklatvala, Dean, & Clark, 2003).

### **1.2.5. Méthode de quantification de l'analyse par amplification à la PCR**

Comme nous avons déjà démontré l'expression différentielle de *HSP27* et *HSP70* dans le rein des rats hypertendus (Hamet, Malo, & Tremblay, 1991; Dumas et al., 2000b; Hamet et al., 1994); l'idée de départ fût de valider cette observation dans les souches RCS informatives. Dans cette perspective, tous les animaux ont été sacrifiés après une heure d'immobilisation, pour ensuite récolter les principaux organes (coeur, reins, foie, cerveau).

L'aspect technique de l'amplification génique par la PCR (réaction en chaîne de la polymérase) sera explicité dans l'article correspondant. Par contre, il importe d'expliquer notre méthode de quantification qui est une simplification de celle de Pfaffl (116), laquelle ajoute un niveau supplémentaire de complexité en reportant les ratios sur une échelle logarithmique.

Partant de la valeur Ct définie comme le cycle PCR précis auquel il y a production du fragment du gène à l'étude ; cette valeur doit d'abord être normalisée en regard d'un gène qui est exprimé en continu et de façon stable chez l'individu ("housekeeping gene").



Dans le cas qui nous concerne, le gène de l'ARN ribosomal 18S de la souris a été choisi à partir de la littérature. La valeur doit être également rapportée en rapport avec un contrôle. La moyenne de la souche parentale A/J (n = 4) sera utilisée pour tous les contrôles. Toutefois, une valeur d'efficacité d'amplification du gène a dû être déterminée au préalable en faisant des courbes de dilution du cDNA. La valeur finale est donc un ratio d'efficacité d'amplification (R) d'un gène à étudier (*atp1a2* par exemple) élevé à la puissance delta Ct (contrôle A/J - BcA17 par exemple) sur l'efficacité d'amplification du housekeeping gene (18S RNA) élevé à la puissance delta Ct (contrôle A/J - BcA17) selon la formule suivante :

$$R = \frac{E_{\text{gène}}^{\text{delta Ct (contrôle - gène)}}}{E_{18S}^{\text{delta Ct (contrôle - gène)}}$$

### 1.3. Énoncé des objectifs de chaque article de la thèse

Pour chacun des articles présentés, les objectifs poursuivis se décrivent comme suit:

- Compte tenu que les souris SHM montrent une concentration plus élevée de noradrénaline dans le cerveau à l'âge adulte (Schlager, Freeman, & Sustarsic, 1979); des déficits cognitifs (Elias & Schlager, 1974) et une augmentation de l'apoptose dans diverses régions cérébrales (néocortex, striatum, hippocampe et thalamus) des SHM âgées de 12 mois (Hamet et al., 1995). Les Articles 1 et 2 visent à évaluer la présence de déficits caractéristiques de la démence vasculaire tels que des troubles cognitifs, de mémoire ou d'habiletés sensori-motrices chez les souris SHM âgées de 12 mois.
- Des différences comportementales entre les souches A/J et C57Bl/6J ont été rapportées pour l'activité motrice (Crawley et al., 1997; Logue, Owen, Rasmussen, & Wehner, 1997; Mathis et al., 1994), l'anxiété (Garrett et al., 1998a; Trullas et al., 1993), l'apprentissage spatial dans le labyrinthe en T (Bertholet & Crusio, 1991; Crabbe et al., 1999) ou le labyrinthe aquatique de Morris (Crawley et al., 1997; Owen et al., 1997). Dans l'article 3, l'évaluation comportementale des souches A/J et C57Bl/6J a pour but de mettre au point un protocole, en sélectionnant les épreuves pour lesquelles ces deux souches génétiquement éloignées diffèrent le plus. Dans ces conditions, il devient théoriquement plus probable de pouvoir isoler les loci chromosomiques en cause à l'aide des croisements (Schork, Nath, Lindpainter, & Jacob, 1996).

- Les déterminants génétiques des réponses comportementale et physiologique à des stress dits psychogéniques (open-field et immobilisation) seront localisés dans les RCS. Les QTL ainsi obtenus seront comparés à ceux des autres groupes, dont les tableaux 1 et 2 présentent une synthèse en relation avec l'étude de l'HTA essentielle (Article 4).

## **Chapitre 2. ARTICLE 1**

# **ÉVALUATION NEUROBIOLOGIQUE DES SOURIS GÉNÉTIQUEMENT HYPER/HYPOTENDUES**

## **2.1.**

### **Neurobehavioral Evaluation of High Blood Pressure and Low Blood Pressure Mice**

S. THIFAUT, R. LALONDE, C.C. JOYAL, and P. HAMET

Manuscrit publié dans la revue *Psychobiology*, 27(3):415-425 (1999).

## **2.2. Abstract**

Mice chronically subjected to high blood pressure (BP) or to low BP were compared to normotensive controls in tests of exploration, motor coordination, and spatial learning at two age levels: young adult (3 months) and middle-aged (12 months). At either age, by comparison to controls, high BP mice were hyperactive in an open field but not in terms of hole-poking responses. On the contrary, low BP mice were hypoactive in the open field and in the hole-board, with the effect on the former measure being limited to the younger cohort. In either cohort, high BP mice and low BP mice were deficient in some aspects of sensorimotor testing requiring balance and equilibrium. Moreover, high BP and low BP mice had longer path lengths and escape latencies during acquisition of a hidden platform in a water maze. In the younger cohort, low BP mice had longer path lengths and escape latencies even during a visible platform version of the task, an indication of a disturbed visuomotor function. These mutants may serve as experimental models for the evaluation of beneficial antihypertensive or antihypotensive treatment on brain function.

### **2.3. Introduction**

Although in Western countries hypertension is generally controlled by available antihypertensive drugs, there is interest of developing animal models of chronic hypertension in order to compare between the potential beneficial effects of these agents on brain functions. Many hypertensive strains of rats are available (McCarty, 1983), but the behavior of spontaneously hypertensive rats (SHRs), an experimental model of essential hypertension in humans (Yamori, 1983), has been the most thoroughly studied. It has frequently been reported that the motor activity of SHRs is higher than that of the Wistar Kyoto control strain (Gentsch, Lichtsteiner, & Feer, 1987; Leaton, Cassella, & Whitehorn, 1983; Sagvolden, Hendley, & Knardahl, 1992; Whitehorn, Atwater, Low, Gellis, & Hendley, 1983) and other strains such as Wistar (Danysz et al., 1983). However, the increase of motor activity and the increase of arterial pressure in SHRs are caused by independent genes (Sagvolden et al., 1992; Whitehorn et al., 1983).

In addition to changes in motor activity, learning deficits have been reported in SHRs in some but not all tasks. For example, Knardahl & Karlsen (1984) found that SHRs had more entries into shocked areas than Wistar Kyoto rats in a multiple trial passive avoidance task under different stimulus discriminability conditions. Moreover, SHRs were impaired during the acquisition of a bar-press response (Meneses & Hong, 1998). However, other reports indicate not only a lack of a deficit but even a paradoxical improvement (Danysz et al., 1983; Widy-Tyszkiewicz, Scheel-Krüger, & Christensen, 1993). One factor that may explain these differential results is the age of the animals. The acquisition of an 8-arm radial maze task was impaired in SHRs by comparison to Sprague-Dawley rats at 12 months but not at 3 months of age (Wyss, Fisk, & van Groen, 1992). The latter result may be due to age-associated brain abnormalities (Bendel & Eilam, 1992; Ritter & Dinh, 1986) or retinopathy (Saito et al., 1992) as a direct consequence of chronic exposure to hypertension. On the other hand, ventricle volume dilation was not reversed by early

administration of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor and antihypertensive agent (Ritter, Dinh, Stone, & Ross, 1988), indicating that some indices of brain atrophy in SHR are independent of arterial pressure.

The present study describes the behavioral characteristics of a second model of hypertension, high blood pressure (BP) mice, that can be compared either to normotensive mice or to low BP mice (Schlager, 1974; Schlager, Freeman, & Sustartic, 1979). These lines were obtained from crossbreeding eight unrelated inbred strains followed by random mating with a randomly bred normotensive control group, yielding by the 24th generation high BP mice with mean blood pressure levels of 142 mm Hg, normotensive mice with levels of 102, and low BP mice with levels of 81 mm Hg (Schlager, 1981; Iwao et al., 1984). By the 37th generation, sufficient to fix the genes in each line, the mean BP values of the 3 month old high BP group (132 mm Hg) were significantly higher than the age-matched normotensive group (96 mg Hg) (Malo, Schlager, Tremblay, & Hamet, 1989). Similar values were reported in a subsequent study (Malo, Pang, Schlager, Tremblay, & Hamet, 1990).

Differences in brain neurotransmitter levels have been reported between these strains. High BP mice had higher whole brain concentrations of noradrenaline, whereas low BP mice had lower levels (Schlager et al., 1979). These brain abnormalities may be directly responsible for their altered BP levels, as this neurotransmitter has been shown to be involved in altered responses to stress (Henry, Liu, & Meehan, 1995). Since apoptotic cell death in widespread regions of the brain (neocortex, striatum, hippocampus, thalamus) and other organs have been described in high BP mice at 12 months of age (Hamet et al., 1995), we decided to evaluate their behavioral characteristics at that age with a battery comprising a wide range of functions, including motor activity, motor coordination, and spatial learning. As a basis of comparison, a separate series of mice were evaluated at the young adult stage (3 months of age). We wished to determine whether high BP mice are hyperactive, as has been reported in SHR. We also wished to determine whether high BP

mice have defects in tasks requiring balance and equilibrium and in a water maze task (Goddlett, Hamre, & West, 1992; Lalonde, 1987; Lines & Milner, 1985; Morris, Garrud, Rawlins, & O'Keefe, 1982; Sutherland & Rodriguez, 1989).

Untreated hypertension can lead to cerebrovascular disease and neuropsychological deficits, but the possible neuropsychological consequences of hypotension have not to our knowledge been investigated in human patients. Primary orthostatic hypotension appears in several syndromes and as a consequence of central and peripheral nervous system disorders or drug ingestion (Stewart, Bray, & Aguayo, 1983). In the present study, the neurobehavioral effects of chronic hypotension were directly compared to the effects of hypertension.

## **2.4. Method**

### **2.4.1. Animals**

In the first experiment, high BP (n=6), low BP (n=5), and normotensive controls (n=8), originally obtained from the laboratory of Dr. G. Schlager, were used. These mice were bred in our laboratory on the basis of brother-sister matings and were approximately 12 months of age at the start of testing. In the second experiment, 3 month-old mice were used: high BP (n=11), low BP (n=5), and controls (n=12). At no age did any mice display overt signs of neurological dysfunction. The mice in both experiments were evenly distributed in terms of sex (approximately 60% male-40% female). Mice were kept in group cages with bedding made of wooden shavings in a temperature- and humidity-controlled room, with behavioral evaluations taking place in a separate room.

### **2.4.2. Apparatus**

A transparent plastic T-maze (stem: 22 x 8.5 cm, arms 30 x 8.5 cm, wall height: 10 cm) was used for spontaneous alternation testing. Motor activity was measured in a white

opaque plastic chamber (30 cm x 25 cm, wall height: 15 cm) whose floor was separated by felt pen markings into 6 equally spaced segments. Hole poking was evaluated in a circular blue opaque plastic chamber (diameter: 30 cm) suspended at a height of 60 cm from the floor. There were 4 holes in the periphery and 1 hole in the center. Each hole had a diameter of 2.5 cm and the interhole distance was 10 cm.

Motor coordination was evaluated by means of an inclined grid, a coat-hanger, and a round bridge. The grid (38 x 38 cm, 5 squares/cm) was surrounded by a wooden frame and inclined at 45°. The coat-hanger was made of steel and was triangular in shape. The horizontal bar of the coat-hanger, placed at a height of 85 cm from a cushion-covered table, measured 40 cm in length and 2 mm in diameter, flanked by 2 diagonal bars, 19 cm in length and with an inclination of 35°. The round wooden bridge (diameter: 2 cm), placed at a height of 85 cm, measured 110 cm in length, separated into 11 equally spaced segments by means of a felt pen. The diameter was 20 cm. Either end was blocked by a barrier made of cardboard in order to prevent any escape.

Spatial learning was evaluated in an opaque plastic basin (61 x 40 cm, wall height: 22 cm) filled with a milky solution (27° C) and containing a platform, 6.5 cm in diameter, placed 1.5 cm below water level, and covered by wire-mesh for firm gripping. The height between water level and the wall was 13 cm, permitting the mice to see some of the room cues available. The pool remained in the same position relative to the room cues such as various laboratory equipment and a window. The experimenter remained in the same position on every trial.

### **2.4.3. Procedure**

Spontaneous alternation was evaluated on days 1-12. The inclined grid was performed on days 1-3, motor activity on days 4-6, the coat-hanger on days 7-9, and the round bridge on days 10-12. Acquisition of the water maze hidden platform task was



evaluated on days 14-18, retention on day 25, and visible platform training on day 26. Hole poking was assessed on days 22-23.

A 2-trial paradigm was adopted for spontaneous alternation. On day 1, the mice were placed in the stem of the T-maze with the left arm being blocked by a plastic barrier. After turning to the right, the mice were kept in the arm for 1 min, after which time they were removed and placed in a plastic container for the brief period necessary to wash and dry the maze. During the test trial, they could either choose the same arm or alternate (4-paw criterion). The arm chosen to be blocked was changed from one day to the next (left for odd numbered and right for even numbered days). Retention time was 0 min on days 1, 4, 7, and 10; 3 min on days 2, 5, 8, and 11; 10 min on days 3, 6, 9, and 12. During the 3 and 10 min retention intervals, the animals were returned to their home cage.

On days 1-3, after spontaneous alternation testing, the mice were placed in the middle of the inclined grid facing downward. Three measures were recorded: the elapsed time: 1) before the mice turned  $180^{\circ}$  to face upward (turn latencies); 2) before they reached, according to the snout criterion, the top of the grid (top latencies); 3) before they fell from the grid (fall latencies). One trial was conducted per day with a cut-off period of 1 min per trial.

On days 4-6, the number of segment crossings (4 paw criterion) in the activity chamber was measured for 4 min per day. On days 7-9, the mice were placed in the middle of the horizontal bar of the coat-hanger in an upside-down position, with care being taken that all 4 paws gripped the bar at the moment of release. The measures recorded were the elapsed time before reaching either side-bar with 2-, 3- or 4-paw criteria, together with latencies before falling (cut-off: 1 min) and the number of occasions when the half-way part or the top of the diagonal bar was reached. The animal was removed after reaching the top and a score of 60 s given for the fall latency. There were 2 trials per day with an intertrial interval of approximately 15 min.

On days 10-12, the mice were placed in the middle of the round bridge. The time spent on the bridge before falling (cut-off: 1 min) and the number of segments traversed were tabulated for 3 trials per day with an intertrial interval of 15 min.

On days 14-18, the mice were placed in the water basin near and facing the southern (S) wall. The number of quadrants traversed and the escape latencies (cut-off: 1 min) before reaching the hidden platform were counted. After 1 min, mice unable to find the platform were removed from the water and placed on it for 5 s. On trials 2-4, the mice were placed in the west (W), north (N), and east (E) positions in that order, with the position of the platform kept in the NW quadrant. There were 2 blocks of 4 trials each. The intertrial interval within a block was 10 min and between blocks 30 min. After the last day of acquisition, a retention test was given on day 25 under identical conditions but with only 1 block of 4 trials. The visible platform test was performed on day 26 with 6 trials, when the platform was lifted above water level and moved toward the NE quadrant. At that time, the basin contained clear water.

On days 22-23, the mice were put in the hole-board, and the number of pokes in the periphery and center of the board were counted for 3 min per day.

#### **2.4.4. Statistical analyses**

Analyses of variance (ANOVAs) with repeated measures and the Dunnett t-test for multiple comparisons were used. Time-dependent measures were log transformed because of the heterogeneous variances. The Mann-Whitney U test was used to evaluate significance of the alternation rate above chance.

## 2.5. Results

### 2.5.1. Spontaneous alternation

In 3 month old mice, there were only significant main factor effects [ $F(2,25)=3.76$ ,  $p < .05$  for the group and  $F(2,50)=4.6$ ,  $p < .05$  for the interval]. The alternation rate of normotensive controls was higher than that of both experimental groups, and this rate decreased as the retention interval increased for all three groups (Table 1). Control mice alternated above chance at retention intervals of 0 [ $z=2.81$ ,  $p < .01$ ] and 3 min [ $z=2.83$ ,  $p < .01$ ], but not at 10 min ( $p > .05$ ). On the contrary, low BP mice did not alternate above chance at any interval. High BP mice alternated above chance only at the 0-min interval [ $z=2.14$ ,  $p < .05$ ]. A significant group effect was observed for choice latencies [ $F(2,27)=44.68$ ,  $p < .001$ ], as high BP mice had lower choice latencies than controls [Dunnett  $t(2,25)=5.59$ ,  $p < .01$ ], which in turn had lower latencies than low BP mice [ $t(2,25)=4.97$ ,  $p < .01$ ].

In 12 month old mice, there were no significant effects in terms of number of alternations [for group  $F(2,16)=2.42$ ,  $p > .1$ , and interval main factors  $F(2,32)=1.02$ ,  $p > .1$ ], or the interaction [ $F(4,32)=0.65$ ,  $p > .1$ ]. None of the groups alternated above chance at any retention interval ( $p > .05$ , Table 1). On the contrary, a significant group effect was observed for choice latencies [ $F(2,18)=29.49$ ,  $p < .001$ ]. High BP mice had lower choice latencies than normotensive mice [Dunnett  $t(2,16)=6.19$ ,  $p < .01$ ], but the latter did not differ from low BP mice [ $t(2,16)=1.64$ ,  $p > .05$ ].

### 2.5.2. Inclined grid

In 3 month old mice, significant group effects occurred for turn latencies [ $F(2,27)=10.41$ ,  $p < .001$ ] and top latencies [ $F(2,27)=4.56$ ,  $p < .05$ ], but not for fall latencies, as no mice fell off the grid (Table 2). Low BP mice were slower before turning upward than

controls ( $p < .01$ ). They were also slower before reaching the top ( $p = .05$ ). High BP mice had normal values on these two measures ( $p > .05$ ).

In 12 month old mice, significant group effects occurred for top latencies [ $F(2,18)=9.32, p < .01$ ], but not for turn latencies [ $F(2,18)=0.17, p > .1$ ] or fall latencies, as no mice fell off the grid (Table 2). High BP mice took less time before reaching the top of the grid than controls ( $p < .01$ ), whereas low BP mice did not differ from controls ( $p > .05$ ).

### **2.5.3. Coat-hanger**

In 3 month old mice, there were significant group effects for all 6 measures according to 1-way ANOVAs ( $p < .05$ ). High BP mice but not low BP mice had higher latencies before reaching the side-bar according to all three paw criteria ( $p < .05$ , Table 3). On the other hand, low BP mice but not high BP mice fell off the apparatus more quickly than normotensive mice ( $p < .01$ ). Both high BP and low BP mice reached the half-way point,  $p < .05$  or the top of the diagonal bar less frequently than controls ( $p < .01$ ).

In 12 month old mice, there were significant group effects for 5 out of the 6 measures according to 1-way ANOVAs ( $p < .001$ ). High BP mice and low BP mice had higher latencies before reaching the side-bar than controls according to all three paw criteria ( $p < .01$ , Table 3). In addition, HBP and LBP mice reached the half-way point or the top of the diagonal bar less frequently than did controls ( $p < .01$ ). However, there was no intergroup difference in terms of latencies before falling, [ $F(2,18)=0.59, p > .1$ ].

### **2.5.4. Round bridge**

In 3 month old mice, a significant group effect on latencies before falling (Fig. 1) was revealed [ $F(2,25)=52.08, p < .001$ ]. The same pattern emerged for segments crossed ( $p < .05$ ). Low BP mice fell more quickly and crossed fewer segments than controls ( $p < .01$ ), while high BP mice had normal fall latencies ( $p > .05$ ), but crossed fewer segments ( $p < .05$ ).

In 12 month old mice, a significant group effect was found for latencies before falling (Fig. 1) [ $F(2,16)=9.89$ ,  $p < .01$ ], together with a day effect [ $F(2,32)=3.69$ ,  $p < .05$ ] in the absence of an interaction [ $F(4,32)=1.23$ ,  $p > .1$ ]. High BP mice fell more quickly from the beam than normotensive mice ( $p < .01$ ). This was not the case for low BP mice ( $p > .1$ ). Latencies increased across days of testing (Fig. 1). For segments crossed, the interaction was significant ( $p < .01$ ). High BP mice crossed fewer segments than normotensive mice on days 2 and 3 ( $p < .01$ ), but not on day 1. Low BP mice crossed fewer segments only on day 2 ( $p < .01$ ).

### **2.5.5. Motor activity**

In 3 month old mice, a significant interaction was observed ( $p < .01$ ). By comparison to normotensive controls, high BP mice crossed more segments ( $p < .01$ ), whereas low BP mice crossed fewer segments ( $p < .05$ ), the difference being more evident on the first day of testing (Fig. 2).

In 12 month old mice, there were significant effects for both main factors [ $F(2,16)=38.35$ ,  $p < .001$  for group and  $F(2,32)=4.23$ ,  $p < .05$  for day], but not for the interaction [ $F(4,32)=0.36$ ,  $p > .1$ ]. By comparison to controls, high BP mice crossed more segments ( $p < .01$ ). On the contrary, low BP mice did not differ from controls ( $p > .05$ , Fig. 2). All three groups had lower activity levels across days of testing, a sign of intersession habituation.

### **2.5.6. Hole poking**

In 3 month old mice, for pokes in the periphery of the hole-board (Fig. 3), there were significant main factor effects [ $F(2,25)=48.42$ ,  $p < .001$  for groups and  $F(1,25)=11.4$ ,  $p < .01$  for days], as low BP mice ( $p < .01$ ) and high BP mice ( $p < .05$ ) had fewer peripheral

hole pokes than controls. A lower number of pokes was also detected in the center of the board [ $F(2,25)=8.67$ ,  $p < .01$ ], but only by low BP mice ( $p < .01$ ).

In 12 month old mice, for pokes in the periphery and in the center of the hole-board, group effects were found, as low BP mice but not high BP mice had fewer pokes than controls ( $p < .01$ ).

### **2.5.7. Water maze**

For 3 month old mice, in terms of quadrant entries, a 3 x 10 ANOVA (3 independent groups, 10 trial blocks) revealed a significant interaction [ $F(18,225)=3.25$ ,  $p < .001$ ], as controls acquired the task faster than the other 2 groups (Fig. 4). A significant group effect emerged during retention testing [ $F(2,25)=5.71$ ,  $p < .01$ ] (Table 4), as the control group traversed fewer quadrants than the other 2 groups ( $p < .05$ ). During visible platform testing (Table 4), there was a significant group effect [ $F(2,25)=4.04$ ,  $p < .05$ ], as low BP mice, but not high BP mice, crossed more quadrants than controls ( $p < .05$ ).

In terms of escape latencies, the interaction was significant ( $p < .001$ ), as controls showed evidence of faster learning according to this measure as well (Fig. 4). During retention, the escape latencies were higher only in high BP mice ( $p < .01$ ). During visible platform testing, the escape latencies of high BP ( $p < .01$ ) and low BP ( $p < .05$ ) mice were higher than those of controls.

For 12 month old mice, in terms of quadrant entries during invisible platform training, a 3 x 10 ANOVA (3 independent groups, 10 trial blocks) revealed significant effects only for both main factors [ $F(2,16)=8.15$ ,  $p < .01$  for groups,  $F(9,144)=3.42$ ,  $p < .001$  for trial blocks]. The control group was superior to the other 2 groups, the terminal performance of these groups not exceeding day 1 values and with considerable day to day fluctuations in performance (Fig. 5). However, no significant group effect emerged during retention testing [ $F(2,18)=0.81$ ,  $p > .1$ ], due in part to the poor performance of controls

(Table 4). During visible platform testing (Table 4), no intergroup difference was discerned [ $F(2,18)=0.74, p> .1$ ].

In terms of escape latencies, both main factors and the interaction were significant ( $p< .001$ ), as the control group reached the hidden platform sooner than the other 2 groups, the effect being more potent late in training (Fig. 5). During retention, a significant group effect emerged [ $F(2,28)=8.73, p< .01$ ], as the escape latencies of both experimental groups were higher ( $p< .001$ ). On the contrary, during visible platform testing, no intergroup difference was observed, [ $F(2,18)=1.52, p> .1$ ].

## **2.6. Discussion**

A great variety of behavioral abnormalities were detected in mice with chronic exposure to hypertension or hypotension. High BP mice were hyperactive and were deficient in some aspects of motor coordination and water maze learning. These results indicate the potential value of the high BP mouse as an experimental model of brain dysfunction caused by hypertension. It remains to be determined whether these deficits are directly caused by hypertension. If such is the case, it will be possible to compare between the beneficial effects of various antihypertensive drugs on brain function.

Significant intergroup differences were found in three different facets of exploration behavior, namely horizontal motor activity, hole poking, and spontaneous alternation. The spontaneous alternation rate of young controls, as for other strains (e.g. Lalonde, Joyal, & Botez, 1993), was above chance at the shortest retention intervals, indicating a motivation to avoid the most recently explored maze arm and intact spatial or kinesthetic memory. By contrast, the spontaneous alternation rate of old controls was not above chance. Since no alternation was observed even at the shortest retention interval, this result implies an age-associated defect in exploratory tendencies (Lalonde & Badescu, 1995) rather than in memory.

Irrespective of age, high BP mice had higher levels of motor activity in the open field and shorter response latencies during spontaneous alternation testing. By contrast, the results in low BP mice differed according to age. Low BP mice had lower levels of motor activity in the open field and longer response latencies during spontaneous alternation testing than controls only at 3 months of age. The age-related decrease of motor activity and slowing of response speed in controls was proportionately worse than that of the hypotensive group. Thus, exposure to hypotension at a young age may decrease arousal levels, but this effect is stabilized as a function of time, at least for those animals surviving to middle age. Although we have not formally determined intergroup survival times, it appears that either group with abnormal BP have higher death rates than controls up to 12 months of age. Therefore, the older cohorts represent the fittest sample of low or high BP mice. Nevertheless, low BP mice had a lower number of hole-poke responses at the periphery and at the center of the hole-board than controls for both young and older age groups. By contrast to general ambulation, hole-poking reflects selective attention to specific environmental stimuli.

The hyperactive phenotype of high BP mice reproduces that seen in SHR<sub>s</sub> (Danysz et al., 1983; Gentsch et al., 1983; Knardahl & Chindaduangratin, 1984; Leaton et al., 1983; Sagvolden et al., 1992; Whitehorn et al., 1983). There are some indications that hyperactivity is accompanied by lower levels of anxiety in SHR<sub>s</sub>. For example, Gentsch et al. (1987) reported that SHR<sub>s</sub> had more entries than Wistar Kyoto rats into a central square of a walled open field and a higher open arm/total arm visit ratio in an elevated  $\pm$ -maze. Moreover, SHR<sub>s</sub> had shorter latencies before approaching an unfamiliar object placed in the middle of an unfamiliar open field than Wistar Kyoto rats or Wistar rats (Delini-Stula & Hunn, 1985). However, there were no intergroup differences in the amount of time spent exploring the novel object and in the number of center crossings in that experiment.

In the present study, high BP mice did not differ from controls in terms of the number of hole-pokes in the central part of the hole-board. All groups explored the



peripheral part of the hole-board more often than the central part, indicative of the typical wall-hugging tendency of mice. On the contrary, a reduction in the number of peripheral hole-pokes was observed in high BP mice at 3 but not at 12 months of age. This hypoexploration is in marked contrast to their increased level of general locomotion in the open field and may be ascribed to impaired selective attention to specific environmental stimuli.

In addition to changes in exploration patterns, deficits of motor coordination were observed in mice with abnormal BP on the inclined grid, coat-hanger, and bridge tests. Low BP mice were slower before turning upward and before reaching the top of the inclined grid than normotensive controls at 3 months but not at 12 months of age. Moreover, the shorter latencies before falling from the coat-hanger and from the bridge by low BP mice were limited to 3 months of age. This pattern is similar to that described above for the motor activity and choice latency measures, indicating stabilization of the motor impairment as a function of age. By contrast, low BP mice had fewer segment crossings on the bridge irrespective of age. A different pattern of results emerged for latencies before reaching the side-bars on the coat-hanger, as the deficit in low BP mice was only observed in the older cohort. Although longer movement times on the inclined grid and on the coat-hanger and a reduction of segment crossings on the bridge may be ascribed to sluggishness, the shorter latencies before falling from the latter two apparatus indicate postural deficits. One possibility is that chronic hypotension causes dizziness in these tests. Another possibility is that hypotension causes chronic neurochemical alterations of those brain regions necessary for balance and equilibrium despite the absence of neurological signs such as ataxia.

Shorter latencies before falling were also observed in high BP mice, but this impairment was limited to the bridge test and only for the older animals. Nevertheless, despite normal latencies before falling, high BP mice traversed fewer segments on the bridge and had longer movement times on the coat-hanger at a young age. These deficits cannot be ascribed to hypoarousal, as the same mice were hyperactive in the open field.

Instead, these results indicate deficits of motor coordination despite the absence of ataxia or tremor.

In the young cohort, low BP mice were impaired relative to controls on both the hidden and visible platform versions of the water maze. By contrast, in the older cohort, their impairment was limited to the hidden platform version. Thus, in a similar fashion to motor activity and to some measures of motor coordination, the navigational deficit in hypotensive mice appears early and is not aggravated during the course of aging. It remains to be determined whether these neurobehavioral abnormalities are directly attributable to hypotension or to altered genes independent of those controlling BP.

As in low BP mice, differential effects in terms of aging were observed for high BP mice in the water maze task. Visible platform performance was impaired in high BP mice only at a young age while acquisition of the hidden platform version was impaired at either age. The visible platform impairment was limited to escape latencies and not to distance travelled, indicative of slowed responding. By contrast, both quadrant entries and escape latencies were higher than controls during spatial learning, indicative of a directional deficit. It is possible that chronic exposure to hypertension causes abnormalities in those brain regions implicated in place learning such as the hippocampus (Morris et al., 1982) or the cerebellum (Goodlett et al., 1982; Lalonde, 1987). On the other hand, Elias & Schlager (1974) determined that those genes responsible for the poor performance of high BP mice in a two-arm maze task were not the same as those responsible for causing hypertension. We intend to pursue this inquiry by determining the genetic basis of the spatial deficits in these mice.

## **2.7. Acknowledgments**

S.T. received a doctoral scholarship from the Canadian Heart and Stroke Foundation.

## 2.8. References

- BENDEL, P., & EILAM, R. (1992). Quantitation of ventricular size in normal and spontaneously hypertensive rats by magnetic resonance imaging. *Brain Research*, 574, 224-228.
- DANYSZ, W., PLAZNIK, A., PUCILOWSKY, O., PLEWAKO, M., OBERSZTYN, M., & KOSTOWSKI, W. (1983). Behavioral studies in spontaneously hypertensive rats. *Behavioral & Neural Biology*, 39, 22-29.
- DELINI-STULA, A., & HUNN, C. (1985). Neophobia in spontaneous hypertensive (SHR) and normotensive control (WKY) rats. *Behavioral & Neural Biology*, 43, 206-211.
- ELIAS, M.F., & SCHLAGER, G. (1974). Discrimination learning in mice genetically selected for high and low blood pressure: initial findings and methodological implications. *Physiology & Behavior*, 13, 261-267.
- GENTSCH, C., LICHSTEINER, M., & FEER, H. (1987). Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. *Behavioural Brain Research*, 25, 101-107.
- GOODLETT, C.R., HAMRE, K.M., & WEST, J.R. (1992). Dissociation of spatial navigation and visual guidance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Behavioural Brain Research*, 47, 129-141.
- HAMET, P., RICHARD, L., DAM, T.-H., TEIGER, E., ORLOV, S.N., GABOURY, F., & TREMBLAY, J. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*, 26, 642-648.

- HENRY, J.P., LIU, J., & MEEHAN, W.P. (1995). Psychosocial stress and experimental hypertension. In: J.H. Laragh and B.M. Brenner (Eds.) *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management* (pp. 905-921). New York: Raven Press.
- IWAO, H., NAKAMURA, N., KIM, S., IKEMOTO, R., YAMAMOTO, K. & SCHLAGER, G. (1984). Renin-angiotensin in genetically hypertensive mice. *Japanese Circulation Journal*, 48, 1270-1279.
- KNARDAHL, S., & CHINDADUANGRATIN, C. (1984). Residential-maze behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behavioral & Neural Biology*, 41, 84-89.
- KNARDAHL, S., & KARLSEN, K. (1984) Passive-avoidance behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behavioral & Neural Biology*, 42, 9-22.
- LALONDE, R. (1987). Exploration and spatial learning in staggerer mutant mice. *Journal of Neurogenetics*, 4, 285-292.
- LALONDE, R., & BADESCU, R. (1995). Exploratory drive, frontal lobe function and adipisia in aging. *Gerontology*, 41, 134-144.
- LALONDE, R., JOYAL, C.C., & BOTEZ, M.I. (1993). Delayed spontaneous alternation in lurcher mutant mice. *Psychobiology*, 21, 139-141.
- LEATON, R.N., CASSELLA, J.V., & WHITEHORN, D. (1983). Locomotor activity, auditory startle and shock threshold in spontaneously hypertensive rats. *Physiology & Behavior*, 31, 103-109.
- LINES, C.R., & MILNER, A.D. (1985). A deficit in ambient visual guidance following superior colliculus lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*, 99, 707-716.
- MALO, D., SCHLAGER, G., TREMBLAY, J., & HAMET, P. (1989). Thermosensitivity, a possible new locus involved in genetic hypertension. *Hypertension*, 14, 121-128.

- MALO, D., PANG, S.C., SCHLAGER, G., TREMBLAY, J., & HAMET, P. (1990). Decrease of blood pressure in spontaneously hypertensive mice by heat treatment. *American Journal of Hypertension*, 3, 400-404.
- McCARTY, R. (1983). Stress, behavior and experimental hypertension. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 7, 493-502.
- MENESES, A., & HONG, E. (1998). Spontaneously hypertensive rats: a potential model to identify drugs for treatment of learning disorders. *Hypertension*, 31, 968-972.
- MORRIS, R.G.M., GARRUD, P., RAWLINS, J.N.P., & O'KEEFE, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 292, 681-683.
- RITTER, S., & DINH, T.T. (1986). Progressive postnatal dilation of brain ventricles in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*, 370, 327-332.
- RITTER, S., DINH, T.T., STONE, S., & ROSS, N. (1988). Cerebroventricular dilation in spontaneously hypertensive rats (SHRs) is not attenuated by reduction of blood pressure. *Brain Research*, 450, 354-359.
- SAGVOLDEN, T., HENDLEY, E.D., & KNARDHAL, S. (1992). Behavior of hypertensive and hyperactive rat strains: hyperactivity is not unitarily determined. *Physiology & Behavior*, 52, 49-57.
- SAITO, N., NODA, K., YAMASAKI, Y., MATSUBAYASHI, K., OKADA, T., & NISHIYAMA, S. (1992). Cataracta in hypertensive rats. In J. Sassard (Ed.). *Genetic hypertension* (pp. 413-415). London: John Libbey Eurotext.
- SCHLAGER, G. (1974). Selection for blood pressure levels in mice. *Genetics*, 76, 537-549.
- SCHLAGER, G. (1981). The genetically hypertensive mouse. *Trends in arterial hypertension*, 17, 321-331.

- SCHLAGER, G., FREEMAN, R., & SUSTARTIC, S.S. (1979). Brain catecholamines and organ weight of mice genetically selected for high and low blood pressure. *Experientia*, 16, 67-69.
- STEWART, J.D., BRAY, G.M., & AGUAYO, A.J. (1983). Diseases of the autonomic nervous system. In R.N. Rosenberg (Ed.). *The clinical neurosciences* (pp 503-527). London: Churchill Livingstone.
- SUTHERLAND, R.J., & RODRIGUEZ, A.J. (1989). The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 37, 57-79.
- WHITEHORN, D., ATWATER, D.G., LOW, W.C., GELLIS, J.E., & HENDLEY, E.D. (1983). Independence of blood pressure and locomotor hyperactivity in normotensive and genetically hypertensive rat. *Behavioral and Neural Biology*, 37, 357-361.
- WIDY-TYSZKIEWICZ, E., SCHEEL-KRUGER, J., & CHRISTENSEN, A.V. (1993). Spatial navigation learning in spontaneously hypertensive, renal hypertensive and normotensive Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 54, 179-185.
- WYSS, J.M., FISK, G., & VAN GROEN, T. (1992). Impaired learning and memory in mature spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*, 592, 135-140.

Table I. Mean Two-Trial Spontaneous Alternation Percentage and Mean (S.E.) Choice Latencies Summed over Days in a T-maze

Groups	Retention interval (min)		Latencies	
	0	3	10	(s)
12 month old				
high BP	54%	46%	50%	116 (25)+
low BP	40%	30%	55%	638 (33)
controls	59%	59%	63%	455 (56)
3 month old				
high BP	61%*	56%	30%	50 (8)+
low BP	50%	35%	50%	542 (41)+
controls	71%*	65%*	56%	165 (24)

\* $p < .05$  vs chance

+ $p < .01$  vs controls

Table II. Mean (S.E.) Latencies in S before Turning, Reaching the Top, and Falling Summed over Days on an Inclined Grid

Groups	Turn	Top	Fall
12 month old			
high BP	31 (6)	49 (10)+	180 (0)
low BP	35 (8)	137 (18)	180 (0)
controls	43 (12)	117 (18)	180 (0)
3 month old			
high BP	20 (3)	57 (10)	180 (0)
low BP	53 (11)+	124 (17)*	180 (0)
controls	16 (2)	69 (10)	180 (0)

\*  $p = .05$  vs controls

+ $p < .01$  vs. controls



Table III. Mean (S.E.) Latencies in S before Reaching the Diagonal Bar according to 2-, 3-, or 4-Paw Criteria, Latencies before Falling and Frequencies of Reaching the Half-Way Point or of the Top of the Bar on the Coat-Hanger

Groups	2-paw	3-paw	4-paw	Half-way	Top	Fall
12 month old						
high BP	297+	324+	330+	1+	1+	287
	(25)	(18)	(18)	(.7)	(.6)	(24)
low BP	213+	310+	319+	.8+	.4+	319
	(31)	(31)	(24)	(.5)	(.2)	(24)
controls	101	170	184	4	4	312
	(22)	(19)	(21)	(.3)	(.5)	(18)
3 month old						
high BP	265+	284*	295*	1+	.2+	359
	(24)	(21)	(18)	(.3)	(.1)	(1)
low BP	201	271	286	2*	1+	280+
	(48)	(41)	(39)	(1)	(1)	(35)
controls	149	184	200	4	3	358
	(20)	(22)	(23)	(.4)	(.5)	(2)

\*p< .05 vs controls

+p< .01 vs. controls

Table IV. Mean (S.E.) Quadrant Entries and Escape Latencies in S during Retention of Invisible Platform and Visible Platform Training

Groups	Retention		Visible platform	
	Quadrants	Latencies	Quadrants	Latencies
12 month old				
high BP	94 (28)	179+ (26)	26 (3)	112 (31)
low BP	80 (13)	216+ (12)	27 (7)	113 (30)
controls	54 (23)	70 (28)	34 (6)	62 (13)
3 month old				
high BP	32* (4)	78+ (12)	19 (3)	47* (7)
low BP	33* (10)	50 (16)	40* (20)	72+ (43)
controls	16 (2)	29 (4)	12 (1)	16 (2)

\*p< .05 vs. controls

+p< .01 vs. controls

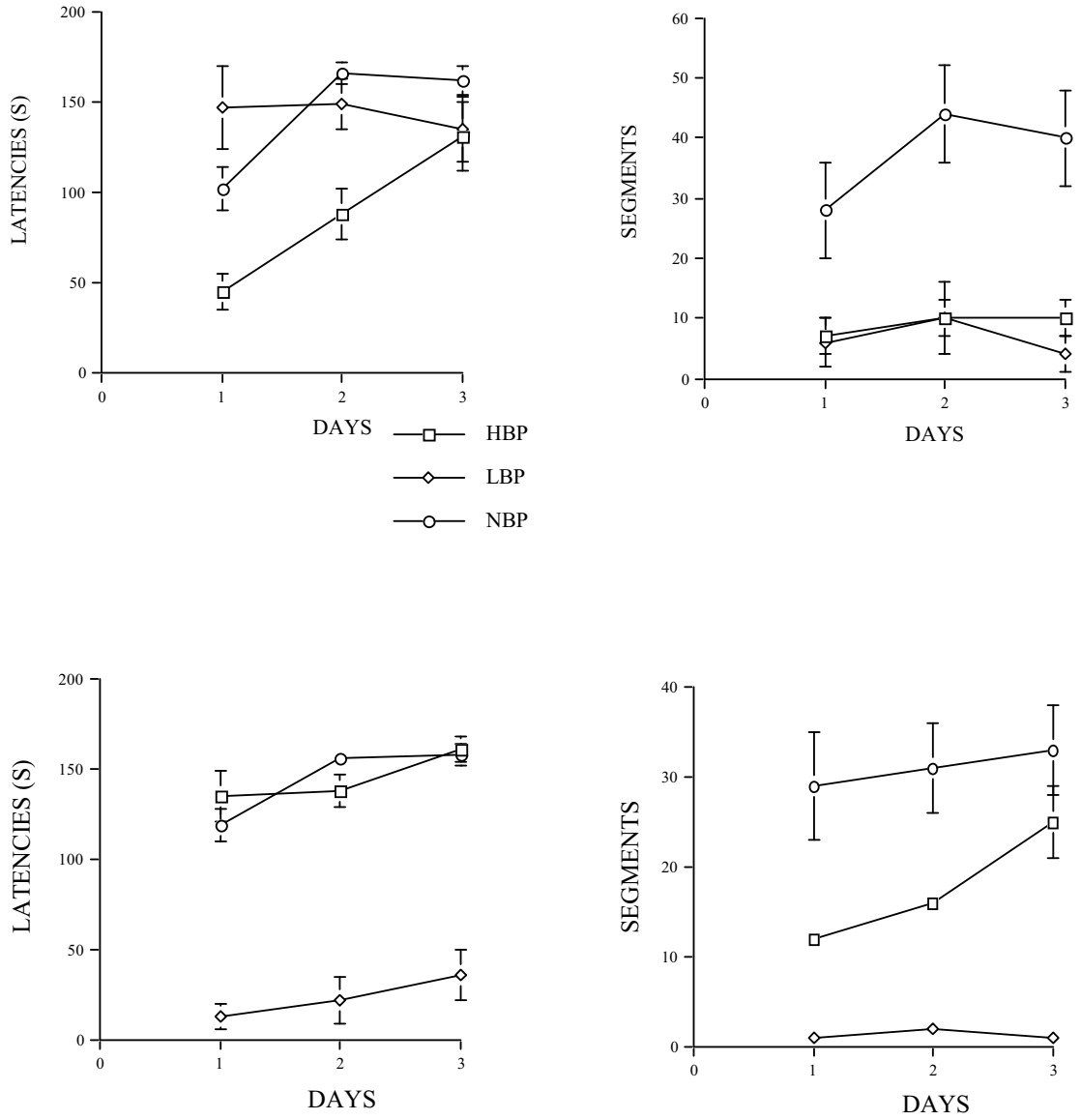


FIG.-1. Latencies before falling in s and segments (means and S.E.) traversed on the round bridge in aged and young cohorts.

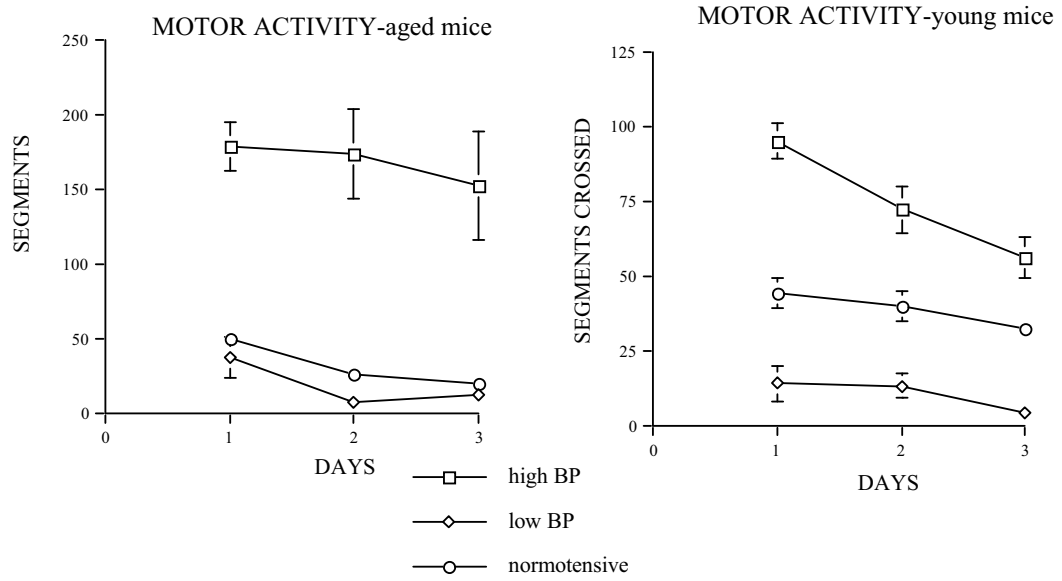


FIG.-2. Horizontal motor activity (means and S.E.) of aged and young cohorts.

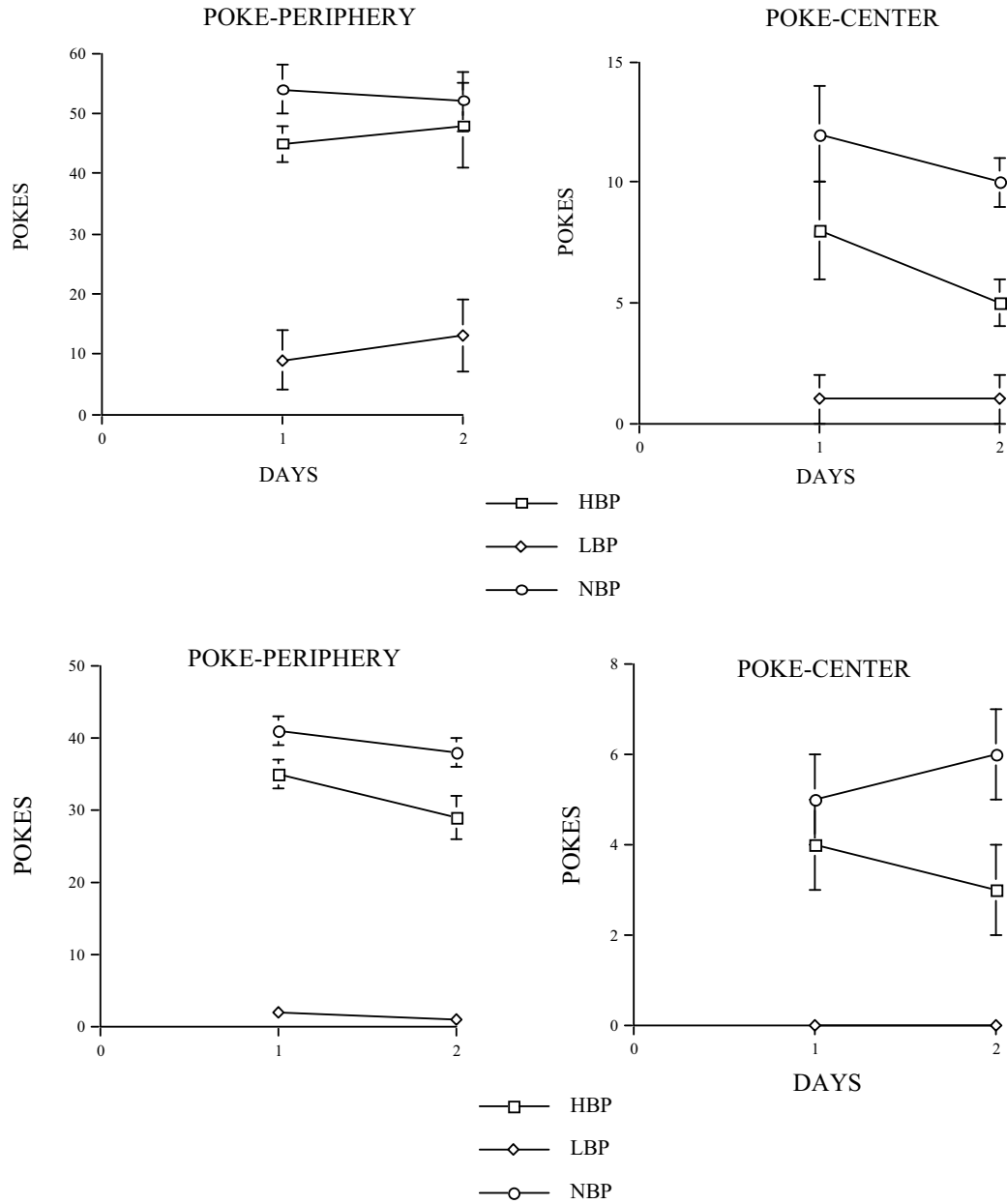


FIG.-3. Hole poking (means and S.E.) in the periphery and in the center of the hole-board of aged and young cohorts.

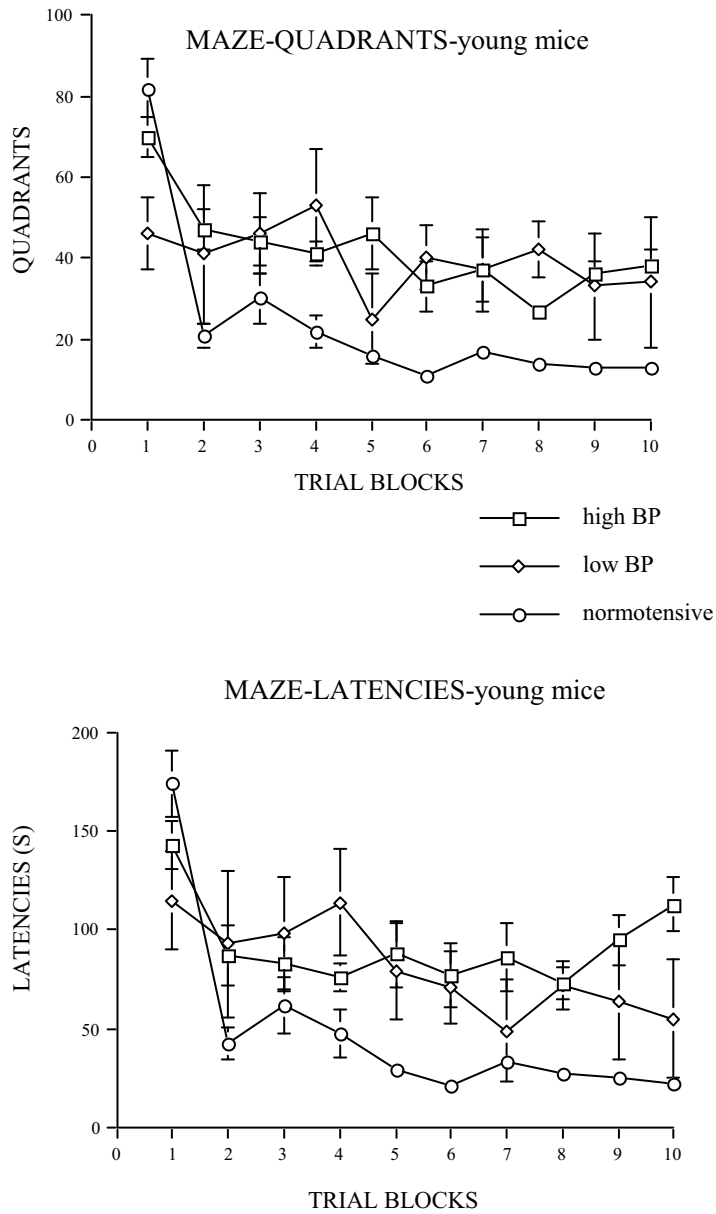


FIG.-4. Quadrant entries and escape latencies in s (means and S.E.) in the hidden platform condition of the water maze in young cohorts.

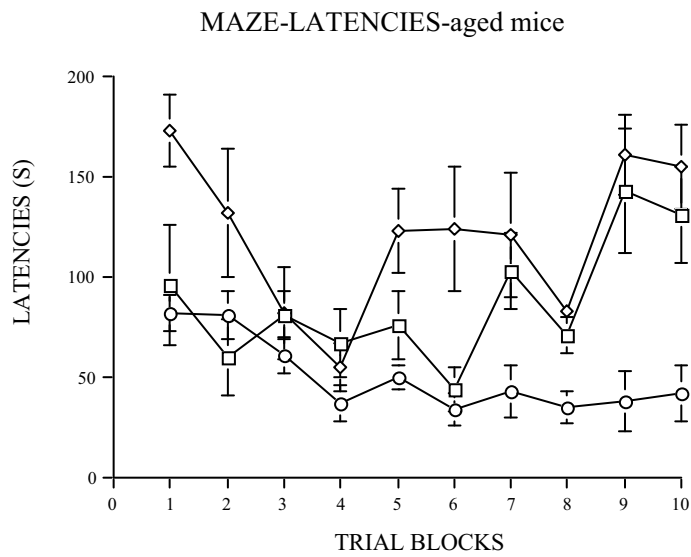
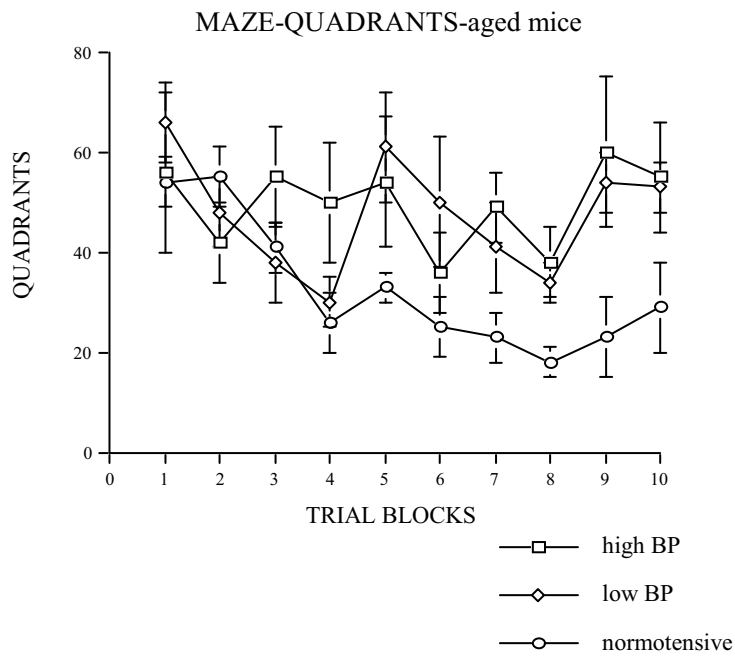


FIG.-5. Quadrant entries and escape latencies in s (means and S.E.) in the hidden platform condition of the water maze in aged cohorts.

## **Chapitre 3. ARTICLE 2**

# **ÉTUDE LONGITUDINALE DE L'ACTIVITÉ, LA COORDINATION MOTRICE, L'ANXIÉTÉ ET L'APPRENTISSAGE SPATIAL DES SOURIS GÉNÉTIQUEMENT HYPER/HYPOTENDUES**

## **3.1. Longitudinal analysis of motor activity and coordination, anxiety, and spatial learning in mice with altered blood pressure**

S. Thifault, R. Lalonde, N. Sanon, P. Hamet

Manuscrit publié dans la revue *Brain Research*, **910**(1-2):99-105, Aug 10 (2001).



### **3.2. Abstract**

Mice with either high or low blood pressure (BP) were compared to normotensive controls at 2 and 12 months of age for motor activity, equilibrium, anxiety, and spatial learning. Irrespective of age, high BP mice were more active in an open field than normotensive controls, whereas low BP mice were hypoactive at 2 months of age. High BP mice had a higher number of entries and a longer duration of visits in the open arms, a higher open arm/total arm ratio, a longer duration for the first visit into an open arm, and lower latencies before entering the first open arm than controls in the elevated +-maze, indicative of reduced anxiety. Reduced levels of anxiety were also displayed by low BP mice for duration of the first open arm visit (both age groups) and for the time spent in the open arms (older group). In the motor coordination test (coat-hanger), high BP mice had higher 2-paw movement time and reached the top of the apparatus on fewer occasions than controls. Both groups with abnormal BP values were deficient during visuomotor guidance in the water maze. These results indicate strain-, age-, and test-specific abnormalities in mice with uncontrolled hypertension or hypotension.

Keywords: Hypertension, Motor activity, Anxiety, Motor coordination, Spatial orientation.

### **3.3. Introduction**

The neurobehavioral consequences of uncontrolled high blood pressure have been examined mainly in spontaneously hypertensive rats (SHRs). It has repeatedly been demonstrated that SHRs are more active than Wistar control rats in different types of apparatus [2,4-7,13,20,27,30,32]. Three lines of evidence indicate that chronic exposure to hypertension does not directly cause hyperactivity: 1) The increase of motor activity was genetically dissociable from hypertension [27]; 2) the injection of an antihypertensive drug in SHRs did not reduce motor activity [32]; 3) rats made hypertensive by unilateral renal clips were not hyperactive [32]. Although there is evidence of brain damage in SHRs, as determined by ventricular dilatation [1,23], captopril, an antihypertensive agent of the angiotensin-converting enzyme inhibitor type, did not reduce their ventricular volume [24]. These results indicate that at least one measure of brain damage is not attributable to hypertension in this experimental model. On the other hand, a direct effect of high blood pressure on learning abilities is suggested by the finding that antihypertensive medication was successful in improving the deficient acquisition of bar-press responses seen in SHRs [18].

The purpose of the present study is to describe the behavioral characteristics of a second model of hypertension, namely high blood pressure (BP) mice, as well as a model of hypotension [28]. These lines were obtained from crossbreeding eight unrelated inbred strains, followed by random mating with a randomly bred normotensive control group. Full inbreeding was ensured by brother-sister matings for over 37 generations [31], yielding mean blood pressure levels of over 130 mm Hg for high BP, as opposed to 100 and 80, respectively, for normal and low BP mice [16,28,31]. Because DNA fragmentation has been described in several brain regions (neocortex, striatum, hippocampus, thalamus) of high BP mice at 12 months of age [9], these mice were compared to normotensive controls in a series of behavioral tests following a cross-sectional design at 3 and 12 months of age

[31]. In a similar fashion to SHRs, irrespective of age, high BP mice were more active than normotensive controls. On the contrary, low BP mice were less active than the normotensive strain at the youngest age tested. Moreover, deficits of motor coordination and water maze performance were found in both strains. In the present investigation, the same strains were compared in a longitudinal design. Motor coordination was analyzed by means of the coat-hanger test [31], in which mice are suspended on a thin horizontal bar. Anxiety was measured by means of the elevated +-maze, in which mice explore enclosed and open arms, taking into account the normal rodent tendency of avoiding open spaces [21,25,26].

### **3.4. Materials and methods**

#### **3.4.1. Animals**

Two-month old high BP (n=15), low BP (n=6), and normotensive mice (n=17), bred in our Research Center, were kept inside group cages covered with wooden shavings in a temperature- and humidity-controlled room. The same mice were then re-evaluated at 12 months of age under the same conditions.

#### **3.4.2. Apparatus**

*Motor activity* was measured in a white opaque plastic chamber (30 cm x 25 cm, wall height: 15 cm) under standard room illumination, containing a floor separated by felt pen markings into six equally spaced segments. *Motor coordination* was evaluated by means of the coat-hanger test. The horizontal bar was made of steel and placed at a height of 85 cm from a cushion-covered table, used in order to cushion any fall; this bar was 40 cm in length and 2 mm in diameter, flanked by 2 diagonal bars, 19 cm in length and inclined at 35°. *Anxiety* was evaluated by means of the elevated +-maze, made of a plexiglass floor and

cardboard walls, consisting of a central region (10.2 x 10.2 cm), from which projected two open (without walls) and two enclosed arms (23.5 x 10 cm) that faced each other.

*Spatial orientation* was evaluated in an opaque plastic basin (61 x 40 cm, wall height: 22 cm) filled with a milky solution (27°C) and containing a platform, 6.5 cm in diameter, placed 1.5 cm below water level, and covered by wire-mesh, used for the purpose of facilitating firm gripping. The height between water level and the wall was 13 cm, permitting the mice to see some of the room cues available. The pool remained in the same position relative to the environmental cues, such as various laboratory equipments and a window. The experimenter was not hidden from view but remained in the same position on every trial.

### **3.4.3. Procedure**

Scheduling was as follows: motor activity and coordination was evaluated on days 1-3, acquisition of the water maze hidden platform task on days 4-9, the elevated +-maze on days 10-12, retention of the water maze test on day 13, and performance on the visible platform task on day 14.

From day 1 to 3, the number of segment crossings (4 paw criterion) traversed by the mice was counted in the motor activity chamber during 4 min per day. After completion of this test, the mice were placed in the middle of the horizontal bar of the coat-hanger in an upside-down position, with care being taken that all 4 paws gripped the bar at the moment of release. The measures recorded were the elapsed time before reaching either side-bar with 2-, 3- or 4-paw criteria, together with latencies before falling (cut-off: 1 min) and the number of occasions when the midway or the top of the diagonal bar was reached. Whenever a mouse reached the top, it was removed and a score of 60 s given for latencies before falling. Two trials per day were conducted with an intertrial interval of approximately 15 min.

From day 4 to 9, the mice were placed into the water basin near and facing the northern (N) wall. The number of quadrants traversed and the escape latencies (cut-off: 1 min) before reaching the hidden platform were counted. Whenever the mice reached the platform, they were allowed to remain on it for 5 s. After 60 s, those mice unable to find the platform were placed on it for the same amount of time. On trials 2-4, the mice were placed in the east (E), south (S), and west (W) positions in that order, with the position of the platform kept constant in the NW quadrant. There were 2 blocks of 4 trials each per day. The within block intertrial interval was 10 min and the between block interval 30 min. On day 13, a retention test was given under identical conditions with only a single block of 4 trials. The visible platform test was performed in clear water on day 14 with 4 trials, at which time the platform was lifted above water level and placed in the NE quadrant, with a vertical pole inserted therein to facilitate viewing by animals swimming with their head up. Otherwise, the conditions were identical to those prevailing during hidden platform testing.

From day 10 to 12, the mice were evaluated in the elevated +-maze. The mice were placed at the end of one of the enclosed arms. The number and duration of visits to open and enclosed arms, the open/total visit ratio, emergence latencies from the first enclosed arm, and latencies before entry and visit duration in the first open arm were compiled.

#### **3.4.4. Statistical analyses**

Analysis of variance (ANOVA) with three independent groups differing in hypertension and with two repeated measures on the age factor and Fisher's PLSD test for multiple comparisons were used. Whenever appropriate, some time-dependent measures were transformed into log values for the purpose of reducing intergroup variance heterogeneity.

## **3.5. Results**

### **3.5.1. Motor activity**

A significant strain x age interaction ( $F_{2,35}=5.98$ ,  $P<0.01$ ) was found in the motor activity test. As seen in Fig. 1, activity levels decreased as a function of age in normotensive controls and low BP mice but on the contrary increased in high BP mice. Nevertheless, the strain effect was significant at 2 ( $F_{2,35}=10.34$ ,  $P<0.001$ ) and 12 ( $F_{2,35}=14.51$ ,  $P<0.001$ ) months of age. At either age, high BP mice were more active than normotensive mice ( $P<0.01$ , Fisher's PLSD test). Low BP mice were less active than normotensive controls only at 2 months of age ( $P<0.05$ ).

### **3.5.2. Coat-hanger**

Movement time (MT) before reaching either side-bar of the coat-hanger was measured with 2, 3, and 4 paw criteria (Table 1). Irrespective of the paw criteria, only the strain factor was significant (2 paw:  $F_{2,35}=6.16$ ,  $P<0.01$ ; 3 paw:  $F_{2,35}=3.70$ ,  $P<0.05$ ; 4 paw:  $F_{2,35}=3.82$ ,  $P<0.05$ ). The high BP group had higher 2-paw MT than controls ( $P<0.05$ ); the only significant difference noted for 3 or 4-paw MT was the higher values for high BP mice than low BP ( $P<0.05$ ), with the control group differing from neither.

The strain effect was significant in terms of frequencies at reaching the top ( $F_{2,35}=3.54$ ,  $P<0.01$ ) but not the midway part ( $F_{2,35}=2.74$ ,  $P>0.05$ ) of the coat-hanger, due to the lower frequencies on the part of high BP mice as opposed to normotensive controls ( $P<0.05$ ). In terms of latencies before falling, only the age factor was significant ( $F_{1,35}=12.54$ ,  $P<0.01$ ), as all three groups fell sooner at 12 months than at 2 months of age ( $P<0.05$ ) (see Table 1).

### 3.5.3. Elevated +-maze

As shown in Table 2, a significant interaction was found for enclosed arm entries ( $F_{2,35}=6.10$ ,  $P<0.05$ ), since lower values as a function of age were found for controls but not for either group with abnormal BP. Significant strain factors were found at 2 ( $F_{2,35}=14.50$ ,  $P<0.001$ ) and at 12 ( $F_{2,35}=13.55$ ,  $P<0.001$ ) months of age but for different reasons. Low BP mice had fewer enclosed arm entries than controls at 2 months of age ( $P<0.05$ ). On the contrary, high BP mice had higher enclosed arm entries than controls at 12 months of age ( $P<0.05$ ). For time spent in enclosed arms, the strain factor was significant ( $F_{1,35}=13.62$ ,  $P<0.001$ ). Despite a higher number of enclosed arm visits, high BP mice spent less time in them than controls ( $P<0.001$ ). Duration of visits increased as a function of age, at least for the control and high BP groups ( $F_{2,35}=12.68$ ,  $P<0.01$ ).

For open arm entries, significant effects were found for the strain ( $F_{2,35}=22.99$ ,  $P<0.001$ ) main factor. High BP mice entered open arms more frequently than controls ( $P<0.001$ ). All three groups had fewer open arm entries at 12 months than at 2 months of age ( $F_{1,35}=11.79$ ,  $P<0.01$ ). For open arm durations, the strain x age interaction was significant ( $F_{2,35}=6.64$ ,  $P<0.01$ ), as only normotensive mice spent less time in the open arms at 12 months than at 2 months. Strain effects were found at 2 ( $F_{2,35}=9.77$ ,  $P<0.001$ ) and at 12 ( $F_{2,35}=37.72$ ,  $P<0.001$ ) months of age. Irrespective of age, high BP mice spent more time in the open arms than normotensive mice ( $P<0.001$ ). Low BP mice spent more time in the open arms only at 12 months of age ( $P<0.001$ ).

As in open arm entries, the strain ( $F_{2,35}=39.31$ ,  $P<0.001$ ) factor was significant for the open/total visit ratio (Table 3), as both high and low BP mice had a higher number of open/total visits than controls ( $P<0.001$ ). All three groups had fewer open/total visits at 12 months than at 2 months of age ( $F_{1,35}=25.29$ ,  $P<0.001$ ).

The strain x age interaction was significant ( $F_{2,35}=9.83$ ,  $P<0.001$ ) for emergence latencies from the first enclosed arm, as controls had proportionately longer values as a function of age than the other two groups. The strains differed at 2 ( $F_{2,35}=8.65$ ,  $P<0.001$ ) and at 12 ( $F_{2,35}=25.05$ ,  $P<0.001$ ) months of age. At 2 months, low BP mice had longer latencies than controls ( $P<0.01$ ). At 12 months, high BP mice had shorter latencies than controls ( $P<0.001$ ).

For latencies before entering the first open arm, the strain factor was significant ( $F_{2,35}=25.54$ ,  $P<0.001$ ), as high BP mice had lower entry latencies than controls ( $P<0.001$ ). Latencies were higher for all groups as a function of age ( $F_{1,35}=10.43$ ,  $P<0.01$ ).

The interaction effect was significant for duration of the first open arm visit ( $F_{2,35}=9.52$ ,  $P<0.001$ ). A strain effect was found at 2 ( $F_{2,35}=8.20$ ,  $P<0.01$ ) and at 12 ( $F_{2,35}=36.24$ ,  $P<0.001$ ) months of age. Visit duration was higher in both groups with abnormal blood levels than controls at 2 months ( $P<0.01$ ) and at 12 months ( $P<0.001$ ), but the effect was more potent in the latter condition because of the lower values in controls.

### **3.5.4. Water maze**

During acquisition of the water maze task (Fig. 2), there was a significant interaction for quadrant entries ( $F_{2,35}=17.95$ ,  $P<0.001$ ) and escape latencies ( $F_{2,35}=39.30$ ,  $P<0.001$ ). The normotensive group outperformed high or low BP mice only at 12 months of age ( $F_{2,35}=15.53$ ,  $P<0.01$  for quadrants;  $F_{2,35}=29.83$ ,  $P<0.001$  for latencies,  $P<0.05$ ).

The interactions were significant during the retention test as well (Table 4) for both quadrant entries ( $F_{2,35}=8.90$ ,  $P<0.01$ ) and escape latencies ( $F_{2,35}=9.00$ ,  $P<0.001$ ), the normotensive group outperforming the other two groups only at 12 months of age (quadrants:  $F_{2,35}=10.06$ ,  $P<0.011$ ; latencies:  $F_{2,35}=30.56$ ,  $P<0.001$ ).



For quadrant entries during visible platform testing (Table 4), the strain effect was significant ( $F_{2,35}=5.41$ ,  $P<0.01$ ), as normotensive mice outperformed high BP ( $P<0.01$ ) and to a lesser extent low BP ( $P=0.06$ ) mice. For escape latencies, the interaction was significant ( $F_{2,35}=4.66$ ,  $P<0.05$ ). Although normotensive mice outperformed high or low BP mice ( $P<0.05$ ), the effect was more evident at 2 months than at 12 months.

### **3.6. Discussion**

Similarly to results reported in SHRs [2,4-7,13,20,27,30,32], high BP mice were more active than normotensive controls. On the contrary, low BP mice displayed hypoactivity, but only at a young age, perhaps because of the reduced activity seen in controls during aging. This pattern of results reproduces in a longitudinal design what we had previously reported in a cross-sectional one [31]. One possible cause of the hyperactivity seen in high BP mice is the elevated BP. On the other hand, hyperactivity was genetically dissociable from hypertension in SHRs, indicating that inbreeding fixated traits independently from BP [27] and this could also be the case in our high BP mice.

One possible cause of the hyperactivity seen in high BP mice is an altered level of anxiety. The sympatho-adrenomedullary function of SHRs has often been shown to be hyperreactive under stressful conditions, as indicated by higher stress-induced elevations of BP, heart rate, cardiac output, and plasma concentrations of norepinephrine and epinephrine [17]. By contrast, the hypothalamo-pituitary-adrenocortical response of SHRs has not been so extensively investigated; SHRs were reported to be hyperreactive in one study [12] and hyporeactive in another [7]. An increase of catecholamine concentrations in normal animals is associated with an active response to stressful conditions as seen in fight or flight, while an increase of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical response is associated with loss of the locus of control and helplessness [10].

The predominant response in SHR mice seems to be active exploration of potentially threatening environments. For example, SHR mice had more entries than Wistar Kyoto rats into the more anxiogenic central part of an open field [2,6,7,22], as well as more entries and duration of visits into open arms, and a higher open arm/total arm visit ratio in the elevated +-maze [2,6,22,29]. In addition, SHR mice had shorter latencies before approaching an unfamiliar object placed in the middle of an open field than Wistar Kyoto or Wistar rats [5]. Although BP and heart rate responses were higher in SHR mice confronted with electric shocks while drinking than controls, their latencies before drinking and their immobility time were lower [14]. These results indicate that fear-related behaviors are reduced in SHR mice. Their hyperactive catecholamine response is accompanied by a reduction of immobility or fear. This behavioral tendency appears to be an exaggerated form of the fight response to stressful conditions observed in normal animals [10].

As in SHR mice, high BP mice displayed a reduction of fear-related behaviors in the elevated +-maze. The similarities in behavioral reactivity between high BP mice on one hand and SHR mice on the other indicate that similar underlying physiological responses to stressful conditions are implicated. Despite their hypoactivity, low BP mice also displayed a relative preference to the open arms as opposed to the enclosed arms of the maze.

As in our previous cross-sectional study [31], high BP mice, despite an absence of obvious motor signs such as ataxia or tremor, had impaired motor coordination in the coat-hanger test. Higher two-paw MTs and a lower number of successful reaches to the top of the apparatus were found in high BP mice as early as two months of age. By contrast, low BP mice were not impaired on any measure. In our previous study [31], latencies before falling were shorter in 3 month low BP mice than controls, indicating an increased susceptibility to postural deficits from 2 to 3 months of age.

In addition to tests of motor activity and motor coordination, two versions of water maze performance were investigated. In the hidden platform version, the mice must locate

the platform according to environmental cues. In the visible platform version, the mice may use strictly local cues to locate the platform [8,15,19]. As in our previous cross-sectional study [31], either group with altered BP was impaired. In the present study, only the older animals were impaired in the hidden platform version, whereas in the previous study both groups were impaired irrespective of age levels. One reason for this difference is the poorer performance of the control strain at 2 as opposed to 3 months of age. A second possible reason is that a period of three months of uncontrolled hypertension or of hypotension is necessary before the appearance of this symptom. The impaired acquisition of the hidden platform task by either group cannot be explained by a deficit in spatial orientation, because of a concomitant impairment in the visible platform task. This impairment may be caused by multiple factors, including poor visual acuity, altered arousal levels or a disturbance in visuomotor coordination.

In view of similar cardiovascular risk factors irrespective of cultural environment [3], it is of interest to identify the genetic basis of the behavioral changes reported in the present study, which can be determined for example by crossing congenic strains. These experiments are under way in our laboratory.

### **3.7. Acknowledgments**

S.T. received a doctoral scholarship from the Canadian Heart and Stroke Foundation.

### **3.8. References**

- [1] P. Bendel, R. Eilam, Quantitation of ventricular size in normal and spontaneously hypertensive rats by magnetic resonance imaging, *Brain Res.* 574 (1992) 224-228.
- [2] O. Berton, A. Ramos, F. Chaouloff, P. Mormède, Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains, *Behav. Genet.* 27 (1997) 155-166.

- [3] M. Bobak, C. Hertzman, Z. Skodova, M. Marmot, Socioeconomic status and cardiovascular risk factors in the Czech Republic, *Int. J. Epidemiol.* 28 (1999) 46-52.
- [4] W. Danysz, A. Plaznik, O. Pucilowski, M. Plewako, M. Obersztyn, W. Kostowski, Behavioral studies in spontaneously hypertensive rats, *Behav. Neur. Biol.* (1983) 39, 22-29.
- [5] A. Delini-Stula, C. Hunn, Neophobia in spontaneous hypertensive (SHR) and normotensive control (WKY) rats, *Behav. Neur. Biol.* 43 (1985) 206-211.
- [6] C. Gentsch, M. Lichsteiner, H. Feer, Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide, *Behav. Brain Res.* 25 (1987) 101-107.
- [7] C. Gentsch, M. Lichsteiner, H. Feer, Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines, *Physiol. Behav.* 27 (1981) 183-186.
- [8] C.R. Goodlett, K.M. Hamre, J.R. West, Dissociation of spatial navigation and visual guidance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice, *Behav. Brain Res.* 47 (1992) 129-141.
- [9] P. Hamet, L. Richard, T.-V. Dam, E. Teiger, S.N. Orlov, F. Gaboury, J. Tremblay, Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26 (1995) 642-648.
- [10] J.P. Henry, J. Liu, J., W.P. Meehan. Psychosocial stress and experimental hypertension. In: J.H. Laragh and B.M. Brenner (eds) *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management* (pp. 905-921). New York:Raven Press, 1995.

- [11] S. Knardahl, C. Chindaduangratin, Residential-maze behavior of spontaneously hypertensive rats, *Behav. Neur. Biol.* 41 (1984) 84-89.
- [12] K. Kräuchi, A. Wirz-Justice, R. Willener, I.C. Campbell, H. Feer, Spontaneous hypertensive rats: behavioral and corticosterone response depend on circadian phase, *Physiol. Behav.* 30 (1983) 35-40.
- [13] R.N. Leaton, J.V. Cassella, D. Whitehorn, Locomotor activity, auditory startle and shock threshold in spontaneously hypertensive rats, *Physiol. Behav.* 31 (1983) 103-109.
- [14] J.E. LeDoux, A. Sakaguchi, D.J. Reis, Behaviorally selective cardiovascular hyperactivity in spontaneously hypertensive rats: evidence for hypoemotionality and enhanced appetitive motivation, *Hypertension* 4 (1982) 853-863.
- [15] C.R. Lines, A.D. Milner, A deficit in ambient visual guidance following superior colliculus lesions in rats, *Behav. Neurosci.* 99 (1985) 707-716.
- [16] D. Malo, G. Schlager, J. Tremblay, P. Hamet, Thermosensitivity, a possible new locus involved in genetic hypertension. *Hypertension* 14 (1989) 121-128.
- [17] R. McCarty, Stress, behavior and experimental hypertension, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7 (1983) 493-502.
- [18] A. Meneses, E. Hong. Spontaneously hypertensive rats: a potential model to identify drugs for treatment of learning disorders. *Hypertension* 31 (1998) 968-972.
- [19] R.G.M. Morris, P. Garrud, J.N.P. Rawlins, J. O'Keefe, Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature* 292 (1982) 681-683.
- [20] M.-B. Moser, E.I. Moser, B. Wultz, T. Sagvolden, Component analyses differentiate between exploratory behaviour of spontaneously hypertensive rats in a two-compartment free-exploration open field, *Scand. J. Psychol.* 29 (1988) 200-206.

- [21] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Meth.* 14 (1985) 149-167.
- [22] A. Ramos, O. Berton, P. Mormède, F. Chaouloff, A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains, *Behav. Brain Res.* 85 (1997) 57-69.
- [23] S. Ritter, T.T. Dinh, Progressive postnatal dilation of brain ventricles in spontaneously hypertensive rats, *Brain Res.* 370 (1986) 327-332.
- [24] S. Ritter, T.T. Dinh, S. Stone, N. Ross, Cerebroventricular dilation in spontaneously hypertensive rats (SHRs) is not attenuated by reduction of blood pressure, *Brain Res.* 450 (1988) 354-359.
- [25] L.J. Rodgers, J.C. Cole, The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: S.J. Cooper, C.A. Hendry (eds) *Ethology and pharmacology*, John Wiley & Sons, New York, 1994, pp. 9-44.
- [26] L.J. Rogers, H.S. Sink, J.W. Hambley, Exploration, fear and maze patrolling in spontaneously hypertensive and normotensive rats, *Behav. Neur. Biol.* 49 (1988) 222-233.
- [27] T. Sagvolden, E.D. Hendley, S. Knardahl, Behavior of hypertensive and hyperactive rat strains: hyperactivity is not unitarily determined, *Physiol. Beh.* 52 (1992) 49-57.
- [28] G. Schlager, The genetically hypertensive mouse, *Trends Arter. Hypertens.* 17 (1981) 321-331.
- [29] B. Söderpalm, The SHR exhibits less "anxiety" but increased sensitivity to the anticonflict effect of clonidine compared to normotensive controls, *Pharmacol. Toxicol.* 65 (1989) 381-386.

- [30] J.R. Sutterer, C.M. Stoney, M. Sanfillo, Is the hypertensive rat really hyperreactive? *Hypertension* 6 (1984) 868-876.
- [31] S. Thifault, R. Lalonde, P. Hamet, Neurobehavioral evaluation of high blood pressure and low blood pressure mice, *Psychobiology* 27 (1999) 415-425.
- [32] D. Whitehorn, D.G. Atwater, W.C. Low, J.E. Gellis, E.D. Hendley, Independence of blood pressure and locomotor hyperactivity in normotensive and genetically hypertensive rat, *Behav. Neur. Biol.* 37 (1983) 357-361.

Table 1. Mean  $\pm$  S.E.M. MT and latencies before falling in s of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the coat-hanger test

GroupsMT	2-paw	3-paw	4-paw	Reaches midway/top	Fall latencies
<b>Controls</b>					
2 mo	239 $\pm$ 27	278 $\pm$ 23	291 $\pm$ 20	2 $\pm$ 1/2 $\pm$ 1	353 $\pm$ 3
12 mo	253 $\pm$ 23	291 $\pm$ 18	301 $\pm$ 17	2 $\pm$ 1/2 $\pm$ 1	319 $\pm$ 13
<b>High BP</b>					
2 mo	270* $\pm$ 22	288 $\pm$ 21	300 $\pm$ 19	2 $\pm$ 1/1* $\pm$ 0	347 $\pm$ 5
12 mo	335# $\pm$ 16	347 $\pm$ 8	353 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0/0# $\pm$ 0	276 $\pm$ 24
<b>Low BP</b>					
2 mo	216 $\pm$ 31	246 $\pm$ 28	260 $\pm$ 26	2 $\pm$ 0/2 $\pm$ 0	345 $\pm$ 15
12 mo	179 $\pm$ 31	231 $\pm$ 30	243 $\pm$ 29	3 $\pm$ 1/2 $\pm$ 1	337 $\pm$ 10

\* P<0.05 vs controls, 2 months

# P<0.05 vs controls, 12 months



Table 2. Mean  $\pm$  S.E.M. entries and duration (s) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the elevated +-maze test

Groups	Entries		Duration		
	enclosed	open	enclosed	open	first open
Controls					
2 mo	30 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	768 $\pm$ 20	44 $\pm$ 11	12 $\pm$ 2
12 mo	13 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1	869 $\pm$ 11	4 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1
High BP					
2 mo	32 $\pm$ 3	16* $\pm$ 2	674* $\pm$ 22	158* $\pm$ 20	24* $\pm$ 1
12 mo	34# $\pm$ 4	11# $\pm$ 2	729# $\pm$ 26	87# $\pm$ 16	24# $\pm$ 3
Low BP					
2 mo	7* $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	779 $\pm$ 27	86 $\pm$ 23	38* $\pm$ 9
12 mo	5# $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	763 $\pm$ 37	122# $\pm$ 37	107# $\pm$ 39

\* P<0.05 vs controls, 2 months

# P<0.05 vs controls, 12 months

Table 3. Mean  $\pm$  S.E.M. latencies (s) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the elevated +-maze test

Groups	Latencies		Open/total (%)
	emergence	first open	
Controls			
2 mo	115 $\pm$ 31	639 $\pm$ 57	12 $\pm$ 2
12 mo	537 $\pm$ 66	866 $\pm$ 34	7 $\pm$ 1
High BP			
2 mo	82 $\pm$ 26	224* $\pm$ 45	33* $\pm$ 2
12 mo	93# $\pm$ 37	374# $\pm$ 69	24# $\pm$ 3
Low BP			
2 mo	398* $\pm$ 91	562 $\pm$ 113	46* $\pm$ 3
12 mo	566 $\pm$ 77	735 $\pm$ 101	38# $\pm$ 4

\* P<0.05 vs controls, 2 months

# P<0.05 vs controls, 12 months

Table 4. Mean  $\pm$  S.E.M quadrant entries and escape latencies (s) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age during the retention test and the visible platform test

Groups	Retention		Visible platform	
	Quadrants	Latencies	Quadrants	Latencies
Controls				
2 mo	57 $\pm$ 11	106 $\pm$ 17	15 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4
12 mo	19 $\pm$ 4	20 $\pm$ 4	19 $\pm$ 3	21 $\pm$ 4
High BP				
2 mo	35 $\pm$ 4	118 $\pm$ 12	27* $\pm$ 3	133* $\pm$ 16
12 mo	36# $\pm$ 4	51# $\pm$ 7	31# $\pm$ 7	47# $\pm$ 10
Low BP				
2 mo	32 $\pm$ 6	126 $\pm$ 31	21 $\pm$ 3	95* $\pm$ 18
12 mo	50# $\pm$ 6	102# $\pm$ 10	31# $\pm$ 5	82# $\pm$ 8

\* P<0.05 vs controls, 2 months

# P<0.05 vs controls, 12 months

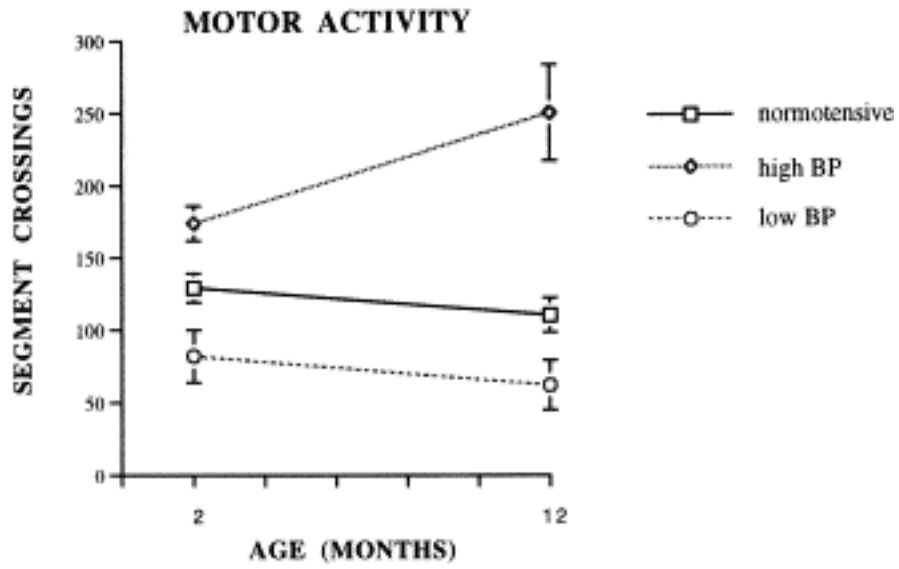


Figure 1. Horizontal motor activity (means  $\pm$  S.E.M.) of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age

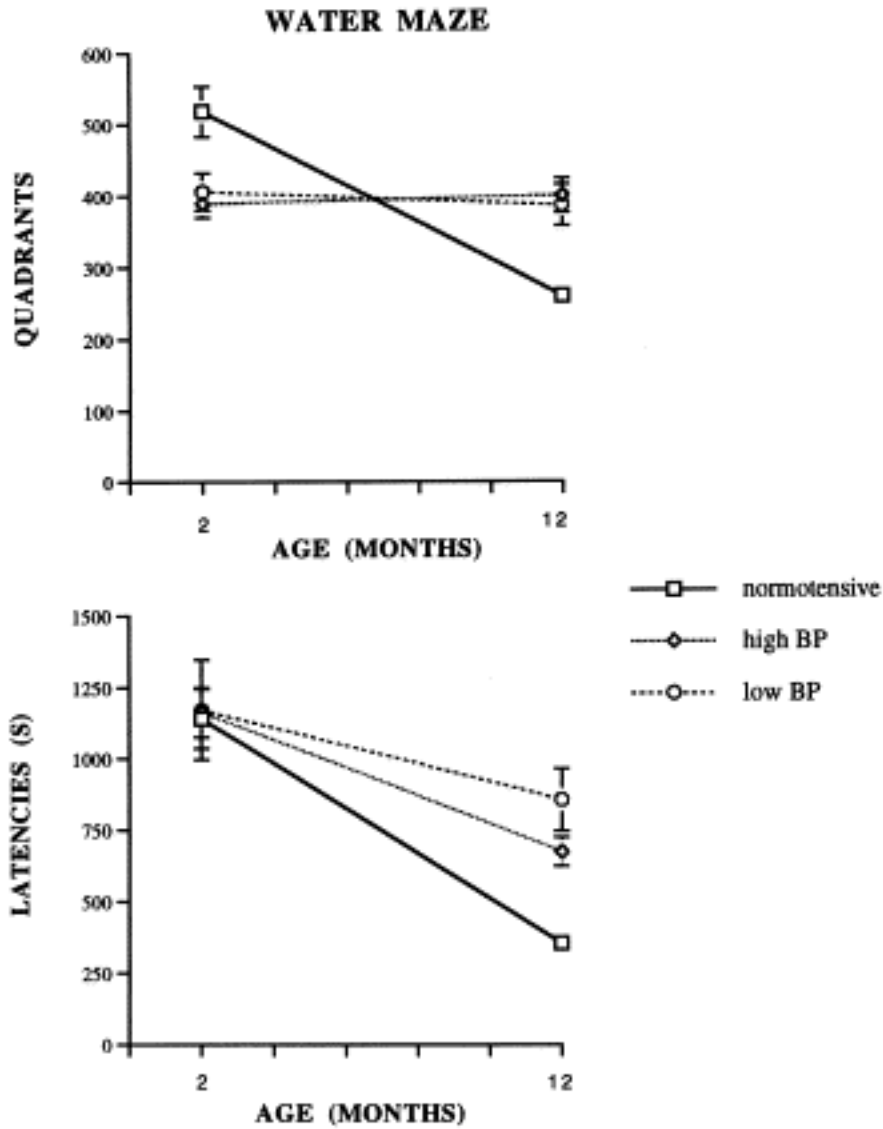


Figure 2. Mean  $\pm$  S.E.M. values of quadrant entries and escape latencies in s of high BP mice, low BP mice, and normotensive controls at 2 and 12 months of age in the hidden platform condition of the water maze

## **Chapitre 4. ARTICLE 3**

# **ACTIVITÉ ET COORDINATION MOTRICE, VISITES AUX TROUS ET APPRENTISSAGE SPATIAL DES SOUCHES DE SOURIS CONSANGUINES A/J ET C57BL/6J**

### **4.1. Comparisons between C57BL/6J and A/J mice in motor activity and coordination, hole-poking, and spatial learning**

S. Thifault, R. Lalonde, N. Sanon, P. Hamet

Manuscrit publié dans la revue *Brain Research Bulletin*, 58(2):213-218 (2002).

## 4.2. Abstract

The C57BL/6J (B6) inbred mouse strain was compared to the A/J inbred strain for motor activity in an open-field, exploration of a hole-board, motor coordination in the coat-hanger test, and spatial learning in the Morris water maze. B6 mice displayed a higher number of segment crossings in the open-field and of hole-poking responses than A/J mice. The performance of B6 mice was superior to that of A/J mice not only in the submerged but also in the visible platform version of the Morris water maze. By contrast to their hypoactivity, the A/J strain had shorter movement times in the coat-hanger test, indicating faster motor speed, although the groups did not differ in latencies before falling. These results indicate that recombinant inbred or congenic strains derived from B6 and A/J mice offer considerable potential for discerning the genetic basis of several behavioral phenotypes.

Keywords: Inbred strains, Motor activity, Exploration, Motor coordination, Spatial orientation.

### 4.3. Introduction

Inbred mouse strains have been compared as a first step in finding genes responsible for motor activity [1,4,6,8,14,23,26,30,33,34], anxiety levels under basal [4,14,15,34,39,44] and drug-induced [10] conditions, T-maze spontaneous alternation [1,3], fear conditioning [5,7], and spatial learning [12,30,43]. The comparisons between inbred strains and between recombinant or congenic strains have permitted the identification of genetic loci involved in several types of behavior, including motor activity [16,38,40,42], neuroleptic-induced catalepsy [31], anxiety [25,41], and fear conditioning [7,29,46]. It is also possible to use recombinant inbred rats for the same purpose [27,36].

Prior to analyzing A x B recombinant congenic strains derived from crossing C57BL/6J (B6) with A/J mice, we compared the two parental strains in tests of motor activity and coordination, hole-poking, and spatial learning. These strains have previously been compared in tests measuring motor activity [11,23,24], anxiety [15,39], T-maze spontaneous alternation [3], as well as spatial learning in the T [9] and Morris water maze [11,22,30]. In addition to motor activity and water maze learning, we wished to extend understanding of the phenotypic characteristics of these strains by measuring motor coordination in the coat-hanger test [19,20,37] and hole-poking [13]. The coat-hanger test is sensitive to cerebellar dysfunction, as determined in mice with natural mutations [19] and in transgenic mice with neurofilament maldistribution and Purkinje cell loss [20]. Hole-poking responses measure the exploration of environmental stimuli, pharmacologically dissociable from general ambulation [13].



## 4.4. Materials and Methods

### 4.4.1. Animals

Male and female ten month-old B6 (n=9) and A/J (n=10) mice controlled for gender were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and kept inside group cages covered with wooden shavings in a temperature- and humidity-controlled room. After adaptation to their new surroundings and daily handling for a week, the mice were evaluated in an adjacent room, conducted under standard room illumination.

### 4.4.2. Apparatus

*Motor activity* was measured in an open-field made of white opaque plastic (30 cm x 25 cm, wall height: 15 cm), with a floor marked by a felt pen into six equally spaced rectangles.

*Exploration of environmental stimuli* was measured in the hole-board, made of an opaque plastic chamber (diameter: 30.5 cm) suspended at a height of 60 cm from floor level. Four holes were drilled in the peripheral part of the board and one in the central part. The diameter of the holes was 2.5 cm and the distance between each peripheral hole from the central one was 7.5 cm.

*Motor coordination* was measured in the coat-hanger test, consisting of a horizontal bar (diameter: 2 mm) made of steel with two diagonal bars at each extremity. The horizontal bar measured 40 cm in length and the diagonal bars 19 cm. This horizontal bar was suspended at a height of 85 cm from a cushion-covered table and the diagonal bars inclined at 35° from the horizontal axis.

*Spatial orientation* was evaluated in a basin made of opaque plastic (diameter: 80 cm, wall height: 15 cm) and filled with a milky solution (27°C). The basin contained an

escape platform (diameter: 7 cm; height: 8 cm) submerged 1.5 cm beneath water level. The platform was covered with holes for the purpose of providing a firm grip. The height between water level and the wall was 7 cm, permitting the mice to see a variety of room cues, mainly laboratory equipment. The experimenter was visible to the mice but remained in the same position throughout testing.

#### **4.4.3. Procedure**

The testing schedule was as follows: motor coordination (days 1 to 3), motor activity (days 4 to 6), acquisition of spatial learning (days 7 to 11), long-term retention (day 18), and visible platform testing (day 19) in the Morris water maze, and hole-poking (days 16 and 17).

*Motor coordination* was measured by placing mice upside-down in the middle part of the horizontal bar of the coat-hanger, with care taken that all four paws gripped the bar at the moment of release. Six measures were taken on two daily trials for three days (intertrial interval: 15 min): the movement time (MT) before reaching either side-bar with 2, 3, and 4 paws, the midway and top of the side-bars (snout criteria), and the latencies before falling (cut-off: 1 min). Whenever a mouse reached the top of the diagonal bar, it was immediately retrieved and a score of 60 s given for the latency before falling score.

In the *motor activity* test, the number of segments crossed (4 paw criterion) was counted during three daily sessions of 4 min. *Exploration of environmental stimuli* was measured in the hole-board. The number of nose-pokes in the peripheral and in the central part of the board was counted in two daily sessions of 3 min. One of the male B6 mice was slightly cut because of inter-cage fighting during hole-board testing and could not be used; however, the mouse had recovered completely for retention and visible platform testing in the water maze.

During acquisition of the *spatial learning* task, the mice were first placed near the edge and facing the northern (N) wall of the pool. On trials 2 to 4, the mice were placed in east (E), south (S), and west (W) locations in that order, with the position of the escape platform kept constant in the NW quadrant. After their swim, the mice were kept dry in a plastic holding cage filled with paper towels. The number of quadrants traversed (4 paw criterion) and the latencies before reaching the platform (cut-off: 1 min) were measured. After reaching the platform, the mice remained on it for 5 s. Mice unable to find the platform before the cut-off period were removed from the water and placed on it for the same amount of time. There were 2 blocks of 4 trials per day for five days, with a within-block intertrial interval of 10 min and a between-block interval of 30 min. One week later, a retention test was given under identical conditions, but with only a single block of four trials. The visible platform test was performed in clear water on the following day with a block of four trials under the same conditions as the hidden platform test, except that the platform was lifted 1 cm above water level and placed in the NE quadrant, with a vertical pole inserted on it in order to facilitate finding its location for animals swimming with their head up.

#### **4.4.4. Statistical analyses**

Analyses of variance (ANOVAs) were used on all measures with homogeneous variances. Some time-dependent data were log transformed before being analyzed by ANOVAs for the purpose of reducing the heterogeneity of intergroup variances.

### **4.5. Results**

#### **4.5.1. Motor coordination**

As shown in Table 1, the A/J strain had lower 2-paw MTs than the B6 strain ( $F(1,17)=7.2$ ;  $p < 0.05$ ). However, there was no interstrain difference for the other MTs: 3-

paw ( $F(1,17)=2.23$ ;  $p >0.05$ ), 4-paw ( $F(1,17)=2.36$ ;  $p >0.05$ ), midway ( $F(1,17)=2.04$ ,  $p >0.05$ ) or top ( $F(1,17)=2.9$ ;  $p >0.05$ ), or for latencies before falling ( $F(1,17)=0.47$ ;  $p >0.05$ ).

#### **4.5.2. Motor activity**

B6 mice crossed more segments than A/J mice in the open-field ( $F(1,17)=4.84$ ;  $p <0.05$ ). The mean  $\pm$  S.E.M number of segment crossings per day were  $118.4 \pm 54.4$  for B6 and  $5.0 \pm 3.7$  for A/J.

#### **4.5.3. Spatial learning**

During acquisition of the water maze task (Fig. 1), the strain  $\times$  day interaction was significant for quadrant entries ( $F(4,68)=3.26$ ;  $p <0.05$ ) and escape latencies ( $F(4,68)=7.59$ ;  $p <0.001$ ), as B6 mice had superior scores than A/J mice and this difference widened with repeated testing. Although the escape latencies were reduced in both strains with repeated testing ( $F(4,32)=6.52$ ;  $p <0.001$ ), the distance swum was only diminished in B6 ( $F(4,32)=21.63$ ,  $p <0.001$ ) and not in A/J ( $F(4,36)=2.23$ ;  $p >0.05$ ) mice.

The same strain difference was observed during the retention test (Fig. 2), as B6 mice had shorter path lengths ( $t(17)=2.67$ ;  $p <0.05$ ) and reached the escape platform sooner ( $t(17)=6.18$ ;  $p <0.001$ ). In the visible platform task (Fig. 3), the B6 strain once again had a lower number of quadrant entries ( $t(17)=2.14$ ;  $p <0.05$ ) and escape latencies ( $t(17)=5.32$ ;  $p <0.001$ ) than the A/J strain.

#### **4.5.4. Hole-poking**

As shown in Fig. 4, B6 mice had a higher number of hole pokes in the periphery of the board than A/J mice on day 1 ( $F(1,16)=5.06$ ;  $p <0.05$ ) but not on day 2 ( $F(1,16)=2.72$ ;  $p >0.05$ ) of testing. The number of pokes in the center of the hole-board, which both groups tended to avoid, did not differ between the strains on either day ( $p >0.05$ ).

## 4.6. Discussion

The comparison of inbred mouse strains represents the first step toward determining the genetic basis of behavioral phenotypes. A subject of concern in this type of research is the extent to which gene-behavior relations can be generalized in different laboratories [9]. Although mice are usually placed inside small cages with minimal opportunities of interacting with conspecifics and environments, interstrain differences are similar although sometimes amplified in an enriched environment [18]. These results promote the ecological validity of studying the genetic basis of mouse behavior and encourage the initiation of studies concerned with gene-environment interactions. The two strains of inbred mice examined in the present study differed on most measures in the open-field, coat-hanger, hole-board, and water maze. The availability of B6 and A/J mice as recombinant inbred or congenic strains should facilitate genetic mapping of these behavioral phenotypes.

B6 mice were more active than A/J mice in the open-field. This result is concordant with previous observations in the open-field [23,24,39] as well as in a Y-maze [1,23]. In the present study, B6 mice were also more active in the hole-board test. Hole-poking is dissociable from ambulation as a measure of the willingness to explore specific environmental stimuli [13]. In particular, the B6 strain had a higher number of hole-pokes in the peripheral part of the apparatus on day 1 but not on day 2 of testing or on either day in the central (more anxiogenic) part. Increased hole-poking may be interpreted as a decrease in anxiety. It has previously been shown that the B6 strain had shorter latencies than the A/J strain before consuming a food pellet in a brightly lit open-field, an indication of lower levels of anxiety [39]. However, the strains were reported not to differ for open/total arm entries, open/total duration, and open arm duration in the elevated plus-maze [15,39], a second indicator of anxiety [2,32,35]. On the other hand, the finding of increased total arm entries in the elevated plus-maze observed in B6 mice [39] is compatible with

their above-cited hyperactivity but renders the open/total arm score more ambiguous as a measure of anxiety.

In contrast to their lower levels of motor activity, A/J mice had lower MTs than B6 mice in the coat-hanger motor coordination task. This superiority was restricted to the time spent before reaching the side-bar with two paws, and not with reaching the higher portions of the side-bars or with latencies before falling. The analysis of quantitative trait loci involved in motor coordination has only begun to be investigated [21]. This interstrain difference may be of use in identifying the genetic basis of motor speed in a task dependent on normal functioning of the cerebellum and associated pathways [19,20].

In the Morris water maze [17,28], the B6 strain reached the escape platform faster and with shorter path lengths than the A/J strain, confirming previous results [30,43]. The relatively poor performance of A/J mice may be caused by their brain abnormalities at the level of the fornix [45], as hippocampal-related pathways are crucial in this task [28]. On the other hand, the B6 strain outperformed the A/J strain even in the visible platform version of the task, once again in confirmation of previous results [30]. This effect may be explained by several factors, including increased anxiety, reduced motivation to escape from the water, and abnormalities in retinal or brain visual pathways on the part of this albino strain. Eventually, the underlying reason for this deficit may be discovered by means of interstrain comparisons on visual discrimination tasks.

In conclusion, behavioral differences were observed between B6 and A/J strains on several measures of motor activity and coordination, of exploration, and of spatial abilities. The use of recombinant inbred or congenic mice derived from these strains offers the possibility of delineating the genetic basis of a wide range of behavioral phenotypes.

## 4.7. Acknowledgments

This study was supported by a Canadian Institutes of Health Research grant to P.H. (MT-14654). During the course of this study, S.T. received a doctoral scholarship from the Canadian Heart and Stroke Foundation.

## 4.8. References

1. Anisman, H.; Kokkonidis, L. Effects of scopolamine, d-amphetamine and other drugs affecting catecholamines on spontaneous alternation activity in mice. *Psychopharmacologia* 45:55-63; 1975.
2. Bale, T.L.; Contarino, A.; Smith, G.W.; Chan, R.; Gold, L.H.; Sawchenko, P.E.; Koob, G.F.; Vale, W.W.; Lee, K.-F. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nature Genet.* 24:410-414; 2000.
3. Bertholet, J.-Y.; Crusio, W.E. Spatial and non-spatial spontaneous alternation and hippocampal mossy fibre distribution in nine inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* 43:197-202; 1991.
4. Berton, O.; Ramos, A.; Chaouloff, F.; Mormède, P. Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains. *Behav. Genet.* 27:155-166; 1997.
5. Bolivar, V.J.; Pooler, O.; Flaherty, L. Inbred strain variation in contextual and cued fear conditioning. *Mamm. Genome* 12 :651-616; 2001.
6. Bolivar, V.J.; Caldarone, B.J.; Reilly, A.A.; Flaherty, L. Habituation of activity in an open field; a survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav. Genet.* 30:285-293; 2000.
7. Caldarone, B.; Saavedra, C.; Tartaglia, K.; Wehner, J.M.; Dudek, B.C.; Flaherty, L. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. *Nature Genet.* 17:335-337; 1997.

8. Clément, Y.; Martin, B.; Venault, P.; Chapouthier, G.. Involvement of regions of the 4th and 7th chromosomes in the open-field activity of mice. *Behav. Brain Res.* 70:51-57; 1995.
9. Crabbe, J.C.; Wahlsten, D.; Dudek, B.C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284:1670-1672; 1999.
10. Crabbe, J.C.; Gallagher, E.J.; Cross, S.J.; Belknap, J.K. Genetic determinants of sensitivity to diazepam in inbred mice. *Behav. Neurosci.* 112:668-677; 1998.
11. Crawley, J.N.; Belknap, J.K.; Collins, J.C.; Crabbe, J.C.; Frankel, W.; Henderson, N.; Hitzemann, R.J.; Maxson, S.C.; Miner, L.L.; Silva, A.J.; Wehner, J.M.; Wynshaw-Boris, A.; Paylor, R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 132:107-124; 1997.
12. Crusio, W.E., Bertholet, J-Y.; Schwegler, H. No correlation between spatial and non-spatial reference memory in a T-maze task and hippocampal mossy fibre distribution. *Behav. Brain Res.* 41:251-259; 1990.
13. File, S.E.; Wardill, A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44:53-59; 1975.
14. Flint, J.; Corley, R.; DeFries, J.C.; Fulker, D.W.; Gray, J.A.; Miller, S.; Collins, A.C. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science* 269:1432-1435; 1995.
15. Garrett, K.M.; Niekrasz, I.; Haque, D.; Parker, K.M.; Seale, T.W. Genotypic differences between B6 and A inbred mice in anxiolytic and sedative actions of diazepam. *Behav. Genet.* 28:125-136; 1998.
16. Gershenfeld, H.K.; Neumann, P.E.; Mathis, C.; Crawley, J.N.; Li, X.; Paul, S.M. Mapping quantitative trait loci for open-field behavior in mice. *Behav. Genet.* 27:201-210; 1997.



17. Goodlett, C.R.; Hamre, K.M.; West, J.R. Dissociation of spatial navigation and visual guidance in *Purkinje cell degeneration (pcd)* mutant mice. *Behav. Brain Res.* 47:129-141; 1992.
18. Henderson, N.D. Genetic influences on the behavior of mice can be obscured by laboratory rearing. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 72:505-511; 1970.
19. Lalonde, R.; Strazielle, C. Motor performance of spontaneous murine mutations with cerebellar atrophy. In: Crusio, W.; Gerlai, R.; eds. *Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behavior research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences, vol 13)*. Amsterdam: Elsevier, 1999: 627-637.
20. Lalonde, R.; Dubois, M., Strazielle, C.; Eyer, J. Motor coordination and spatial orientation are affected by neurofilament maldistribution: correlations with regional brain activity of cytochrome oxidase. *Exp. Brain Res.* 126:223-234; 1999.
21. Le Roy, I.; Carlier, M.; Roubertoux, P.L. Sensory and motor development in mice: genes, environment and their interactions. *Behav. Brain Res.* 125:57-64; 2001.
22. Lines, C.R.; Milner, A.D. A deficit in ambient visual guidance following superior colliculus lesions in rats. *Behav. Neurosci.* 99:707-716; 1985.
23. Logue, S.F.; Owen, E.H.; Rasmussen, D.L.; Wehner, J.M. Assessment of motor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of inbred mouse strains and F<sub>1</sub>hybrids: implications for gene and quantitative loci analyses. *Neuroscience* 80:1080-1086; 1997.
24. Mathis, C.; Paul, S.M.; Crawley, J.N. Characterization of benzodiazepine-sensitive behaviors in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice. *Behav. Genet.* 24:171-180; 1994.
25. Mathis, C.; Newmann, P.E.; Gershenfeld, H.; Paul, S.M.; Crawley, J.N. Genetic analysis of anxiety-related behaviors and responses to benzodiazepine-related drugs in AXB and BXA recombinant inbred mouse strains. *Behav. Genet.* 25:557-568; 1995.

26. Mayeda, A.R.; Hofstetter, J.R.; Belknap, J.K.; Nurnberger, J.I. Jr. Hypothetical quantitative trait loci (QTL) for circadian period of locomotor activity in CXB recombinant inbred strains of mice. *Behav Genet.* 26:505-511; 1996.
27. Moisan, M.-P.; Courvoisier, H.; Bihoreau, M.-T.; Gauguier, D.; Hendley, E.D.; Lathrop, M.; James, M.R.; Mormède, P. A major quantitative trait locus influences hyperactivity in the WKHA rat. *Nature Genet.* 14:471-473; 1996.
28. Morris, R.G.M.; Garrud, P.; Rawlins, J.N.P.; O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 292:681-683; 1982.
29. Owen, E.H.; Christensen, S.C.; Paylor, R.; Wehner, J.M. Identification of quantitative trait loci involved in contextual and auditory-cued fear conditioning in BXD recombinant inbred strains. *Behav. Neurosci.* 111:292-300; 1997.
30. Owen, E.H.; Logue, S.F.; Rasmussen, D.L.; Wehner, J.M. Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80:1087-1099; 1997.
31. Patel, N.V.; Hitzemann, R.J. Detection and mapping of quantitative trait loci for haloperidol-induced catalepsy in a C57BL/6J x DBA/2J F<sub>2</sub> intercross. *Behav. Genet.* 29:303-310; 1999.
32. Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 14:149-167; 1985.
33. Radcliffe, R.A.; Jones, B.C.; Erwin, V.G. Mapping of provisional quantitative trait loci influencing temporal variation in locomotor activity in the LS X SS recombinant inbred strains. *Behav. Genet.* 28:39-47; 1998.
34. Ramos, A.; Berton, O.; Mormède, P.; Chaouloff, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.* 85:57-69; 1997.

35. Rodgers L.J.; Cole, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J.; Hendry, C.A.; eds. *Ethology and pharmacology*. New York: Wiley, 1994: 9-44.
36. Sagvolden, T.; Hendley, E.D.; Knardahl, S. Behavior of hypertensive and hyperactive rat strains: hyperactivity is not unitarily determined. *Physiol. Behav.* 52:49-57; 1992.
37. Thifault, S.; Lalonde, R.; Sanon, N.; Hamet, P. Longitudinal analysis of motor activity, anxiety, and spatial learning in mice with altered blood pressure. *Brain Res.* 910:99-105; 2001.
38. Toth, L.A.; Williams, R.W. A quantitative genetic analysis of locomotor activity in CXB recombinant inbred mice. *Behav. Genet.* 29:319-328; 1999.
39. Trullas, R.; Skolnick, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology* 111:323-331; 1993.
40. Turri, M.G.; Talbot, C.J.; Radcliffe, R.A.; Wehner, J.M.; Flint, J. High-resolution mapping of quantitative trait loci for emotionality in selected strains of mice. *Mamm. Genome* 10:1098-1101; 1999.
41. Turri, M.G.; Henderson, N.D.; DeFries, J.C.; Flint, J. Quantitative trait locus mapping in laboratory mice derived from a replicated selection experiment for open-field activity. *Genetics* 158:1217-1226; 2001.
42. Turri, M.G.; Datta, S.R.; DeFries, J.C.; Henderson, N.D.; Flint, J. QTL analysis identifies multiple dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. *Curr. Biol.* 11:725-734; 2001.
43. Upchurch, M.; Wehner, J.M. Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance. *Behav. Genet.* 18:55-68; 1988.
44. van Gaalen, M.M.; Steckler, T. Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav. Brain Res.* 115:95-106; 2000.
45. Wahlsten, D. Heritable aspects of anomalous myelinated fibre tracts in the forebrain of the laboratory mouse. *Brain Res.* 68:1-18; 1974.

46. Wehner, J.M.; Radcliffe, R.A.; Rosmann, S.T.; Christensen, S.C.; Rasmussen, D.L.; Fulker, D.W.; Wiles, M. Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. *Nature Genet.* 17:331-334; 1997.

Table 1. Mean  $\pm$  S.E.M. movement times and latencies before falling in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice in the coat-hanger test

Groups	B6	A/J
2-paw MT	116 $\pm$ 4	79 $\pm$ 11*
3-paw MT	348 $\pm$ 7	325 $\pm$ 13
4-paw MT	353 $\pm$ 6	332 $\pm$ 12
midway MT	293 $\pm$ 44	205 $\pm$ 52
top MT	329 $\pm$ 31	232 $\pm$ 52
fall latencies (s)	249 $\pm$ 22	266 $\pm$ 18

\*  $p < 0.05$  vs B6

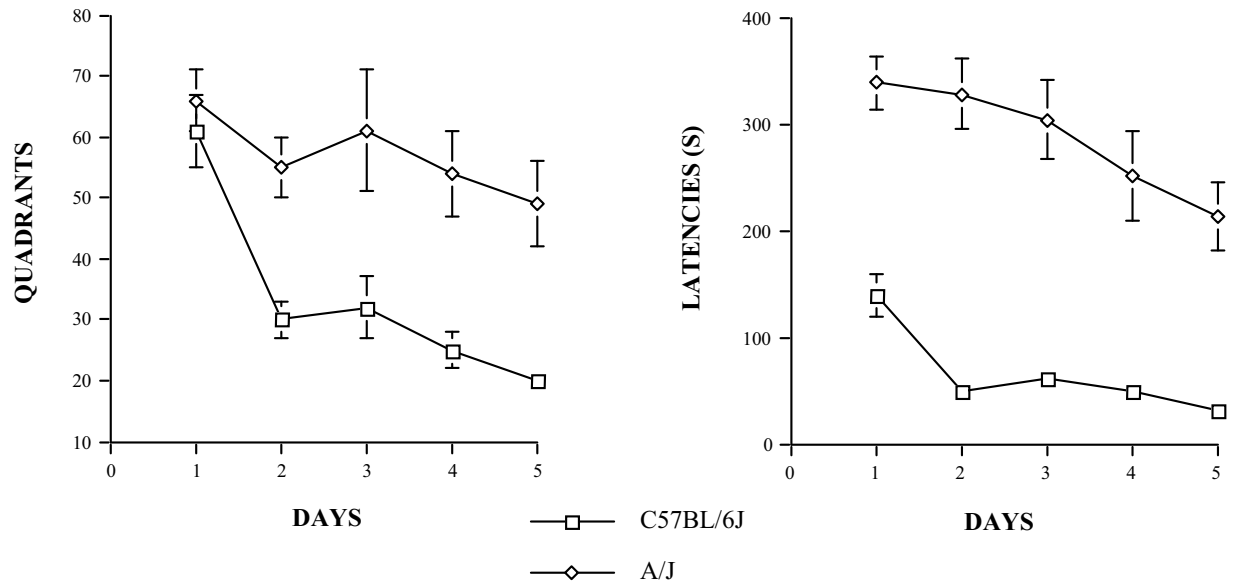


FIG. 1. Mean  $\pm$  S.E.M. quadrant entries and escape latencies in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice in the hidden platform condition of the Morris water maze.

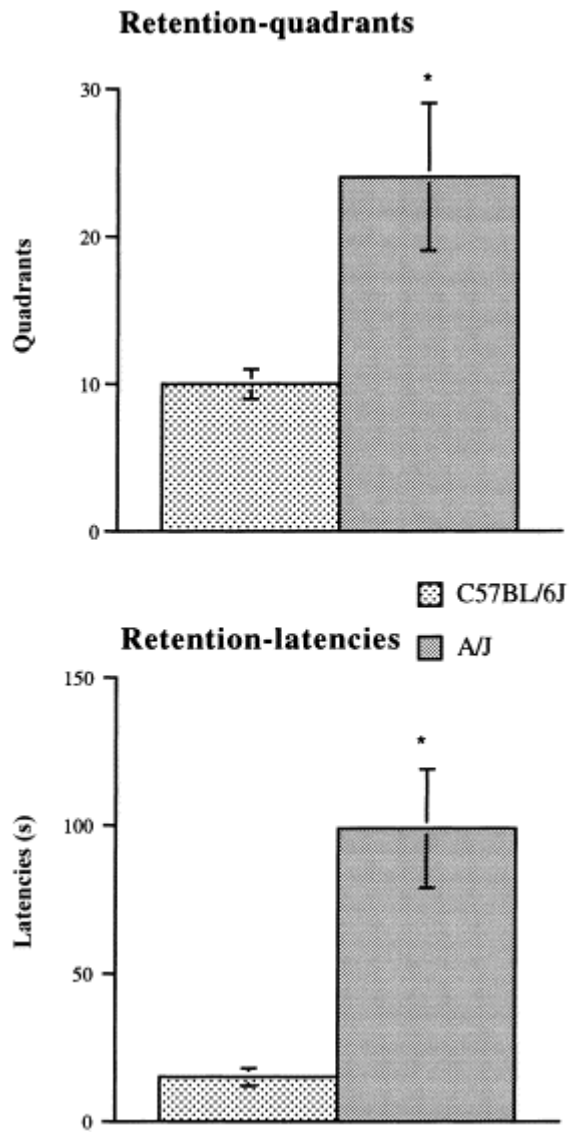


FIG. 2. Mean  $\pm$  S.E.M. quadrant entries and escape latencies in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice during long-term retention of the Morris water maze. \*  $p < 0.05$  vs B6

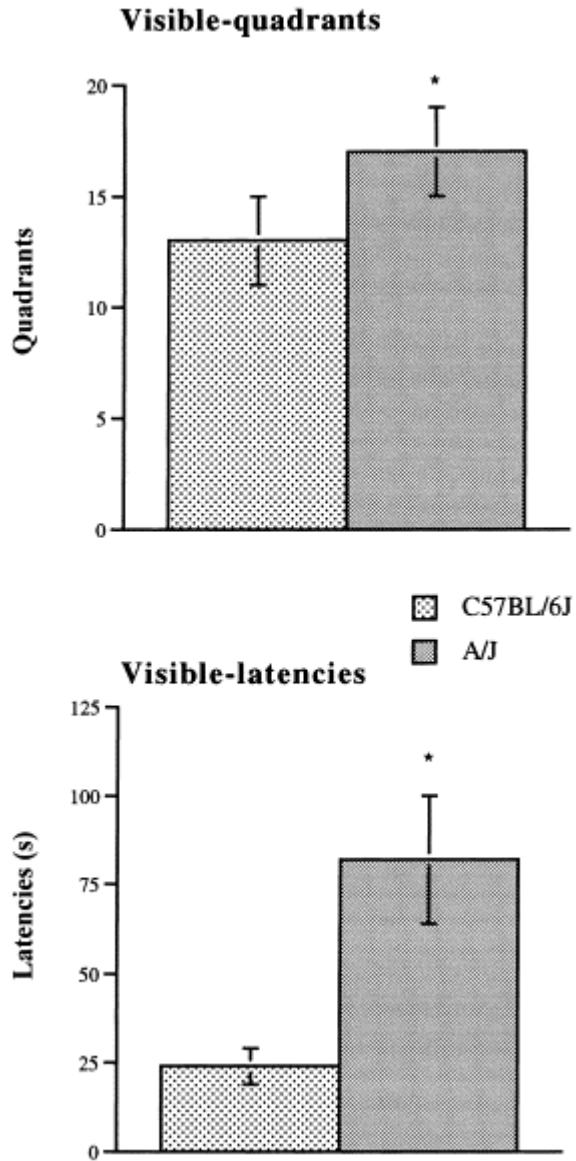


FIG. 3. Mean  $\pm$  S.E.M. quadrant entries and escape latencies in s by C57BL/6J (B6) and A/J mice during the visible platform condition of the Morris water maze. \*  $p < 0.05$  vs B6



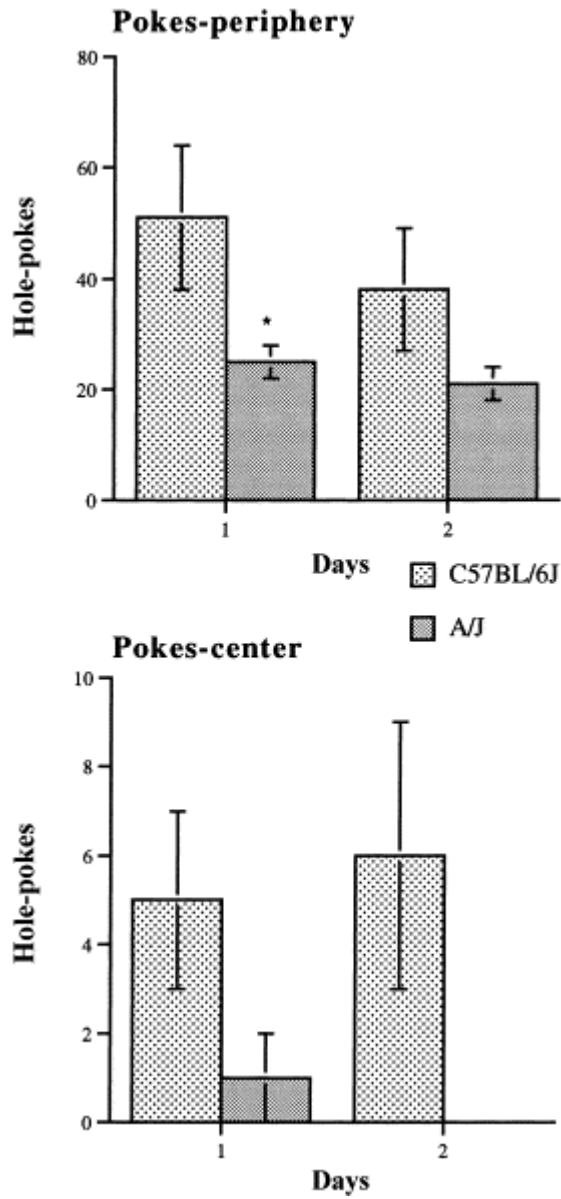


FIG. 4. Mean  $\pm$  S.E.M. number of hole-pokes in the periphery and in the center of the hole-board by C57BL/6J (B6) and A/J mice. \*  $p < 0.05$  vs B6

## Chapitre 5. ARTICLE 4

# QUÊTE DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE PHÉNOTYPES DE STRESS DANS LES SOUCHES DE SOURIS RECOMBINANTES CONGÉNIQUES AcB/BcA

### 5.1. Genetic determinants of emotionality and stress response in AcB/BcA recombinant congenic mice and *in silico* evidence of convergence with cardiovascular candidate genes

STÉPHANE THIFAUT<sup>1</sup>, ONDŘEJ ŠEDA<sup>1</sup>, YULIN SUN<sup>1</sup>, ANNY FORTIN<sup>2</sup>, EMIL  
SKAMENE<sup>3</sup>, ROBERT LALONDE<sup>1</sup>, JOHANNE TREMBLAY<sup>1</sup>, AND PAVEL  
HAMET<sup>1\*</sup>

## 5.2. Abstract

Genomic loci bearing stress-related phenotypes were dissected in recombinant congenic strains (RCS) of mice with C57BL/6J (B6) and A/J progenitors. Adult male mice from 14 A/J and 22 B6 background lines were evaluated for emotional reactivity in open-field and elevated plus-maze tests. Core temperature was monitored by radio telemetry during immobilization and on standard as well as salt-enriched diets. In addition, urinary electrolytes were measured. Genome-wide linkage analysis of the parameters revealed over 20 significant quantitative trait loci (QTL). The highest logarithm of odds (LOD) scores were within the previously-reported open-field emotionality locus on Chr 1 (LOD=4.6), in the dopa decarboxylase region on Chr 11 for the plus-maze (LOD=4.7), and within a novel region of calmodulin 1 on Chr 12 for  $\text{Ca}^{++}$  excretion after a 24-hr salt load (LOD=4.6). RCS stress QTL overlapped with several candidate loci for cardiovascular disease. *In silico* evidence of functional polymorphisms by comparative sequence analysis of progenitor strains assisted to ascertain this convergence. The anxious BcA70 strain showed down regulation of the *Atp1a2* gene expression in the heart ( $P < 0.001$ ) and brain ( $P < 0.05$ ) compared to its parental B6 strain, compatible with the enhanced emotionality described in knock out animals for this gene, also involved in the salt-sensitive component of hypertension. Functional polymorphisms in regulatory elements of candidate genes of the cardiovascular / inflammatory / immune systems support the hypothesis of genetically-altered environmental susceptibility in cardiovascular disease development.

### 5.3. Introduction

Animal models provide valuable tools for the dissection of ecogenomics of multifactorial traits (1) as they allow significant reduction of complexity of interacting hereditary and environmental factors. The genomic determinants of stress-related phenotypes (2) and hypertension (3) have begun to be identified in several mouse models, including comprehensive sets of strains derived from A/J and B6. Challenging efforts are being made toward fine-mapping to the quantitative trait nucleotide level and translation into new knowledge for mental (4,5) and cardiovascular (CV) health (6).

The AxB/BxA recombinant inbred (RI) panel was formed by interbreeding B6 and A/J founders (7). When comparing the parental strains, the B6 group had higher open-field activity than the A/J group (8-14), more transitions in the light/dark box (15,16), more hole-poking responses (12), higher open arm duration in the elevated plus-maze (EPM) (14), and a higher number of cued and contextual fear-conditioning responses (17). Since the timid behaviour of the A/J albino strain is apparent in the plus-maze under red light, it is assumed that heightened susceptibility to light is not the main reason for its high anxiety levels relative to other strains (18). Analysis of AxB/BxA RI strains revealed several quantitative trait loci (QTL) for baseline and diazepam-induced activity in open-field and light/dark box tests (19) as well as ethanol- (20) and cocaine-induced activation (21). Ambulatory QTL in the open-field on Chr 1 (101 cM) and 10 (74 cM) were confirmed in F2 progeny derived from A/J and B6 lines (11).

The AcB/BcA recombinant congenic strains (RCS) used in our study differs from the RI panel in that each line carries a fraction (12.5%) of the genome on the complementary background (87.5%) of the other (7). This model system was designed for genetic dissection of complex diseases characterized by multiple susceptibility factors such as those involved in colon cancer (22). With A/J and B6 as progenitors, QTL were identified for host immune response (23,24), the acoustic startle response (25), alcohol intake (26), amphetamine-induced (27), cocaine-induced (28), nicotine-induced (29) and stress-induced activation (2).

The present study complements our previous QTL analyses of the stress response, metabolism and gene expression in mice and RI rat strains (30-34), indicating the pleiotropism of heightened stress susceptibility in genetic hypertension (35-37), which can be amplified and revealed with a high-salt diet like in some human populations (6). Hypothermia in mice corresponds to the initial stage of an acute stress response, evident after high doses of LPS (38), similar to the rat hypothermic response (36,39). In 7 inbred mouse strains (NM, C3H, B1/6, B1/10, Balb/c, A/J and SHM), body temperature changes (hypothermia followed by a recovery phase of thermogenesis) after injection of a high-LPS dose (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were highly correlated ( $r = +0.95$ ,  $p < 0.01$ ) with 15-min immobilization stress (unpublished data).

Here, the strain distribution and genomic determinants associated with behavioural profile (exploration of the open-field and elevated plus-maze) were assessed along with stress-induced physiological measures of body temperature changes, urinary volume, and electrolyte excretion on a normal diet and after salt loading. Given the availability of complete genome sequences of the B6 and A/J parental lines, we performed detailed analyses of the identified QTL at the single nucleotide polymorphism (SNP) level, utilizing both private and public databases. Multiple bioinformatic tools were deployed to determine putative functional implications of individual SNPs. This screening covered interference with functional motifs for both coding and regulatory regions, and changes in mRNA secondary structure or in microRNA target sequences in the 3' untranslated region (3'UTR).

## **5.4. Results**

### **5.4.1. Exploration of environmental stimuli.**

For emotionality (Emo) in the open-field (OF), broad sense heritability ( $H^2$ ) was 60.9% on the B6 and 50.1% on the A/J background. Polarity between parental strains was highly significant ( $P < 0.0001$ ), with the B6 lines showing less Emo. The introduction of

A/J alleles into the genomic background of the informative strains was associated with increased Emo in the BcA70 and BcA72 lines relative to B6 ( $P < 0.002$ ) as presented in Fig. 1A; conversely, line AcB54 was less emotional than its A/J parental strain ( $P < 0.004$ ). A similar strain distribution pattern (SDP) was obtained for fecal boli (data not presented), with the same informative BcA70 and AcB54 strains being significant in their respective B6 ( $H^2=61.0\%$ ) and A/J ( $H^2=46.0\%$ ) backgrounds. BcA70, BcA72 and AcB54 were also close to significance ( $P < 0.01$ ) for segment-crossed measurement ( $H^2=61.0\%$  in the B6 set;  $60\%$  in the A/J background). Significant Emo QTL were found for the B6 set on Chr 1, 3, 4 (2 loci), and 7 (distal) regions, with their respective logarithm of odds (LOD) scores of 4.6, 3.9, (3.5, 3.2) and 3.5 (Table 1), and where albino anxiogenic alleles were detected on BcA70 and BcA72 informative strains. Similar but only suggestive QTL on Chr 1, 3 and 4 were obtained for fecal boli in the B6 set, and no significant QTL were observed with crossed segments.

In the EPM, emergence latencies from the initial enclosed arm displayed a heritability estimate of 59.8% on the B6 and 57.6% on the A/J background, with huge polarity between parental strains ( $P < 0.0001$ ). Figure 1B illustrates that the BcA72, BcA85, and BcA87 lines took more time before starting to explore than B6 ( $P < 0.002$ ); conversely, AcB51 mice emerged faster than A/J ( $P < 0.004$ ). The SDP followed a similar pattern for enclosed arm visit duration, but interstrain differences were more prominent in the B6 set ( $H^2 = 53.5\%$  versus  $39.5\%$  in the A/J set). Significant linkage signals were detected in the B6 background on Chr 9, 11, and 19 for emergence latencies (LOD = 3.8, 4.7 and 3.9). These QTL corresponded to shorter emergence latencies in lines bearing A/J alleles. However, a shorter emergence latencies was associated with the B6 allele in the AcB51 strain contributing to the QTL on the upstream region of Chr.1 (LOD = 3.4) found in the A/J set. Finally, for 1 QTL detected on proximal Chr 7 (LOD = 3.8), the introduction of A/J alleles on the BcA69, BcA72, and BcA87 lines was associated with increased enclosed arm duration relative to B6 ( $P < 0.01$ ).

#### 5.4.2. Body temperature stress response under normal and increased salt diet.

In the 30-min immobilization period, 2 highly inter-correlated phases of response ( $r = -0.84$ ,  $P < 0.0001$  from the means of all 36 strains) were noted: initial hypothermia defined as the delta between the minimum and baseline temperatures, followed by thermogenesis measured as the temperature at the last minute of immobilization. Relevantly, each phase of the response was distinct in terms of their genetic determinants. Heritability estimates, which reflect the genetic influence on core temperature interstrain variability, appeared elevated on the A/J background for both hypothermic ( $H^2 = 51.7\%$ ) and thermogenesis ( $H^2 = 66.1\%$ ) responses compared to the pre-stress period ( $H^2 = 45.8\%$ ). The A/J line manifested much less thermogenesis than B6 ( $P < 0.01$ ), but the parental strains did not differ in terms of hypothermia ( $P > 0.8$ ). The AcB56 strain differed from A/J for both hypothermic ( $P < 0.01$ ) and thermogenesis ( $P < 0.05$ ) responses (see Fig. 1C, D). Two significant QTL were found on Chr 2 and 15 in the A/J set (Table 1), where the presence of the B6 differential segment was associated with a reduced hypothermic response. Conversely, in the A/J set, near significant pro-thermogenesis QTL were detected on Chr 3 and 10 (Table 1). In the B6 background, the BcA77, BcA82, and BcA83 lines manifested significantly less thermogenesis than B6 ( $P < 0.002$ ; Fig. 1D).

Salt loading did not change the polarity of the progenitors, with the A/J line showing less thermogenesis than B6 ( $P < 0.01$ ); neither was there an ancestor difference on hypothermia ( $P > 0.7$ ). However, higher intra-strain variability compared to standard diet conditions reflected the environmental component of the hypothermic phase. This was less the case in the B6 background, in which distinct QTL were detected for the hypothermic response, showing a phenotype-specific interaction between salt-loading and genetic background (Table 2). The BcA66 strain was the most sensitive, experiencing even deeper hypothermia than the parental B6 line ( $P < 0.05$ , see Fig. 2D), and contributing to QTL revealed on Chr 1, 4 (2 loci), 15, and 18 (LOD = 3.5, 3.8, 3.6, 3.7, and 3.4), where A/J

alleles increased the hypothermic response to stress. The BcA66, BcA73 and BcA77 lines displayed less thermogenesis than B6 ( $P < 0.002$ , Fig. 2E).

#### **5.4.3. Circadian rhythm of baseline temperature before and during a high-salt diet.**

Significant main effects of diet and strain factors in 2-way ANOVA were found as a result of lower temperature under the high-salt condition [ $F(1,15) = 35.35$ ;  $P < 0.0001$ ] and for the A/J strains [ $F(1,15) = 79.03$ ;  $P < 0.0001$ ]. Nevertheless, an interaction between strain and circadian period effects on 24-hr baseline temperatures was seen only under the high-salt condition [ $F(1,15) = 8.69$ ;  $P < 0.01$ ], in which strain differences were steeper during the dark phase. In concordance with the parental lines, significant interactions between all RCS and circadian period factors were observed for body temperature [ $F(1,35) = 2.47$ ;  $P < 0.0001$ ].

#### **5.4.4. Urinary volume and electrolytes after 24 hr of a high-salt diet.**

The A/J strain was characterized by lower urinary volume than B6 ( $P < 0.01$ ). A QTL for urinary volume ( $H2 = 59.8\%$  in the B set) was detected at a single site on Chr 11, corresponding to A/J alleles that decreased urinary volume in the BcA80 and BcA85 strains ( $P < 0.01$ ) relative to B6 (Fig. 2A). Among electrolytes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , and creatinine) that were measured, only  $\text{Ca}^{++}$  excretion in the A/J set and creatinine excretion in the B6 set ( $H2 = 51\%$ ;  $62\%$  respectively) showed significant QTL, on Chr 1, 2, 4, 8, 11, 12, 13 and 17 for the former, and on Chr 15 for the latter (Table 2). All QTL for  $\text{Ca}^{++}$  caused decreased excretion in the already low A/J set, with no concordant parental strain differences ( $P > 0.8$ , see Fig. 2B). However, caution is warranted concerning  $\text{Ca}^{++}$  excretion in the A/J set, because of numerous missing values in some contributing strains as a result of insufficient volumes. The QTL for creatinine excretion corresponded to an increase in the already high-excreting B6 strain ( $P < 0.05$ , A/J vs. B6).



#### **5.4.5. In silico exploration of putative candidate genes.**

OF emotionality QTL interval is presented in greater detail because of the high statistical significance, spatial resolution and concordance with the literature. Starting from 83 known genes in this region, 38 of these had some SNPs in between parental strains; 5 of these contained major putative changes and could be classified into 2 categories. The CV system-related genes *Atp1a2* and *Nhlh1* as well as the immune/inflammatory genes *Slamf1*, *Fcgr3* and *Crp* shared mRNA secondary structure changes with significant impact on binding motifs, and either functional SNP in the promoter or coding regions. A detailed summary of these results is included in Table 3. Figure 5 and Supplementary Figure 1 depict in greater detail the *Crp* gene to illustrate the nature of the changes that were observed. The same analyses were made for all other QTL, with a detailed summary of these results appearing in Supplementary Table 1, and the relevant genes mentioned in the Discussion. Overall, only a fraction of the genes from Tables 1 and 2 contained putative functional polymorphisms.

#### **5.4.6. Quantitative real-time (RT) PCR validation of differential gene expression.**

Differential expression between progenitors and informative strains was observed only for 1 gene out of the 5 candidates. The anxious BcA70 strain showed down regulation of the *Atp1a2* gene in the brain ( $P < 0.05$ , Fig. 4A), and heart ( $P < 0.001$ , Fig. 4B) compared to its parental B6 strain.

### **5.5. Discussion**

We have previously reviewed the origin of stress research as a central theme not only for its impact on behaviour but also on cardiovascular outcomes. We recalled that “Hans Selye came upon reflection on human adaptation when he was told that “those boys who did not make it in the trenches had unusually large adrenals” as observed in autopsies.

Time was First Great war and place was Charles University in Prague where as a young medical student, he overheard this conversation between assistant professors of anatomy and pathology” (37). Using a model of recombinant congenic mice originating from a cross between two phenotypically distinct strains we are reporting an extensive set of genomic determinants of stress/emotionality and potentially related immune components that we believe can serve for future exploration of novel pathogenetic, therapeutic and preventive targets in cardiovascular diseases with hypertension as its leading risk and global burden (40). We have narrowed down several previously described larger genomic regions and uncovered novel ones contributing to mammalian response to environmental disturbances.

Three Chr 1 markers located between 93.3 and 95.8 cM were highly associated with emotional reactivity in the OF for AcB/BcA RCS. Our fine mapping was consistent with a report on intercrosses of chromosome substitution strains derived from A/J and B6 (41). These QTL were near the highest LOD score obtained for the same measure with a F2 intercross from DeFries high- and low-activity strains (42). The same region was associated with haloperidol-induced catalepsy in BxD/DxB RI strains (43). Further analyses of the F2 intercross from DeFries strains revealed the position of the emotional reactivity locus (*Emo1*) at 95 cM on Chr 1 (44). A similar association on a nearby chromosomal region was obtained with open arm entries and duration as well as enclosed arm entries in the EPM together with latencies before entering the lit side of the light/dark box (45). The same region was suggestively associated with hypoactivity induced by an injection of the anticholinesterase inhibitor paraoxon in BxD/DxB RI strains (46). Likewise, provisional QTL were detected for circadian activity in the home-cage at 92.6 and 94.2 cM with the BxC/CxB RI strain (47).

Many QTL on Chr 1 seem to define a stress-related cluster involved in CV disease development, since QTL for blood pressure (BP) (48,49), atherosclerosis (50), and oxidative stress susceptibility (51) have been described in the vicinity of the *Emo1* region. Table 1 illustrates the overlap with BP QTL in A/J and B6 backcrosses known as salt-induced *bpq* (48), and with BP QTL in A/J X B6 F2, named *abbp* (3). Because BP

measurements were made under immobilization, one could consider these BP QTL as stress-related markers, since under radio telemetry, mice did not habituate BP and heart rate responses, even after 10 days of exposure to immobilization (52).

Moreover, our most significant OF QTL on mouse Chr 1 was syntenic to a cluster of metabolic phenotypes of hypertension in our studies of French-Canadian families (53) and hypertensive dyslipidemic rats (54-56). Figure 3 presents homology maps related to the Chr 1 QTL. Functional polymorphisms were described in candidate genes of the CV / inflammatory / immune systems, supporting the hypothesis that an altered stress response plays a role in CV disease development (37). Validation by RT-PCR confirmed a down-regulation of the *Atp1a2* gene in the informative strain for anxiety (Fig. 4). Brain differential expression of *Atp1a2* may thus explain the observed enhanced emotionality (57), since heterozygous knock out for this gene displays similar behavior (58,59), while A/J mice show fear memory impairments with deficits in amygdalar long-term potentiation (60). Interestingly, this gene is also involved in the salt-sensitive component of hypertension, exerting a major action on cardiac output and peripheral resistance (61-63). Finally, heterozygous mutation of that gene in humans (Leu764Pro) will cause familial hemiplegic migraine 2 (64). *Crp* expression was not affected in our adult group. This observation was not unexpected (65), even in the presence of substantial differences between RCS progenitors revealed in our *in silico* analyses (Fig. 5). Nevertheless, further investigation is warranted particularly in aged animals in which systolic hypertension can be caused by *Crp*-related nitric oxide and renin-angiotensin deregulation (66,67), that could possibly be amplified by chronic stress (68,69). *Rgs2* fell out of our significant locus boundaries, but nevertheless has already been described as a QTG for *Emo1* locus on Chr 1 (70,71). Interestingly enough, this gene was also linked to hypertension development (49,72), and was recently reported to be differentially inherited and expressed in AJ and B6 (73).

In addition to Chr 1 (Table 1), we noted significant linkages for emotional reactivity in the OF on Chr 3 (58.8 cM), 4 (2.5 and 59.1 cM), and 7 (64 cM). A suggestive QTL for

paraoxon-induced hypoactivity was detected at the 22.7 cM locus on Chr 3 (46). For Chr 4, a provisional QTL for OF activity was identified with BxD/DxB RI strains at approximately the same site (59 cM) as one of our markers (74). Moreover, QTL on Chr 4 were found in the open-field and plus-maze (45) and confirmed in the rat syntenic region on Chr 5 (75-77). From the CV perspective, our QTL on Chr 3 and 7 were near homologous regions of rat Chr 2 for QTL associated with early-onset bradycardia and later-onset tachycardia in response to an airpuff stimulus (78).

In the EPM, QTL were found on Chr 1 (32.8-36.9 cM), 7 (16-18 cM), 9 (17- 25 cM), 11 (0-17 cM) and 19 (47 cM). The Chr 9 locus containing *Grik4* (glutamate kainate receptor 4) and Chr 19 QTL correspond to those obtained in the OF after saline injection in AxB/BxA RI and AcB/BcA RCS (2). The Chr 9 region is also near an homologous region of rat Chr 8 associated with BP determinants in HXB-BXH RI strains (78,79), the salt-sensitive component of BP in a F2 population (80), and several metabolic syndrome-related features (81). The most significant QTL for the EPM was revealed on Chr 11 bearing *Ddc* (7.0 cM) that encodes dopa decarboxylase, the monoaminergic-synthesizing enzyme for dopamine, noradrenaline, and 5-hydroxytryptamine synthesis and a relevant candidate gene for affective and attention deficit disorders (82).

With the standard diet, significant QTL for stress-induced hypothermia were identified on Chr 2 (79.7-81.7 cM) and Chr 15 (9.9-24 cM). Two other QTL were associated with thermogenesis on Chr 3 (22 cM) and Chr 10 (44-52 cM). The same Chr 10 region was also detected in the A/J set for emergence latencies in the plus-maze at a lower significance level (LOD = 1.7). The common region might explain the significant correlation between these 2 variables ( $r = -0.59$ ,  $P < 0.0001$ ) and suggest a shared biological pathway. The Chr 10 region contains the *Igf1* gene encoding insulin-like growth factor 1 that is likely to be linked to BP regulation (83).

On the salt-diet challenge, QTL for stress-induced hypothermia were elicited on Chr 1 (8.4 cM), 4 (6.5 and 66 cM), 15 (59.2 cM), and 18 (20 cM). The most significant QTL on Chr 4 is a locus for triglyceride level at 6.5 cM (84) near *Bpq3* (48) or *Abbp2* (3), and

within brain cannabinoid receptor 1 gene (*Cnr1*) involved in both emotional processing (85) metabolic regulation (86), and more recently even in blood pressure regulation (87). Both loci on Chr 4 are close to those detected in the OF; the one downstream contains *Htr1d* receptors that were shown to regulate redox equilibrium and the tumor necrosis factor -alpha cascade in the nervous system (88). Upstream Chr 4 caspase 8-associated protein 2 (*Casp8ap2*) gives another possible link to the immune response (89). Our Chr 18 QTL (22 cM) is located at the locus of *Nr3c1* encoding for the glucocorticoid receptor, providing a possible link between stress and metabolic syndrome (90). Finally, Chr 15 QTL is identical to the one revealed for the acoustic startle response in the same RCS (25). This region is close to the *Emo2* QTL on Chr 15 at 43.3 cM (11); Smoller et al. (91) provided evidence of linkage of human homolog Chr 12q13 with panic disorder/agoraphobia. Moreover, this region is syntenic to the rat *Hsf1* gene region (<http://gapp.gen.gu.se>) associated with stress gene expression which we have previously identified through mapping of several *Hsps* mRNA as the first transcriptomic based mapping approach reported (33).

A QTL for urinary volume was detected at a single Chr 11 site (44.8 cM). This QTL is concordant with a homologous region of rat Chr 10 associated with stress susceptibility (30,92), salt retention (34), and hypertension (93). The region also encodes *Nos2* (45.6 cM), the inducible form of nitric oxide synthase near *Abbp4* (58 cM).

The QTL for creatinine excretion on Chr 15 (51.1-54.5 cM) is near the one for stress-induced hypothermia under a high-salt load. The most significant QTL for  $\text{Ca}^{++}$  excretion (LOD = 4.6) on Chr 12 (48-50 cM) bears *Calml1* encoding calmodulin 1, the overexpression of which induces cardiac hypertrophy (94).

In the context of genetic hypertension, we have also suggested that stress may be considered as a special case of gene/environment interaction in which some gene expression manifests susceptibility to the environment (32,33,39). In this perspective, we report phenotype-specific interactions between salt-loading and genetic background that may recall the marked heterogeneity of neuroendocrine responses to various stressors (95).

By contrast, the overlapping linkage of Emo, stress susceptibility and hypertension to homologous genomic regions may be explained by pleiotropy or common pathways related to stress susceptibility; some of them might be grouped in gene clusters (53,96).

*In silico* sequence analysis (97-99) of selected candidate genes in A/J and B6 strains led us to hypothesis-driven functional genomics which can be a filter to transcriptome-based systematic screening studies (100), and confirms the relevance of considering polymorphisms in regulatory elements. Clearly, the loci determined in the current study represent important stepping stone for further detailed analyses, as the actual relevance of particular polymorphisms within genes and intergenic regions for the resulting phenotypes is yet to be fully explored. In another report, a multiple regression model was used to trace donor alleles associated with gene expression profiles in RCS (73). SNPs in the 3'UTR were present in 64% (versus 29%) of genes showing such associations. Some of them are related to transcription factors, such as *Usf1*, or can be confirmed by an allelic imbalance test as for *Rgs2* gene. Our identification of stress-related QTL and functional genomic variations with relevant informative strains is valuable to the genome-wide cataloguing of regulatory variants in RCS, a powerful tool for the dissection of complex diseases (73). Future perspectives of research include inter-specific F2 crosses or congenic strain production with relevant informative RCS to confirm these provisional QTL in specific regions of interest.

Overall, our studies described here are a part of our global pursue of an integrated approach in resolution of such complex diseases (1) as hypertension, with its hemodynamic, metabolic, humoral and immune components, forms a node between atherosclerosis, ischemic heart disease, diabetes, dyslipidemias and obesity in a newly proposed concept of graph-theoretic network of phenotypes and their associated diseases, the *human diseasome* (101).

## **5.6. Materials and methods**

### **5.6.1. Animals.**

RCS male mice from 14 lines primarily on the A/J background (AcB) and 22 lines primarily on the B6 background (BcA) were randomly provided with their founders by the McGill University Health Centre (MUHC) Research Institute to CHUM - Hôtel-Dieu at 3 months of age ( $n = 7$  per strain). The RCS were originally obtained by backcrossing F1 progeny with either founder line, followed by at least 18 rounds of inbreeding to fixate allelic combinations with more than 99% homozygosity according to genotyping analysis (7). The inbred progeny contained approximately 12.5% of the genome of 1 parental line introduced in the other. The mice were group-housed in cages with wood shavings and in a temperature- and humidity-controlled room with a 12-hr light-dark cycle (lights on at 0700h). After at least 1 week of adaptation to their new surroundings and to handling, the mice were evaluated during the diurnal cycle in a separate room. The procedures were in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Ethics Committees at both universities.

### **5.6.2. Exploration of environmental stimuli.**

Motor activity was measured in an OF made of white plastic (30 cm x 25 cm, wall height: 15 cm), with the floor marked by a felt pen into 6 equally-spaced rectangles. The number of segments crossed (4-paw criterion) in a single 4-min session and the number of fecal boli were counted. Each value was standardized to a mean of 0 and a variance of 1. A joint trait of Emo was calculated by subtracting standardized segments crossed from fecal boli and dividing them by 2, as reported previously (44). On the following day, the mice were evaluated in the EPM made of Plexiglas, consisting of 4 arms (length: 24 cm, width: 10 cm, height from floor: 30 cm) and a 10 cm<sup>2</sup> central region. Two of the arms were enclosed by opaque walls (height: 10 cm), and the other 2 were not. The 2 enclosed arms, and the 2 open arms faced each other on opposite sides. The mice were placed in 1 of the

enclosed arms, and their emergence from that arm was measured with a hand-held stopwatch in a single 5-min session, together with the number of entries and the time spent in either enclosed or open arms (4-paw criterion). In addition, open/total arm entries and duration were calculated.

### **5.6.3. Radio telemetry measures of stress-induced hypothermia before and after a high-salt diet.**

The mice were anesthetized by inhalation of Isoflurane at 3% and maintained at 2%. The body of the radio telemetry probe (1.75 cc) (PhysioTel TA10TA-F20 model, Data Sciences, St. Paul, MN) was implanted in the abdominal cavity. After surgery, the mice received an analgesic (Buprenorphine, 0.05 mg/kg SC, with 0.001 ml/g of 0.9% saline at 37°C) for 3 days and left to recuperate for 18 more days in isolated cages. To stimulate their appetite, they were given chocolate-flavoured Ensure (1.06 mg/ml of sodium, Ross Products Division, Abbott Limited, Montreal, Quebec, Canada) mixed with their regular chow (Purina rat 5012-M, 0.28% sodium), and FruitLoops™. After 5-min baseline body temperature recordings taken in their home-cage, the mice were immobilized for 30 min in a restraining device (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA). Two to 3 days later, they were placed in metabolic cages and fed an 8% salt-rich diet (Purina Modified Lab. Rodent Testdiet 5001C-2). The procedure was then repeated. The number of deaths associated with the surgical and restraint procedures was near zero in this cohort. There was no apparent relationship between survival and genotype after each procedure.

### **5.6.4. Urinary volume and electrolytes with a salt diet.**

Twenty-four-hr urine samples were collected from each mouse placed in metabolic cages under the high-salt diet. Urinary volume and electrolyte excretion ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , and creatinine) were measured by spectrophotometry (102,103), with values corrected for body weight (34).



### **5.6.5. Genotyping.**

The strains were genotyped for 625 microsatellite markers with an average distance of 2.6 cM (range 0 to 15 cM) throughout the genome, as described previously (7).

### **5.6.6. Statistical analyses.**

The SDP of each phenotype was determined by standard descriptive statistics and heritability estimates (interstrain/intrastrain variance ratio), as described by Owen et al. (104). Informative strains, differing from their recurrent parental strain, were identified by an unpaired t-test or with Satterthwaite-Welsh correction for heterogeneous variances meeting Bonferroni correction criteria for multiple comparisons, i.e. with  $P < 0.002$  for the B6 background (0.05 divided by 22 strains) and  $P < 0.004$  for the A/J background. Only phenotypes with heritability estimates over 50% for either background were retained for further analyses. QTL were first determined by computing single marker regressions with MapManager QTX software, using strain means and variances (105). The map distances were defined for all loci with Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>) positions instead of calculated positions, and redundant markers were removed for the best fit to a self-RI model, which implicitly considers each background (albino or B6) as an independent RI set. Permutation tests (5,000 for single marker additive contributions) allowed us to calculate significance thresholds for each phenotype, adjusted for multiple testing (106). Interval mapping was then performed to obtain a likelihood ratio statistic divided by 4.61 to provide a LOD score. After reinserting removed markers into the map, fine mapping of QTL intervals was appraised by visual tracking of haplotypes in contributing and non-contributing strains (45,107). In addition, cross confirmation of the “direction of effect” between the 2 RCS sets was assessed (108). Significant QTL were confirmed by parametric t-tests, with genomic markers serving as the independent variable, and strain means as observations (25,109,110), controlling for equality of variances with an F test ratio (Statview 5.0).

### **5.6.7. In silico exploration of putative candidate genes.**

Figure 5 describes our whole approach for narrowing down QTL to QTG. For the Chr 1 QTL interval (171-174 Mb), candidate genes having SNPs polymorphic between AJ and B6 were listed with the help of the Celera Discovery System (<http://cds.celera.com>). QTL interval boundaries were translated in base pair location according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). For all other QTL, candidate genes of interest were selected from evidence-based physiological relevance starting with the Entrez Gene NCBI database. A/J and B6 progenitors were then screened with the public inbred strain SNP database from Genome Build 36.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/MouseSNP.cgi>), to find genes having SNPs within coding and untranslated mRNA sequences, or within 2 kb in the promoter region. The SNPs exact location was validated with the variation map option of NCBI Map Viewer and Blast 2 sequence tools.

Depending on their location in the coding or regulatory regions (promoter or UTRs), the functional significance of the SNPs was respectively assessed by looking for protein domains (PROSITE patterns) or DNA motifs (TRANSFAC vertebrates motif Library) in the relevant database (<http://motif.genome.jp/>). Moreover, the impact of the SNPs in the 3'UTR was further estimated with the Vienna RNAfold program web interface (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi/>). This program allows for the prediction and visualization of occurrence of mRNA secondary structure changes between A/J and B6 haplotypes, covering all SNPs within the gene sequence. In addition, a home-made pattern recognition program was built from 8-mers 3'UTR target consensus motifs for microRNAs (111), particularly at the location of secondary structure changes. AUUUA (112,113) and AAUAAA (112) motifs were also added to our pattern library. Stem-loop secondary structure, mRNA and regulatory-binding protein are all working as a structural barrier to translation (112,114); we therefore expect these features to potentially affect gene expression.

### 5.6.8. Preparation of total RNA and RT-PCR.

According to haplotype distribution (top right table in Fig. 5), BcA76 and AcB58 strains were chosen as negative controls and BcA70 as the informative strain for Emo, in addition to A/J and B6 progenitors. Mouse brain, heart, liver and kidneys were removed and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. Target organs were selected for a detectable level of gene expression according to NCBI Entrez Gene profiles. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario). Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was reverse-transcribed with random hexamer primer and M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The *Atp1a2* (forward primer 5'-ggcatcaaggatgatcatgg-3', reverse primer 5'-gctgcaatgtctccacagt-3'), *Slamf1* (forward primer 5'-cctcctcagaatcgagtcca-3', reverse primer 5'-ggctggcagtgatttgattt-3'), *Crp* (forward primer 5'-ggacttttgatcatgaagacat-3', reverse primer 5'-ggtgttcagtggtctctttg-3'), *Fcgr3* (forward primer 5'-tgattctgactggctgctg-3', reverse primer 5'-cattatggaagaacgagatcctg-3') genes and a housekeeping gene (*18S*) were selected and run in parallel for quantitative RT-PCR analysis. The level of expression of *Nhlh1* was insufficient to perform any comparison. Primers were designed with Primer3 (115) and synthesized by Invitrogen. RT-PCRs were performed with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kits (Invitrogen) in strips of 0.1 ml optical tubes (Corbett Research Pty Ltd. Sydney, Australia) according to the manufacturer's protocol, using the Rotor-Gene 3000 system (Corbett Research). The results were analyzed by the Pfaffl method (116). The expression of a given gene in the A/J ancestor strain was chosen as the control, to which each strain was then compared (n=4 per strain).

### 5.7. Acknowledgments

Methodological discussions with A.E. Boyle (from K.J. Gill's laboratory), K. Morgan and R. Jooper (McGill University) were very valuable and helpful. The statistical advice obtained from the SEMQ (Service d'Évaluation en Méthodes Quantitatives), Université de Montréal, is much appreciated, and the editorial assistance of Ovid Da Silva,

Research Support Office, Research Centre, CHUM, is acknowledged. RCS were kindly provided by Emerillon Therapeutics Inc. S.T. received a doctoral scholarship from the Canadian Heart and Stroke Foundation. This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to P.H. and to J.T. (CIHR MT-14654, Cardiogene).

*Conflict of Interest statement.* The authors have no conflict of interest to declare.

## 5.8. References

1. Seda,O., Tremblay,J., Sedova,L., and Hamet,P. (2005) Integrating genomics and transcriptomics with geo-ethnicity and the environment for the resolution of complex cardiovascular diseases. *Curr.Opin.Mol.Ther.*, **7**, 583-587.
2. Gill,K.J., and Boyle,A.E. (2005) Quantitative trait loci for novelty/stress-induced locomotor activation in recombinant inbred (RI) and recombinant congenic (RC) strains of mice. *Behav.Brain Res.*, **161**, 113-124.
3. Woo,D.D., and Kurtz,I. (2003) Mapping blood pressure loci in (A/J x B6)F2 mice. *Physiol. Genomics*, **15**, 236-242.
4. Smoller,J.W., Rosenbaum,J.F., Biederman,J., Susswein,L.S., Kennedy,J., Kagan,J., Snidman,N., Laird,N., Tsuang,M.T., Faraone,S.V. et al. (2001) Genetic association analysis of behavioral inhibition using candidate loci from mouse models. *Am. J. Med. Genet.*, **105**, 226-235.
5. Fullerton,J. (2006) New approaches to the genetic analysis of neuroticism and anxiety. *Behav.Genet.*, **36**, 147-161.
6. Imumorin,I.G., Dong,Y., Zhu,H., Poole,J.C., Harshfield,G.A., Treiber,F.A., and Snieder,H. (2005) A gene-environment interaction model of stress-induced hypertension. *Cardiovasc. Toxicol.*, **5**, 109-132.
7. Fortin,A., Diez,E., Rochefort,D., Laroche,L., Malo,D., Rouleau,G.A., Gros,P., and 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.
8. Bolivar,V.J., Caldarone,B.J., Reilly,A.A., and Flaherty,L. (2000) Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav.Genet.*, **30**, 285-293.
9. Garrett,K.M., Niekrasz,I., Haque,D., Parker,K.M., and Seale,T.W. (1998) Genotypic differences between C57BL/6 and A inbred mice in anxiolytic and sedative actions of diazepam. *Behav.Genet.*, **28**, 125-136.
10. Logue,S.F., Owen,E.H., Rasmussen,D.L., and Wehner,J.M. (1997) Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience*, **80**, 1075-1086.
11. Gershenfeld,H.K., Neumann,P.E., Mathis,C., Crawley,J.N., Li,X., and Paul,S.M. (1997) Mapping quantitative trait loci for open-field behavior in mice. *Behav.Genet.*, **27**, 201-210.

12. Thifault,S., Lalonde,R., Sanon,N., and Hamet,P. (2002) Comparisons between C57BL/6J and A/J mice in motor activity and coordination, hole-poking, and spatial learning. *Brain Res. Bull.*, **58**, 213-218.
13. Trullas,R., and Skolnick,P. (1993) Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl.)*, **111**, 323-331.
14. van Gaalen,M.M., and Steckler,T. (2000) Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav.Brain Res.*, **115**, 95-106.
15. Bouwknecht,J.A., and Paylor,R. (2002) Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains. *Behav.Brain Res.*, **136**, 489-501.
16. Gershenfeld,H.K., and Paul,S.M. (1997) Mapping quantitative trait loci for fear-like behaviors in mice. *Genomics*, **46**, 1-8.
17. Bolivar,V.J., Pooler,O., and Flaherty,L. (2001) Inbred strain variation in contextual and cued fear conditioning behavior. *Mamm.Genome*, **12**, 651-656.
18. Cohen,R.M., Kang,A., and Gulick,C. (2001) Quantitative trait loci affecting the behavior of A/J and CBA/J intercross mice in the elevated plus maze. *Mamm.Genome*, **12**, 501-507.
19. Mathis,C., Neumann,P.E., Gershenfeld,H., Paul,S.M., and Crawley,J.N. (1995) Genetic analysis of anxiety-related behaviors and responses to benzodiazepine-related drugs in AXB and BXA recombinant inbred mouse strains. *Behav.Genet.*, **25**, 557-568.
20. Gill,K., Boyle,A., Lake,K., and Desaulniers,N. (2000) Alcohol-induced locomotor activation in C57BL/6J, A/J, and AXB/BXA recombinant inbred mice: strain distribution patterns and quantitative trait loci analysis. *Psychopharmacology (Berl.)*, **150**, 412-421.
21. Boyle,A.E., and Gill,K. (2001) Sensitivity of AXB/BXA recombinant inbred lines of mice to the locomotor activating effects of cocaine: a quantitative trait loci analysis. *Pharmacogenetics*, **11**, 255-264.
22. Demant,P., and Hart,A.A.M. (1986) Recombinant congenic strains-A new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene. *Immunogenetics*, **24**, 416-422.
23. Fortin,A., Cardon,L.R., Tam,M., Skamene,E., Stevenson,M.M., and Gros,P. (2001) Identification of a new malaria susceptibility locus (Char4) in recombinant congenic strains of mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98**, 10793-10798.

24. Roy, M.F., Riendeau, N., Loredano-Osti, J.C., and Malo, D. (2006) Complexity in the host response to *Salmonella Typhimurium* infection in AcB and BcA recombinant congenic strains. *Genes Immun.*, **7**, 655-666.
25. Joobar, R., Zarate, J.M., Rouleau, G.A., Skamene, E., and Boksa, P. (2002) Provisional mapping of quantitative trait loci modulating the acoustic startle response and prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuropsychopharmacology*, **27**, 765-781.
26. Gill, K., and Boyle, A.E. (2005) Genetic analysis of alcohol intake in recombinant inbred and congenic strains derived from A/J and C57BL/6J progenitors. *Mamm. Genome*, **16**, 319-331.
27. Torkamanzehi, A., Boksa, P., Ayoubi, M., Fortier, M.E., Ng Ying Kin, N.M., Skamene, E., Rouleau, G., and Joobar, R. (2006) Identification of informative strains and provisional QTL mapping of amphetamine (AMPH)-induced locomotion in recombinant congenic strains (RCS) of mice. *Behav. Genet.*, **36**, 903-913.
28. Gill, K.J., and Boyle, A.E. (2003) Confirmation of quantitative trait loci for cocaine-induced activation in the AcB/BcA series of recombinant congenic strains. *Pharmacogenetics*, **13**, 329-338.
29. Gill, K.J., and Boyle, A.E. (2005) Genetic basis for the psychostimulant effects of nicotine: a quantitative trait locus analysis in AcB/BcA recombinant congenic mice. *Genes Brain Behav.*, **4**, 401-411.
30. Dumas, P., Pausova, Z., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Dumont, M., Ely, D., Turner, M., Sun, Y., Tremblay, J., and Hamet, P. (2000) Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rat. *Hypertension*, **35**, 568-573.
31. Pausova, Z., Sedova, L., Berube, J., Hamet, P., Tremblay, J., Dumont, M., Gaudet, D., Pravenec, M., Kren, V., and Kunes, J. (2003) Segment of rat chromosome 20 regulates diet-induced augmentations in adiposity, glucose intolerance, and blood pressure. *Hypertension*, **41**, 1047-1055.
32. Malo, D., Schlager, G., Tremblay, J., and Hamet, P. (1989) Thermosensitivity, a possible new locus involved in genetic hypertension. *Hypertension*, **14**, 121-128.
33. Dumas, P., Sun, Y., Corbeil, G., Tremblay, S., Pausova, Z., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Hamet, P., and Tremblay, J. (2000) Mapping of quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J. Hypertens.*, **18**, 545-551.
34. Dumas, P., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Hamet, P., and Tremblay, J. (2002) Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. *J. Hypertens.*, **20**, 209-217.

35. Hamet,P., Kong,D., Pravenec,M., Kunes,J., Kren,V., Klir,P., Sun,Y.L., and Tremblay,J. (1992) Restriction fragment length polymorphism of *hsp70* gene, localized in the RT1 complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **19**, 611-614.
36. Pausova,Z., Kunes,J., Kren,V., Krenova,D., Pravenec,M., Tremblay,J., and Hamet,P. (1999) Contribution of the TNF alpha gene region of rat chromosome 20 to the body temperature response to endotoxin. *Transplant. Proc.*, **31**, 1622-1623.
37. Hamet,P., and Tremblay,J. (2002) Genetic determinants of the stress response in cardiovascular disease. *Metabolism*, **51**, 15-24.
38. Leon,L.R., Kozak,W., Rudolph,K., and Kluger,M.J. (1999) An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am.J.Physiol.*, **276**, R81-R89.
39. Pravenec,M., Sun,Y.L., Kunes,J., Kong,D., Kren,V., Klir,P., Tremblay,J., and Hamet,P. (1991) Environmental susceptibility in hypertension: potential role of *HSP70* and *TNF $\alpha$*  genes. *J. Vasc. Med. Biol.*, **3**, 297-302.
40. Ezzati,M., Lopez,A.D., Rodgers,A., Vander,H.S., and Murray,C.J. (2002) Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*, **360**, 1347-1360.
41. Singer,J.B., Hill,A.E., Nadeau,J.H., and Lander,E.S. (2005) Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice. *Genetics*, **169**, 855-862.
42. Flint,J., Corley,R., DeFries,J.C., Fulker,D.W., Gray,J.A., Miller,S., and Collins,A.C. (1995) A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science*, **269**, 1432-1435.
43. Patel,N.V., and Hitzemann,R.J. (1999) Detection and mapping of quantitative trait loci for haloperidol-induced catalepsy in a C57BL/6J x DBA/2J F2 intercross. *Behav.Genet.*, **29**, 303-310.
44. Turri,M.G., Talbot,C.J., Radcliffe,R.A., Wehner,J.M., and Flint,J. (1999) High-resolution mapping of quantitative trait loci for emotionality in selected strains of mice. *Mamm.Genome*, **10**, 1098-1101.
45. Turri,M.G., Henderson,N.D., DeFries,J.C., and Flint,J. (2001) Quantitative trait locus mapping in laboratory mice derived from a replicated selection experiment for open-field activity. *Genetics*, **158**, 1217-1226.
46. Risinger,F.O., Quick,E., and Belknap,J.K. (2000) Quantitative trait loci for acute behavioral sensitivity to paraoxon. *Neurotoxicol.Teratol.*, **22**, 667-674.



47. Mayeda,A.R., Hofstetter,J.R., Belknap,J.K., and Nurnberger,J.I., Jr. (1996) Hypothetical quantitative trait loci (QTL) for circadian period of locomotor activity in CXB recombinant inbred strains of mice. *Behav.Genet.*, **26**, 505-511.
48. Sugiyama,F., Churchill,G.A., Higgins,D.C., Johns,C., Makaritsis,K.P., Gavras,H., and Paigen,B. (2001) Concordance of murine quantitative trait loci for salt-induced hypertension with rat and human loci. *Genomics*, **71**, 70-77.
49. DiPetrillo,K., Tsaih,S.W., Sheehan,S., Johns,C., Kelmenson,P., Gavras,H., Churchill,G.A., and Paigen,B. (2004) Genetic analysis of blood pressure in C3H/HeJ and SWR/J mice. *Physiol.Genomics*, **17**, 215-220.
50. Phelan,S.A., Beier,D.R., Higgins,D.C., and Paigen,B. (2002) Confirmation and high resolution mapping of an atherosclerosis susceptibility gene in mice on Chromosome 1. *Mamm.Genome*, **13**, 548-553.
51. Wang,X., Phelan,S.A., Forsman-Semb,K., Taylor,E.F., Petros,C., Brown,A., Lerner,C.P., and Paigen,B. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J. Biol.Chem.*, **278**, 25179-25190.
52. Gross,V., and Luft,F.C. (2003) Exercising restraint in measuring blood pressure in conscious mice. *Hypertension*, **41**, 879-881.
53. Hamet,P., Merlo,E., Seda,O., Broeckel,U., Tremblay,J., Kaldunski,M., Gaudet,D., Bouchard,G., Deslauriers,B., Gagnon,F. et al. (2005) Quantitative founder-effect analysis of French Canadian families identifies specific loci contributing to metabolic phenotypes of hypertension. *Am.J.Hum.Genet.*, **76**, 815-832.
54. Ueno,T., Tremblay,J., Kunes,J., Zicha,J., Dobesova,Z., Pausova,Z., Deng,A.Y., Sun,Y.L., Jacob,H.J., and Hamet,P. (2004) Rat model of familial combined hyperlipidemia as a result of comparative mapping. *Physiol. Genomics*, **17**, 38-47.
55. Hubner,N., Wallace,C.A., Zimdahl,H., Petretto,E., Schulz,H., Maciver,F., Mueller,M., Hummel,O., Monti,J., Zidek,V. et al. (2005) Integrated transcriptional profiling and linkage analysis for identification of genes underlying disease. *Nat.Genet.*, **37**, 243-253.
56. Stoll,M., Kwitek-Black,A.E., Cowley,A.W., Jr., Harris,E.L., Harrap,S.B., Krieger,J.E., Printz,M.P., Provoost,A.P., Sassard,J., and Jacob,H.J. (2000) New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res.*, **10**, 473-482.
57. Matthews,D.B., Bhave,S.V., Belknap,J.K., Brittingham,C., Chesler,E.J., Hitzemann,R.J., Hoffmann,P.L., Lu,L., McWeeney,S., Miles,M.F. et al. (2005) Complex genetics of interactions of alcohol and CNS function and behavior. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, **29**, 1706-1719.

58. Ikeda,K., Onaka,T., Yamakado,M., Nakai,J., Ishikawa,T.O., Taketo,M.M., and Kawakami,K. (2003) Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice. *J. Neurosci.*, **23**, 4667-4676.
59. Moseley,A.E., Williams,M.T., Schaefer,T.L., Bohanan,C.S., Neumann,J.C., Behbehani,M.M., Vorhees,C.V., and Lingrel,J.B. (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J.Neurosci.*, **27**, 616-626.
60. Schimanski,L.A., and Nguyen,P.V. (2005) Mouse models of impaired fear memory exhibit deficits in amygdalar LTP. *Hippocampus*, **15**, 502-517.
61. Blaustein,M.P., Zhang,J., Chen,L., and Hamilton,B.P. (2006) How does salt retention raise blood pressure? *Am. J. Physiol. Regul.Integr.Comp. Physiol.*, **290**, R514-R523.
62. Zhang,J., Lee,M.Y., Cavalli,M., Chen,L., Berra-Romani,R., Balke,C.W., Bianchi,G., Ferrari,P., Hamlyn,J.M., Iwamoto,T. et al. (2005) Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J.Physiol.*, **569**, 243-256.
63. Akimova,O., Tremblay,J., Hamet,P., and Orlov,S.N. (2006) The Na(+)/K(+)-ATPase as [K(+)](o) sensor: Role in cardiovascular disease pathogenesis and augmented production of endogenous cardiotonic steroids. *Pathophysiology*, **13**, 209-216.
64. De Fusco,M., Marconi,R., Silvestri,L., Atorino,L., Rampoldi,L., Morgante,L., Ballabio,A., Aridon,P., and Casari,G. (2003) Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat.Genet.*, **33**, 192-196.
65. Ochrietor,J.D., Harrison,K.A., Zahedi,K., and Mortensen,R.F. (2000) Role of STAT3 and C/EBP in cytokine-dependent expression of the mouse serum amyloid P-component (SAP) and C-reactive protein (CRP) genes. *Cytokine*, **12**, 888-899.
66. Vongpatanasin,W., Thomas,G.D., Schwartz,R., Cassis,L.A., Osborne-Lawrence,S., Hahner,L., Gibson,L.L., Black,S., Samols,D., and Shaul,P.W. (2007) C-reactive protein causes downregulation of vascular angiotensin subtype 2 receptors and systolic hypertension in mice. *Circulation*, **115**, 1020-1028.
67. Grad,E., Golomb,M., Mor-Yosef,I., Koroukhov,N., Lotan,C., Edelman,E.R., and Danenberg,H.D. (2007) Transgenic expression of human C-reactive protein suppresses endothelial nitric oxide synthase expression and bioactivity following vascular injury. *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.*, **293**, 489-495.
68. Chandola,T., Brunner,E., and Marmot,M. (2006) Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study. *BMJ*, **332**, 521-525.

69. Epel,E.S., Lin,J., Wilhelm,F.H., Wolkowitz,O.M., Cawthon,R., Adler,N.E., Dolbier,C., Mendes,W.B., and Blackburn,E.H. (2006) Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology*, **31**, 277-287.
70. Yalcin,B., Willis-Owen,S.A., Fullerton,J., Meesaq,A., Deacon,R.M., Rawlins,J.N., Copley,R.R., Morris,A.P., Flint,J., and Mott,R. (2004) Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat.Genet.*, **36**, 1197-1202.
71. Yalcin,B., Flint,J., and Mott,R. (2005) Using progenitor strain information to identify quantitative trait nucleotides in outbred mice. *Genetics*, **171**, 673-681.
72. Heximer,S.P., Knutsen,R.H., Sun,X., Kaltenbronn,K.M., Rhee,M.H., Peng,N., Oliveirados-Santos,A., Penninger,J.M., Muslin,A.J., Steinberg,T.H. et al. (2003) Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in *RGS2*-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, **111**, 445-452.
73. Lee,P.D., Ge,B., Greenwood,C.M., Sinnett,D., Fortin,Y., Brunet,S., Fortin,A., Takane,M., Skamene,E., Pastinen,T. et al. (2006) Mapping cis-acting regulatory variation in recombinant congenic strains. *Physiol. Genomics*, **25**, 294-302.
74. Miner,L.L., and Marley,R.J. (1995) Chromosomal mapping of the psychomotor stimulant effects of cocaine in BXD recombinant inbred mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, **122**, 209-214.
75. Ramos,A., Moisan,M.P., Chaouloff,F., Mormede,C., and Mormede,P. (1999) Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. *Mol.Psychiatry*, **4**, 453-462.
76. Fernandez-Teruel,A., Escorihuela,R.M., Gray,J.A., Aguilar,R., Gil,L., Gimenez-Llort,L., Tobena,A., Bhomra,A., Nicod,A., Mott,R. et al. (2002) A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res.*, **12**, 618-626.
77. Conti,L.H., Jirout,M., Breen,L., Vanella,J.J., Schork,N.J., and Printz,M.P. (2004) Identification of quantitative trait loci for anxiety and locomotion phenotypes in rat recombinant inbred strains. *Behav.Genet.*, **34**, 93-103.
78. Jaworski,R.L., Jirout,M., Closson,S., Breen,L., Flodman,P.L., Spence,M.A., Kren,V., Krenova,D., Pravenec,M., and Printz,M.P. (2002) Heart rate and blood pressure quantitative trait loci for the airpuff startle reaction. *Hypertension*, **39**, 348-352.
79. Kren,V., Pravenec,M., Lu,S., Krenova,D., Wang,J.M., Wang,M., Merriouns,T., Wong,A., St Lezin,E., Lau,D. et al. (1997) Genetic isolation of a region of chromosome

- 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J. Clin. Invest.*, **99**, 577-581.
80. Garrett, M.R., Saad, Y., Dene, H., and Rapp, J.P. (2000) Blood pressure QTL that differentiate dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Genomics*, **3**, 33-38.
81. Seda, O. (2004) Comparative gene map of hypertriglyceridaemia. *Folia Biol. (Praha)*, **50**, 43-57.
82. Borglum, A.D., Kirov, G., Craddock, N., Mors, O., Muir, W., Murray, V., McKee, I., Collier, D.A., Ewald, H., Owen, M.J. et al. (2003) Possible parent-of-origin effect of Dopa decarboxylase in susceptibility to bipolar affective disorder. *Am. J. Med. Genet.*, **117B**, 18-22.
83. Tivesten, A., Bollano, E., Andersson, I., Fitzgerald, S., Caidahl, K., Sjogren, K., Skott, O., Liu, J.L., Mobini, R., Isaksson, O.G. et al. (2002) Liver-derived insulin-like growth factor-I is involved in the regulation of blood pressure in mice. *Endocrinology*, **143**, 4235-4242.
84. Anunciado, R.V., Ohno, T., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Nishimura, M., and Namikawa, T. (2000) Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis. *Exp. Anim.*, **49**, 217-224.
85. Kamprath, K., Marsicano, G., Tang, J., Monory, K., Bisogno, T., Di, M., V, Lutz, B., and Wotjak, C.T. (2006) Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J. Neurosci.*, **26**, 6677-6686.
86. Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L. et al. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.*, **115**, 1298-1305.
87. Batkai, S., Pacher, P., Osei-Hyiaman, D., Radaeva, S., Liu, J., Harvey-White, J., Offertaler, L., Mackie, K., Rudd, M.A., Bukoski, R.D. et al. (2004) Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*, **110**, 1996-2002.
88. Pietri, M., Schneider, B., Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Mutel, V., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2005) Reactive oxygen species-dependent TNF-alpha converting enzyme activation through stimulation of 5-HT2B and alpha1D autoreceptors in neuronal cells. *FASEB J.*, **19**, 1078-1087.
89. Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tambllyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., et al. (2003) Essential role for

- caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.*, **17**, 883-895.
90. Chrousos,G.P. (2000) The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int. J. Obes.*, **24**, S50-S55.
  91. Smoller,J.W., Acierno,J.S., Jr., Rosenbaum,J.F., Biederman,J., Pollack,M.H., Meminger,S., Pava,J.A., Chadwick,L.H., White,C., Bulzacchelli,M., et al. (2001) Targeted genome screen of panic disorder and anxiety disorder proneness using homology to murine QTL regions. *Am. J. Med. Genet.*, **105**, 195-206.
  92. Klimes,I., Weston,K., Gasperikova,D., Kovacs,P., Kvetnansky,R., Jezova,D., Dixon,R., Thompson,J.R., Sebokova,E., and Samani,N.J. (2005) Mapping of genetic determinants of the sympathoneural response to stress. *Physiol. Genomics*, **20**, 183-187.
  93. Palijan,A., Lambert,R., Dutil,J., Sivo,Z., and Deng,A.Y. (2003) Comprehensive congenic coverage revealing multiple blood pressure quantitative trait loci on Dahl rat chromosome 10. *Hypertension*, **42**, 515-522.
  94. Obata,K., Nagata,K., Iwase,M., Odashima,M., Nagasaka,T., Izawa,H., Murohara,T., Yamada,Y., and Yokota,M. (2005) Overexpression of calmodulin induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **338**, 1299-1305.
  95. Pacak,K., and Palkovits,M. (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.*, **22**, 502-548.
  96. Daly,M.J., Rioux,J.D., Schaffner,S.F., Hudson,T.J., and Lander,E.S. (2001) High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat. Genet.*, **29**, 229-232.
  97. Marshall,K.E., Godden,E.L., Yang,F., Burgers,S., Buck,K.J., and Sikela,J.M. (2002) In silico discovery of gene-coding variants in murine quantitative trait loci using strain-specific genome sequence databases. *Genome Biol.*, **3**, Epub 2002 Nov 27.
  98. Hitzemann,R., Malmanger,B., Reed,C., Lawler,M., Hitzemann,B., Coulombe,S., Buck,K., Rademacher,B., Walter,N., Polyakov,Y. et al. (2003) A strategy for the integration of QTL, gene expression, and sequence analyses. *Mamm.Genome*, **14**, 733-747.
  99. DiPetrillo,K., Wang,X., Stylianou,I.M., and Paigen,B. (2005) Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends Genet.*, **21**, 683-692.

100. Lee,S.J., Liu,J., Qi,N., Guarnera,R.A., Lee,S.Y., and Cicila,G.T. (2003) Use of a panel of congenic strains to evaluate differentially expressed genes as candidate genes for blood pressure quantitative trait loci. *Hypertens.Res.*, **26**, 75-87.
101. Goh,K.I., Cusick,M.E., Valle,D., Childs,B., Vidal,M., and Barabasi,A.L. (2007) The human disease network. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **104**, 8685-8690.
102. Tietz,N.W., Pruden,E.L., and Siggaard-Anderson,O. (1987) In Tietz,N.W. (ed.), *Fundamentals of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 616-620.
103. Pybus,J., Feldman,F.J., and Bowers,G.N., Jr. (1970) Measurement of total calcium in serum by atomic absorption spectrophotometry, with use of a strontium internal reference. *Clin. Chem.*, **16**, 998-1007.
104. Owen,E.H., Logue,S.F., Rasmussen,D.L., and Wehner,J.M. (1997) Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience*, **80**, 1087-1099.
105. Manly,K.F., Cudmore,R.H., Jr., and Meer,J.M. (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm.Genome*, **12**, 930-932.
106. Doerge,R.W., and Churchill,G.A. (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics*, **142**, 285-294.
107. Fortin,A., Stevenson,M.M., and Gros,P. (2002) Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice. *Genes Immun.*, **3**, 177-186.
108. Flint,J. (2003) Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *J.Neurobiol.*, **54**, 46-77.
109. Rapp,J.P. (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol. Rev.*, **80**, 135-172.
110. Palmer,A.A., and Airey,D.C. (2003) Inappropriate choice of the experimental unit leads to a dramatic overestimation of the significance of quantitative trait loci for prepulse inhibition and startle response in recombinant congenic mice. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 818.
111. Xie,X., Lu,J., Kulbokas,E.J., Golub,T.R., Mootha,V., Lindblad-Toh,K., Lander,E.S., and Kellis,M. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, **434**, 338-345.
112. Wilkie,G.S., Dickson,K.S., and Gray,N.K. (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem.Sci.*, **28**, 182-188.

113. Saklatvala,J., Dean,J., and Clark,A. (2003) Control of the expression of inflammatory response genes. *Biochem.Soc.Symp.*, **70**, 95-106.
114. Svoboda,P., and Cara,A.D. (2006) Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol.Life Sci.*, **63**, 901-908.
115. Rozen,S., and Skaletsky,H. (2000) In Krawetz,S., and Misener,S. (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
116. Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.

**Table 1** Significant stress-related QTL with relevant candidate genes. Suggestive loci with LOD  $\geq 3.2$  were considered only in the albino background in which resolution was lower (14 strains). QTL regions in bold corresponded to convergent haplotype distribution between A/J and B6 sets of RCS; then, all the RCS means were used in t-test calculations. Statistics in parentheses were analyzed on individual values relative to a unique informative strain. Asterisks indicate the QTL effect of opposite direction to that predicted from the ancestor A/J and B6 difference.

Phenotypes	Locus	Background	P value (t-test)	LOD	Candidate genes and products	Human homology
Open-field						
Emotionality (defecation-activity)	<b>D1Mit113-D1Mit356</b>	<b>B6</b>	<b>2.46x10<sup>-10</sup></b>	<b>4.6</b>	<i>Emo1</i> , emotionality 1; <i>Bpq2</i> , blood pressure QTL 2; <i>Kcnj9</i> , potassium channel, subfamily J, member 9; <i>Atp1a2</i> , Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase alpha2 polypeptide	1q24.2
	D3Mit216-D3Mit199	B6 (BcA70)	(7.64x10 <sup>-5</sup> )	3.9	<i>Fabp2</i> , fatty acid binding protein 2, intestinal; <i>Pitx2</i> , paired-like homeodomain transcription factor 2	4q25-q31
	D4Mit181-D4Mit291	B6	2.57x10 <sup>-2</sup>	3.5	<i>Gem</i> , GTP-binding protein expressed in skeletal muscle	8q13-q21
	D4Mit336-D4Mit16	B6	1.63x10 <sup>-2</sup>	3.2	<i>Htr1d</i> , 5HT 1D receptor	
	D7Mit187-D7Mit71	B6	1.71x10 <sup>-2</sup>	3.5	<i>Bpq7</i> , blood pressure QTL 7; <i>Th</i> , tyrosine hydroxylase; <i>Fgfr2</i> , fibroblast growth factor receptor 2	11q14-q21 11p15.5; 10q26
Elevated plus-maze						
Enclosed arm duration	D7Mit247-D7Mit270	B6	4.12x10 <sup>-2</sup>	3.8	<i>Ccne1</i> , cyclin E1; <i>Abbp3</i> , blood pressure 3	AJ & B6 19q12
Emergence latencies (s)	<b>D1Mit156-D1Mit435</b>	<b>A/J</b>	<b>7.66x10<sup>-6</sup></b>	<b>3.4</b>	<i>Abbp1</i> , AJ & B6 blood pressure 1; <i>Bpq1</i> , blood pressure QTL 1; <i>Igfbp2</i> , insulin-like growth factor	2q33-q34



... Suite Table 1

					binding protein 2
D9Mit67- D9Mit254	B6*	4.62x10 <sup>-2</sup>	3.8	<i>Nrgn</i> , neurogranin (hippocampal 11q22.3-11q24 plasticity); <i>Grik4</i> , glutamate kainate receptor 4	
D11Mit74-D11mit135	B6*	1.24x10 <sup>-2</sup>	4.7	<i>Ddc</i> , dopa decarboxylase; <i>Nefh</i> , 7p11;22q12.2 heavy neurofilament polypeptide	
D19Mit10	B6*	2.33x10 <sup>-2</sup>		<i>Cnm2</i> , cyclin M2; <i>Pdcd11</i> , programmed cell death protein 11 10q24.2-q24.3	
Immobilization (normal diet)					
Hypothermia					
<b>D2Mit401-D2Mit280</b>	<b>A/J*</b>	<b>3.61x10<sup>-5</sup></b>	<b>4.0</b>	<i>Insm1</i> , insulinoma-associated 1 20p11.2	
<b>D15Mit175-</b>	<b>A/J</b> <b>(AcB56)*</b>	<b>4.97x10<sup>-4</sup></b>	<b>3.9</b>	<i>Ptger4</i> , prostaglandin E receptor 4; <i>Bpq6</i> , blood pressure QTL 6 5p13.1	
<b>D15Mit115</b>	A/J			<i>Bdln2</i> , body length QTL 2 8q22.3 (BAALC) 13q14,1	
D3mMit224	A/J	1.7x10 <sup>-3</sup>	3.3	<i>Hspa4l</i> , heat shock protein 4-like (FKHR) 12q22-q23	
<b>D10Mit42-D10Mit231</b>	<b>A/J</b>	<b>5.84x10<sup>-7</sup></b>	<b>3.5</b>	<i>Cirbp</i> , cold-inducible RNA-binding protein; <i>Igf1</i> , insulin-like growth factor-I	
Thermogenesis					

**Table 2** Significant diet-induced QTL after 24 hr on a high-salt diet, with relevant candidate genes

Phenotypes	Locus	Background	P value (t-test)	LOD	Candidate genes	Human homology
Urinary volume	D11Mit245	B6	1.09x10 <sup>-2</sup>	3.2	<i>Myo1c</i> , myosin 1C; <i>Nos2</i> , inducible nitric oxide synthase 2	17p13; 17q12
Ca <sup>++</sup> excretion	D1Mit113	A/J (AcB57)	(0.345)	3.4	<i>Apoa2</i> , apolipoprotein AII; upstream transcription factor 1	1q21-q23
	D1Mit362	A/J (AcB57)	(0.345)	3.5	<i>Slc30a1</i> , zinc transporter 1	1q32-q41
	D2Mit156	A/J (AcB57)	(0.345)	3.4	<i>Cacnb4</i> , calcium channel subunit beta-4 voltage-dependent	2q22-q31
	D4Mit172-D4Mit89	A/J	0.118	4.1	<i>Npr2</i> , natriuretic receptor B	8q21.3-22.1
	D8Mit124	A/J	0.512	3.8	<i>Irs2</i> , insulin receptor substrate 2	13q34
	D11Mit242	A/J (AcB57)	(0.345)	3.4	<i>Gria1</i> , AMPA glutamate receptor 1; <i>Myh3</i> , myosin heavy chain 3	5q31.1
	D12Mit231-D12Mit101	A/J	0.156	4.6	<i>Tshr</i> , thyroid stimulating hormone receptor; <i>Calm1</i> , calmodulin 1	14q32.33
	D13Mit77-D13Mit78	A/J	2.11x10 <sup>-2</sup>	4.1	<i>Fgf10</i> , fibroblast growth factor 10	5p13-p12
	D17Mit142-D17Mit129	A/J (AcB57)	(0.345)	3.4	<i>Slc8a1</i> , sodium/calcium exchanger 1; <i>Eif2ak2</i> , eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	2p23-p21
Creatinine excretion	D15Mit170-D15Mit171	B6	1.29x10 <sup>-2</sup>	3.3	<i>Slc38a1,2,4</i> solute carrier family 38, members 1, 2, 4	12q12-13
Immobilization						
Hypothermia	D1Mit65	B6 (BcA66)	(8.7x10 <sup>-3</sup> )	3.5	<i>Oprk1</i> , kappa1 opiate receptor	8q12.3
	D4Mit2-D4Mit361	B6	1.58x10 <sup>-2</sup>	3.8	<i>Triglq1</i> , triglyceride QTL 1; brain cannabinoid receptor 1;	6q16

... Suite Table 2

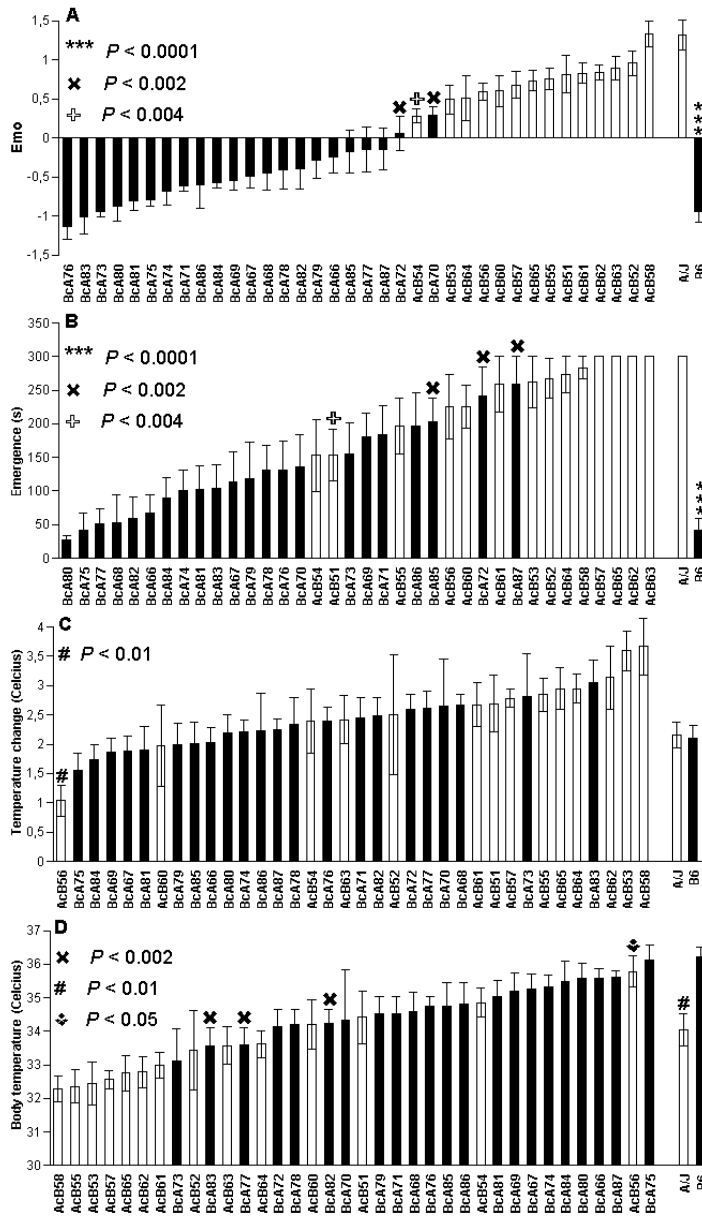
				<i>Casp8ap2</i> , caspase 8 associated protein 2	
D4Mit148-D4Mit54	B6	2.5x10 <sup>-3</sup>	3.6	<i>Htr1d</i> , 5HT 1D receptor	1p36.3-p34.3
D15Mit42-D15Mit14	B6	1.06x10 <sup>-2</sup>	3.7	<i>Itga5</i> , integrin alpha 5; <i>Cacnb3</i> , L-type calcium channel subunit beta 3	12q11-q13
D18Mit17	B6	1.43x10 <sup>-2</sup>	3.4	<i>Nr3c1</i> , glucocorticoid receptor	5q31

**Table 3.** Candidate genes within the 171-174 Mbp region of Chr 1. Summary of the genes having SNP in the promoter region within functional motifs detected by TRANSFAC, in the 3'UTR region that change mRNA secondary structure, or in the coding region with amino acid modification in a functional domain of the protein. Secondary structure analysis in the 3'UTR was done only for genes of interest.

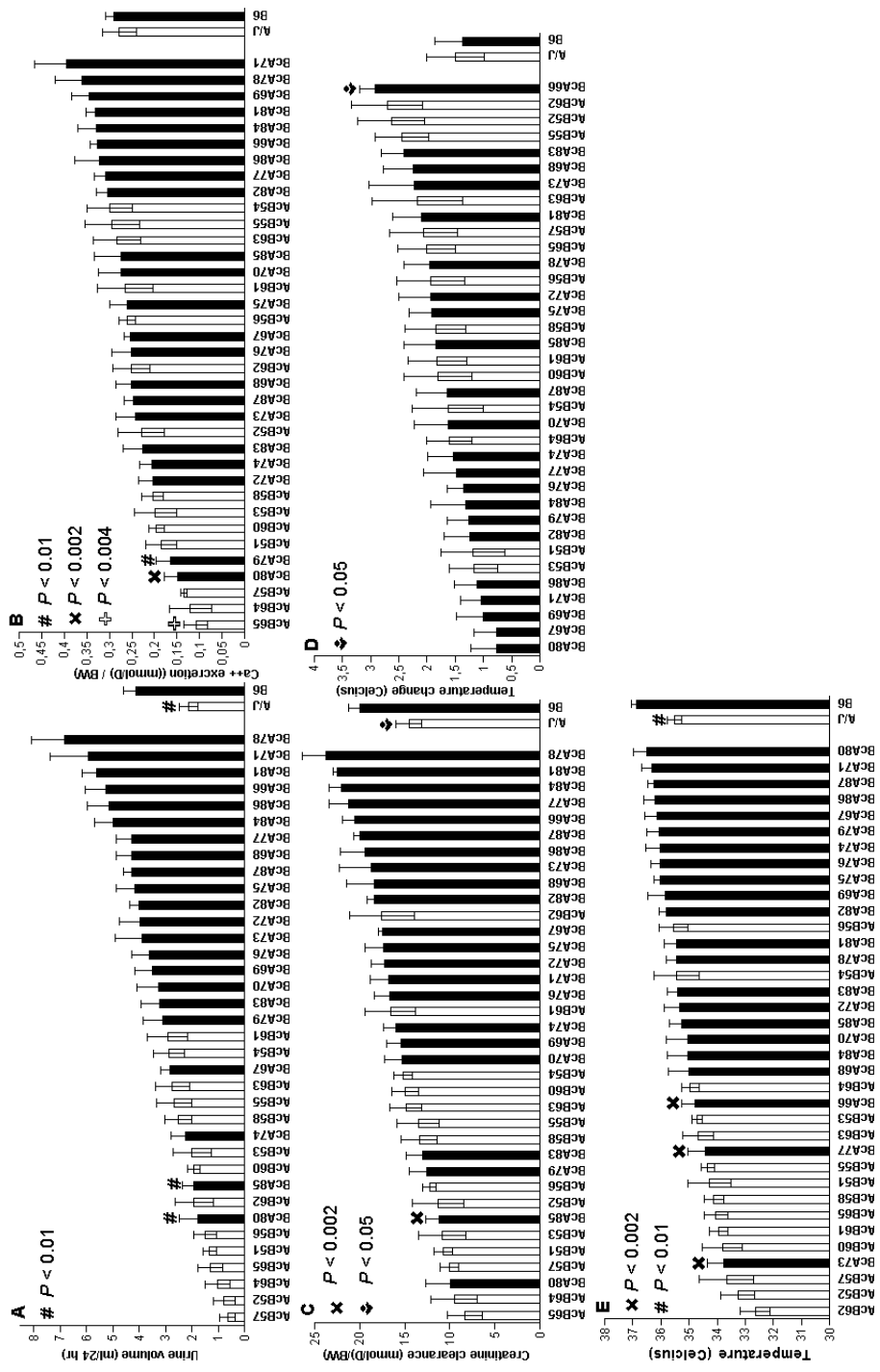
<b>Genes</b>	<b>2 kb promoter region, motifs (similarity score %)</b>	<b>3'UTR secondary structure modification</b>	<b>Coding region (amino acid description and functional domain position)</b>	<b>Details (Gene ID in NCBI; Pubmed ID)</b>
<b>Atp1a2 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase alpha2)</b>	<b>rs32414724 -Sp1 (85)</b> in AJ	<b>rs31561579 -GATA-1 (91), MZF1 (90)</b> in AJ; <b>rs30544949</b> - stem/loop within <b>AAUAAA</b> motif; structure changes within the coding domain pfam00702		GeneID 98660; PMID 12805306 (amygdala degeneration); PMID 15458945 (ouabain-induced hypertension)
<b>Nhlh1 (nescient helix loop helix)</b>	<b>rs31191032 -CdxA (85)</b> in B6; <b>cap (87)</b> in AJ; <b>rs31994294 (5'UTR) deltaEF1 (86)</b> in B6 only	<b>AJ rs32512926 -Sp1 (91); rs32005043 -c-Rel (90), NF-kappaB p65 (90)</b> stem (loop n=7 in B6)- changes interfere in coding region. 19 nucleotides loop - <b>GATA-2 (98)</b>		GeneID 18071; PMID 12077327 (arrhythmia, autonomic dysfunction in knock out animals)

... Suite Table 3

<b>Slamf1 (signaling lymphocyte activation molecule)</b>	<b>rs30704710 -AP-4 (89)</b> in B6; <b>MZF1 (86)</b> in AJ	<b>rs31529853 - B6 only</b> <b>GATA-2 (91); 4</b> nucleotides loop with an 8-mer motif.	GeneID 27218; PMID 11477403 (Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP)
<b>Crp (C-reactive protein)</b>	<b>rs32226283 -SRY (86)</b> in B6, <b>Lyf-1 (85)</b> in AJ	<b>A/J 36</b> nucl. loop <b>Pbx-1 (100); GATA-1 (93); GATA-2 (91)</b> <b>rs31557028 -TCF11/KCR-F1/Nrf1 homodimers (96), Octamer factor 1 (91)</b> in B6 mutant only. Interference with the coding region secondary structure within the pentraxin domain (20-220)	GeneID 12944; PMID 7916620 (liver-specific expression) Ala134Pro; Asn191Ser cd00152: Pentraxin domain (20-220)
<b>Fcgr3 (IgG Fc receptor low affinity III)</b>	<b>rs31781215 - v-Myb (89)</b> in A/J <b>rs8242844 - GATA-1 (90)</b> in B6		GeneID 14131; PMID 17053192 (regulate chemokine expression and leukocyte invasion of the vessel wall in atherosclerosis) Gly73Trp; Arg74Ser; Ala82Ser Signal peptide coding sequence (64-153)



**Fig. 1.** Strain distribution pattern of progenitors and all 36 RCS, ordered by their means (with SEM) for emotional reactivity in the OF (A); emergence latencies in the EPM (B); initial hypothermia under immobilization (C); the thermogenic response to immobilization (D).



**Fig. 2.** SDP of progenitors and all 36 RCS, ordered by their means (SEM) for urinary volume (A); Ca<sup>++</sup> excretion (B); creatinine

excretion (C); the initial hypothermic response to immobilization on a high-salt diet (D); and thermogenic response to immobilization on a high-salt diet (E).

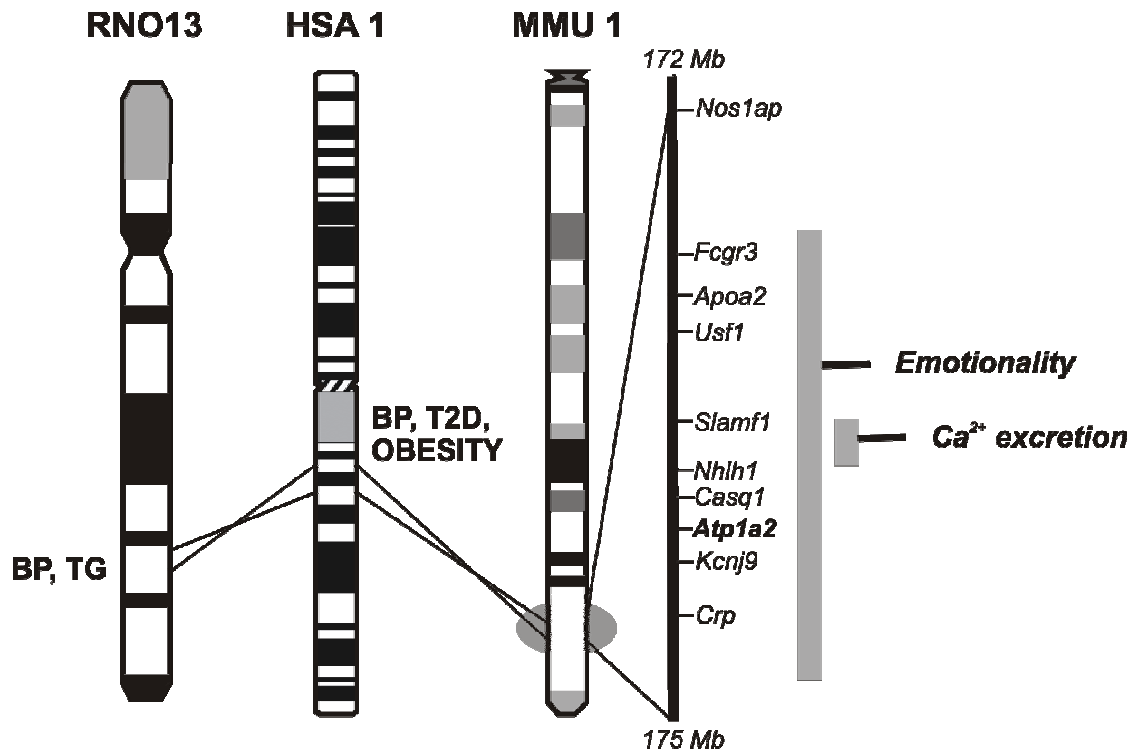


Fig. 3. Comparative genomic view of the mouse chromosome 1 (MMU 1) region bearing 4 QTL identified in this study (black bars on the right). Selected genes and QTL found in this region and syntenic regions of human Chr 1 (HSA 1) and rat Chr 13 (RNO 13) are shown. BP: blood pressure, TG: triacylglycerol, T2D: type 2 diabetes. Gene and mice QTL names are used according to NCBI's Entrez Gene Database and Mouse Genome Informatics.



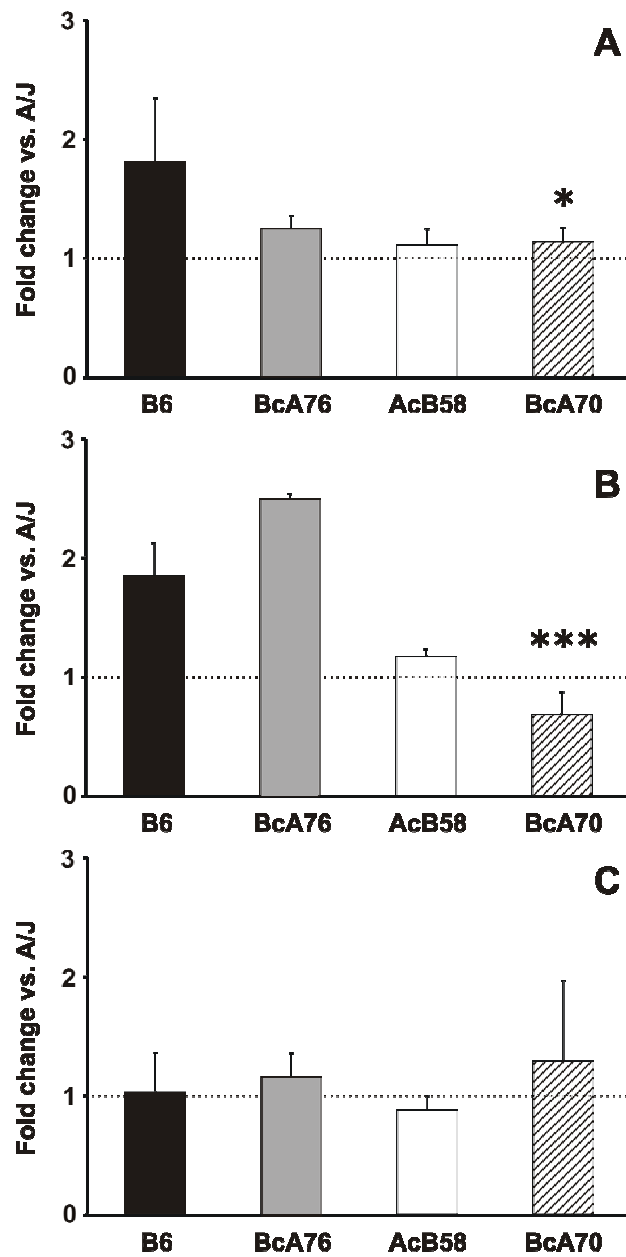
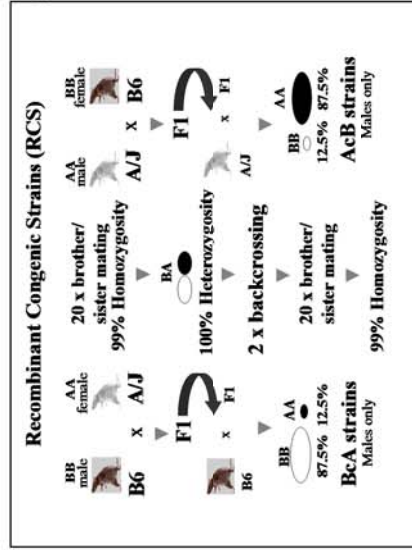


Fig. 4. *Atp1a2* gene expression profiling in the brain (Panel A), heart (Panel B) and kidney (Panel C) by RT-PCR. Mean mRNA levels of the A/J parental strain (n=4) were chosen as controls. Expression levels were normalized by reference to 18S rRNA. The level of statistical significance is shown for post-hoc comparison vs. the B6 progenitor strain as follows: one asterisk for  $P < 0.05$ ; three asterisks for  $P < 0.001$ .

Phenotype selection based on polarity between A/J and B6; RCS production, extensive phenotyping and fine mapping.

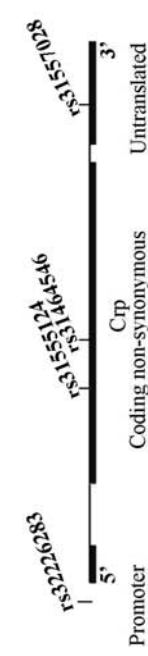


QTL analysis; validation with parametric t-tests; interval definition by haplotype analysis.

Marker	Pos (cM)	Map	Manager	t test P value
D1Mit113	93.3	BBB	BBB	2.46x10 <sup>-10</sup>
D1Mit206	95.80	BBB	BBB	7.84x10 <sup>-6</sup>
D1Mit356	95.80	BBB	BBB	6.86x10 <sup>-6</sup>

Candidate gene appraisal from physiological evidence and interspecies comparative maps (Fig. 3)

A/J and B6 sequence comparisons; analysis of putative functional SNPs in private and public databases.



Secondary structure of C-reactive protein mRNA

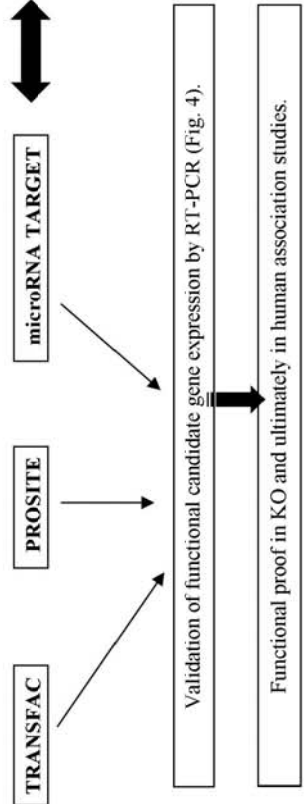
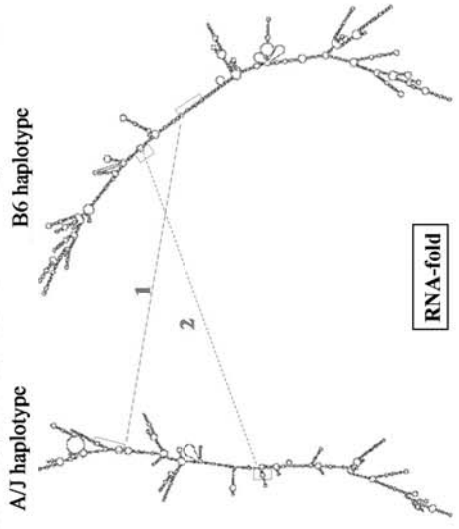


Fig. 5. Integrative scheme of our step-wise approach aimed at narrowing down QTL to QTG. The haplotype box shows the donor alleles inherited from A/J named with an A, and with a B for B6 at the Chr 1 QTL interval for OF Emo. Strains were sorted according to their mean scores. Statistical significance of the QTL was confirmed by t tests on all 36 strains. *Crp* gene was chosen as a clear example in which each SNP presented has a functional impact either on binding motifs and/or the mRNA secondary structure within a motif (1) or in the coding region (2) (more details are presented in Supplementary Figure 1).

## 5.9. Abbreviations

BP, blood pressure; CV, cardiovascular; Emo, emotionality; EPM, elevated plus-maze; H<sup>2</sup>, broad-sense heritability; KO, knock out; LOD, logarithm of odds; LPS, lipopolysaccharide; OF, open field; PCR, polymerase chain reaction; QTG, quantitative trait genes; QTL, quantitative trait loci; RCS, recombinant congenic strains; RI, recombinant inbred; SDP, strain distribution pattern; SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region.

## **Chapitre 6. Discussion**

### **6.1.1. Retour sur chacune des publications : du vieillissement à la génomique**

Les objectifs de cette thèse sont, premièrement dans le cas des trois premiers articles, d'évaluer l'effet du vieillissement sur les fonctions psychomotrices des souches de souris sélectionnées génétiquement en fonction de leur tension artérielle élevée (HBP), basse (LBP) et normale (NBP); deuxièmement, pour les articles suivants, d'identifier les déterminants génétiques des phénotypes psychophysiologiques à partir des RCS.

Le premier article décrit l'évaluation des fonctions psychomotrices des souches HBP, LBP et NBP sur deux cohortes âgées respectivement de 12 mois et de trois mois. Indépendamment de l'âge, les HBPs sont hyperactives dans l'open-field, mais pas dans le test d'exploration de trous. Inversement, les LBP explorent moins d'espaces que les NBP et, à trois mois seulement, sont hypoactives dans l'open-field. Par ailleurs, les HBPs et les LBP présentent des déficits précoces de coordination motrice et des fonctions visuo-motrices.

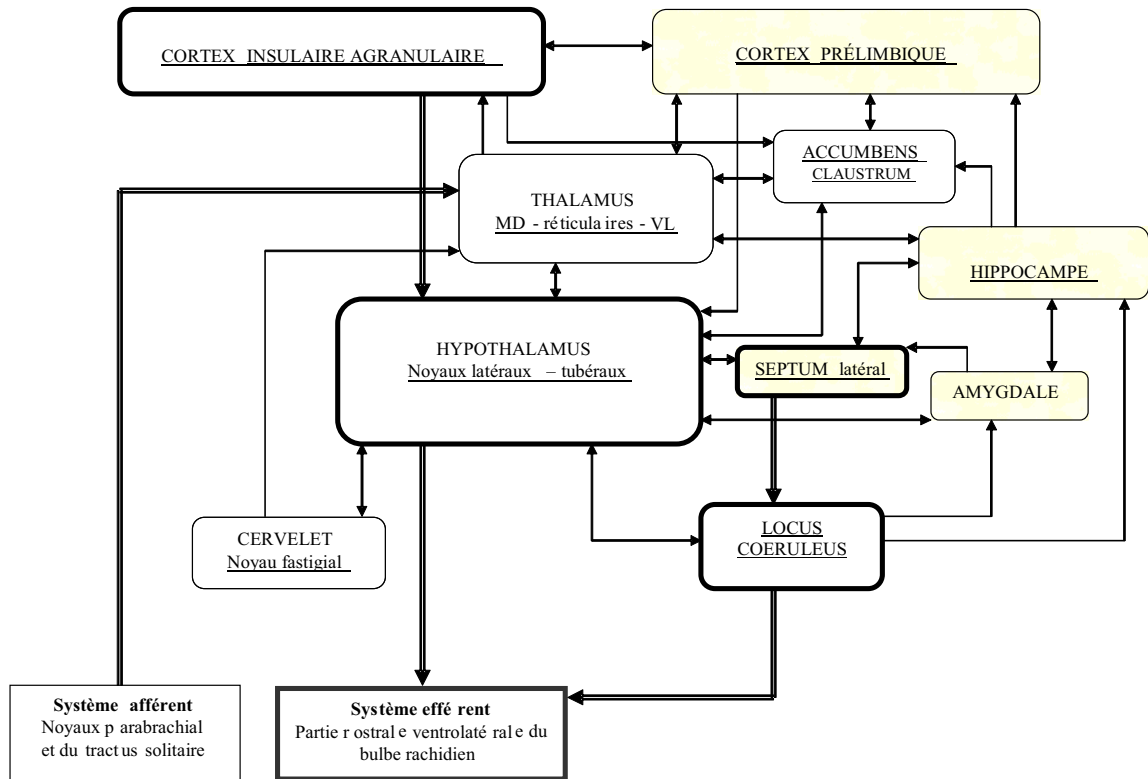
Le second article concerne l'évaluation longitudinale de la coordination motrice, de l'anxiété et de l'apprentissage spatial des souches HBP, LBP et NBP, à l'âge de deux mois et de 12 mois. Le vieillissement accentue l'hyperactivité des HBPs dans l'open-field. Par contre, l'hypoactivité des souris LBP est détectable seulement à l'âge de deux mois. Indépendamment de l'âge, les souris HBP et LBP montrent une perception réduite du danger dans l'épreuve d'anxiété et des dysfonctions visuo-motrices au labyrinthe aquatique. Enfin, des déficits précoces de coordination motrice se manifestent seulement chez les HBPs. Il reste à déterminer si les déficits observés sont liés à des déterminants génétiques indépendants ou secondaires aux altérations de la tension artérielle.

Face à l'absence de déficit cognitif franc chez les SHM dans les deux premiers articles; la question de l'âge choisi, soit 12 mois, pour mesurer l'effet du vieillissement

chez la souris pourrait être remise en cause. Cependant, d'autres groupes se sont penchés sur la question pour démontrer que des déficits de performance peuvent être détectés à partir de cet âge chez des souris normales (Gower & Lamberty, 1993; Lamberty & Gower, 1990). Notre choix est d'autant justifié qu'une longévité moindre est une caractéristique des SHM (Schlager, 1981). Cette courte durée de vie des SHM nous a préoccupés dans la discussion de notre première étude sur la sénescence, de type transversal avec deux groupes d'âge. En effet, il est possible que seuls les « moins affectés » soient représentés dans le groupe plus âgé. C'est donc ce qui a motivé l'entreprise de la deuxième étude de type longitudinale.

Or les résultats de la seconde étude ont confirmé des différences **précoces** et marquées entre les souches, particulièrement dans les labyrinthes anxiogéniques ou aquatique, et le cintre. Ces phénotypes seront soumis à l'analyse génétique pour en localiser les déterminants. Plus particulièrement, sachant qu'une susceptibilité accrue au stress co-ségrégue avec l'hypertension chez l'homme et le rat (Hamet et al., 2002b), l'étude de ce phénotype à partir des outils disponibles chez la souris sera notre objectif principal pour la suite.

L'association entre l'hypertension et nos phénotypes comportementaux pourrait résulter de l'interrelation entre les structures cérébrales responsables de l'intégration émotionnelle et de la régulation de la tension artérielle (Strazielle et al., 2004). Le résumé de cet article de collaboration est présenté en appendice. Les résultats du marquage de la cytochrome oxydase présenté dans la Figure 2 montre que les régions affectées d'un hyper-métabolisme chez les SHM, expliquent en partie la concomitance de nos phénotypes au niveau neuronal et définissent des régions cérébrales candidates pour l'expression différentielle des gènes. Les régions atteintes sont surtout impliquées dans le contrôle cérébral du système nerveux autonome, y compris l'insula et les noyaux hypothalamiques. De plus, l'activité de la cytochrome oxydase est élevée dans les régions limbiques impliqués dans l'activation cérébrale et les réactions émotionnelles, particulièrement le nucleus accumbens et les noyaux thalamiques réticulés. L'activité enzymatique est



**Figure 2. Diagramme illustrant les connexions entre les structures cérébrales impliquées dans le contrôle du système nerveux autonome (Tiré de (Strazielle et al., 2004)).** Les principales voies afférentes et efférentes y sont représentées par des boîtes carrées. Les structures (boîtes arrondies) comportant des différences (SHM versus contrôles) dans le degré d'activité de la CO sont *soulignées*. Les *boîtes noires* décrivent les structures du système limbique. Deux circuits presseurs sont désignés par des *cadres plus épais*: (1) cortex insulaire ⇒ hypothalamus ⇒ partie rostrale ventrolatérale du bulbe; (2) septum latéral ⇒ locus coeruleus (via habénula) ⇒ partie rostrale ventrolatérale du bulbe.

également élevée dans le locus coeruleus (région ferrugineuse), site des corps cellulaires noradrénergiques et région associée avec les réactions émotionnelles et l'attention sélective.

L'article 3 vise à sélectionner les phénotypes dont la polarité est la plus grande entre A/J et B6, et ensuite les retenir pour l'analyse génétique (Gershenfeld et al., 1998), en reprenant les mêmes épreuves comportementales d'anxiété et d'apprentissage spatial nous ont permis de caractériser les déficits des SHM dans notre deuxième article. Cette étape n'est pas obligatoire, car les RI ou les RC permettent de cartographier des traits qui ne diffèrent pas entre les progéniteurs (Rapp, 2000). Ceci est particulièrement vrai dans le cas de phénotypes polygéniques qui résultent de la combinaison des effets positif ou négatif (pas toujours de façon additive) de plusieurs allèles. Toutefois, la sélection de phénotypes divergents nous assure d'une héritabilité élevée. Cette garantie ne sera pas exigée pour le stress d'immobilisation, qui ayant été localisé chez le rat (Dumas et al., 2000a), sera répété dans les RCS.

Le quatrième et dernier manuscrit constitue la contribution la plus importante de cette thèse, partant du modèle des RCS dont l'avantage majeur réside dans les rétrocroisements sur les progéniteurs qui permettent de raffiner les localisations par le découpage des recombinaisons additionnelles.

Les loci les plus significatifs sont situés dans les régions de l'émotionnalité dans l'open-field (*Emo1*) sur le Chr. 1 (LOD=4.6); de la dopa décarboxylase sur le Chr. 11 pour l'émergence du *plus-maze* (LOD=4.7); de la protéine liant l'endotoxine (LBP) sur le Chr. 2 pour l'hypothermie initiale en réponse à l'immobilisation (LOD=4); et de *Hsp90* sur le Chr. 12 pour l'excrétion de Ca<sup>++</sup> sous diète salée (LOD=4.6).

De l'ensemble de ces résultats, il ressort une forte convergence vers des régions impliquées dans les pathologies cardiovasculaires (Tableau III), comme nous l'avions suggéré dans notre revue de la littérature (tableau 1). Ceci confirme aussi la présence de facteurs de susceptibilité à l'hypertension chez B6

**Tableau III. Exemples de QTL de stress dans les RCS convergents vers des *loci* associés à l'hypertension**

Phénotypes	Locus (position)	LOD	Traits/gènes	Références
<b><i>Open-field</i></b> Réactivité ou <i>Emo</i>	Chr. 1 (93.3-95.8 cM)	4.6	<i>Emo1</i> (95 cM); <i>ath1</i> (90.1 cM)	(Phelan, Beier, Higgins, & Paigen, 2002; Hamet et al., 2005)
	Chr. 3 (33.7 cM)	3.6	<i>Ptx3</i> (33.8 cM)	(Hamet et al., 2005; Pausova et al., 1999c)
<b><i>Labyrinthe en croix</i></b>				
Latence	Chr. 1 (32.8-36.9 cM)	3.4	<i>Abbp1</i> (35 cM); <i>bpq1</i> (49.7 cM); <i>IGFbp2</i> (36.1 cM)	(Woo & Kurtz, 2003)
d'émergence (s)				
/Hypothermie	Chr. 2 (79.7-81.7 cM)	4.0	<i>Lbp</i> (83.0 cM)	(Pausova et al., 1999c)
<b>Immobilisation</b>	Chr. 15 (9.9-24 cM)	3.9	<i>Bpq6</i> , <i>npr3</i> (20 cM)	(Sugiyama et al., 2001)
/Thermogénèse	Chr. 10 (44-52 cM)	3.5	<i>Cirbp</i> (44 cM); <i>igf1</i> (48 cM)	(Tivesten et al., 2002)
<b>Diète riche en sel (premier 24 hres)</b>	Chr. 1 (93.3 cM)	3.4	<i>Apoa2</i> (92.6 cM)	(Wang, Korstanje, Higgins, & Paigen, 2004)
Excrétion de $Ca^{++}$	Chr. 4 (8.6-19.8 cM)	4.1	<i>Calb1</i> (10.5 cM); <i>bpq3</i> , <i>npr2</i> (21.5 cM)	(Sugiyama et al., 2001)
	Chr. 11 (31 cM)	3.4	<i>Gria1</i> (31 cM); <i>myh3</i> (35 cM)	(Dumas et al., 2000a)
	Chr. 12 (48-50 cM)	4.6	<i>Hspca</i> (48 cM)	(Dumas et al., 2000b)
	Chr. 17 (47.4-55.7 cM)	3.4	<i>Slc8a1</i> (48 cM)	(Unlap, Peti-Peterdi, & Bell, 2000)



### Tableau III. Suite ... Légende

---

*Abbp*: A/J versus B6 blood pressure; *apoa2* apolipoprotein AII; *ath*: atherosclerosis susceptibility; *bpq*: blood pressure QTL; *calb1*: calbindin-28K; *cirbp*: cold inducible RNA-binding protein; *emo1*: emotionality locus 1; *grial*: AMPA glutamate receptor 1; *hspca*: heat-shock protein 1 alpha; *IGFbp*: insulin-like growth factor binding protein; *lbp*: lipopolysaccharide (LPS)-binding protein; *myh3*: myosin heavy chain 3; *npr2*: natriuretic receptor B; *npr3*: natriuretic receptor 3; *OF*: open-field; *ptx3*: pentraxin inducible by tumor-necrosis-factor/interleukin 1; *slc8a1*: sodium/calcium exchanger 1.

(Woo et al., 2003; Sugiyama et al., 2001). Nous avons d'abord cherché les SNPs (A/J vs. B6) dans la banque de Celera se rapportant à *Hsp90*. Cependant, les résultats ainsi obtenus (SNP dans l'UTR3') ne coïncident plus avec la séquence mise à jour dans NCBI, pour laquelle cinq SNPs sont rapportés dans la région codante, avec la mise en garde à l'effet que leur localisation demeure ambiguë. Badyaev (Badyaev, 2005) cite l'exemple de *Hsp90*, dont le rôle d'accumulateur de variations se révèle quand l'inactivation chez l'adulte donne lieu à de très diverses manifestations parfois maintenues par la sélection (Rutherford & Lindquist, 1998). Le métabolisme du calcium est impliqué dans la pathogenèse de l'hypertension ainsi que plusieurs formes de cardiomyopathies (Sanoudou, Vafiadaki, Arvanitis, Kranias, & Kontrogianni-Konstantopoulos, 2005; Ding et al., 2004); ce qui nous amène à prioriser le QTL d'excrétion de calcium sur le chr. 1 (LOD = 3.4), qui coïncide exactement avec la localisation de la réactivité émotionnelle.

Par ailleurs, il est remarquable que les gènes compris dans nos QTL (article 5, Tableau I) appartiennent très majoritairement aux différents systèmes physiologiques soupçonnés d'être impliqués dans l'hypertension induite par le stress (Imumorin et al., 2005) : *tyrosine hydroxylase*; *dopa décarboxylase*; *récepteurs adrénergiques  $\beta 1$  et  $\beta 2$* ; *récepteur D2 à la dopamine* (système nerveux sympathique); *rénine* (SRA); *adducine 3*; *récepteur natriurétique B* (fonction rénale); *synthase 2 de l'oxyde nitreux* (fonction endothéliale); *récepteur de la thyroïdostimuline*; *11 $\beta$ -hydroxylase*; *récepteur au glucocorticoïdes* (axe hypothalamo-hypophyso surrénalien ou HHS). Par contre, les analyses in silico révèlent que les SNPs fonctionnels concernent d'avantage des éléments de régulation (ou de signalisation) à proximité (cis) ou à distance (trans) des gènes mentionnés. Parmi ceux-ci, mentionnons seulement les éléments pour lesquels des SNP potentiellement fonctionnels ont été détectés (article 5, tableau supplémentaire disponible en ligne): *transporteur 1 sodium/proton* ou *Ncx1* (fonction rénale); *facteur 1 de croissance semblable à l'insuline*; *insulinoma-associated 1* (signalisation vasculaire); *récepteur 1 aux cannabinoïdes*; *récepteur 1d à la sérotonine* (neurotransmission); *protéine 2 associée à la caspase 8*; *protéine 2 de choc thermique*; *recepteur 2 du facteur de croissance des fibroblastes*; *IFN- type I-induced and dsRNA-activated kinase (Eif2ak2)*; *upstream transcription factor 1*; *sous-unité bêta 4 du canal calcique voltage- dependent*;

*calmoduline 1*; protéine liant le GTP (signalisation/régulation de la transcription). La valeur de ces observations est surtout heuristique puisque la nature de l'implication des précédents facteurs reste à démontrer (seuls les gènes du locus d'émotivité ont été vérifiés par RT-PCR). Néanmoins, ceux-ci montrent l'implication de réseaux de régulation de l'expression génique, qui pourraient expliquer certains des effets multiples et subtils maintes fois rapportés en tant qu'obstacle majeur aux études de génétique du comportement (Flint, Valdar, Shifman, & Mott, 2005).

Par ailleurs, le peu de recouvrement entre nos différents QTL de stress questionne principalement l'assimilation du stress d'immobilisation dans la catégorie des stress psychogéniques (Morley et al., 1990; Gordon & J., 1993). La réponse au stress chez le rat est caractérisée par une hyperthermie (fièvre), réversible par l'administration d'antipyrétiques (Long, Vander, & Kluger, 1990), et attribuable à la synthèse des prostaglandines au niveau du système nerveux central. Cette réponse d'hyperthermie peut également être induite chez la souris par l'effet des manipulations («handling»), mais ne répond pas à l'administration de salicylate (Briese & Cabanac, 1991). Par ailleurs, une hyperthermie marquée peut être obtenue chez la souris par l'injection de doses faibles de LPS et renversée par un traitement (ou chez les souris KO) à l'interleukine 10 (Leon, Kozak, Rudolph, & Kluger, 1999).

En revanche, l'hypothermie de la souris correspond à une réponse **aiguë** au stress, puisqu'elle est semblable à celle émise lors d'injection de doses élevées de LPS (lipopolysaccharide) (Leon et al., 1999). Par ailleurs, l'héritabilité de la réponse d'hypothermie semble concorder avec celle de la thermogénèse via l'*Ucp1* (*uncoupling protein 1*) des tissus adipeux bruns (Guerra, Koza, Yamashita, Walsh, & Kozak, 1998). Dans notre laboratoire, Richard et al. (observations non publiées) ont observé que l'immobilisation ou l'injection d'endotoxine (ou LPS), produisent une hypothermie sévère chez les souches SHM et A/J, en comparaison à cinq autres souches consanguines normotendues, dont B6. Notez ici que notre QTL d'hypothermie se situe près de *Lbp* (*lipopolysaccharide (LPS)-binding protein*), ce qui suggère une cascade commune pour les

deux types de stress. Par ailleurs, chez les animaux hypertendus, l'hyper réponse aux stress s'accorde avec les taux circulants de *Tnf- $\alpha$*  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (Hamet et al., 1992; Pausova et al., 1999a). Par contre, une inactivation du récepteur p55 atténue la concentration plasmatique de corticostérone induite par TNF- $\alpha$ , mais pas par l'immobilisation ou la LPS (Hayley, Kelly, & Anisman, 2004).

D'une façon plus générale, le tableau IV permet de démontrer des corrélations élevées entre les mesures propres à chacune des épreuves et entre les épreuves pour des mesures semblables (cohérence interne), telles que l'open-field et le labyrinthe en croix. Par exemple, la réactivité émotionnelle (EMO pour *emotionality*) dans l'open-field corrèle fortement avec l'émergence ou la timidité dans le labyrinthe en croix (EMPM); et ces dernières mesures semblent liées inversement à la thermogénèse ou récupération en fin d'immobilisation. Il est aussi réconfortant d'observer que la température de base n'est liée à aucune mesure de stress. Ceci concorde avec l'observation d'une héritabilité plus élevée pour la thermogénèse ( $h^2=66.1\%$ ) et l'hypothermie ( $h^2=51.7\%$ ), plutôt qu'en pré-stress ( $h^2=45.8\%$ ), chez les souches AcB notamment. Par contre, le changement de diète n'a pas augmenté l'héritabilité de la réponse au stress comme chez les souches de rats recombinants consanguins (Dumas et al., 2000a). Il faut cependant mentionner que dans le présent protocole, un effet d'habituation ne peut être exclu, puisque la mesure de température a été répétée sous diète salée avec les mêmes animaux.

De plus, il eût été possible d'utiliser l'analyse par composantes principales (*principal components analysis*) comme dans la cohorte de familles hypertendues du Saguenay (Hamet et al., 2005). Sommairement, cette méthode permet de concentrer les analyses sur les mesures liées, en formant des variables composites, de façon à augmenter le nombre d'observations pertinentes; ceci dans le but de maximiser la puissance statistique des associations. Cependant, ce type d'analyse a été employé sans succès sur les diverses mesures dérivées de l'open-field et du labyrinthe en croix (Henderson, Turri, DeFries, & Flint, 2004). Ces auteurs expliquent que l'intérêt des souches consanguines réside précisément dans le contrôle inhérent de l'hétérogénéité des facteurs génétiques et

**Tableau IV. Matrice de corrélation de Pearson entre les phénotypes de stress, en considérant les moyennes des 36 souches RCS comme scores bruts.** Les résultats en gras sont significatifs ( $\alpha = 0.05/105$  comparaisons = 0.0004).

Phénotypes	Hypo-thermie	Thermo-génèse	Temp. Initiale	EMO	OFD	OFA	EMPM	FPM	TFPM	DPM	OPM	O%(PM)	TOPM	H2 (%)
Hypo-thermie	1													
Thermogénèse	<b>-0.844</b>	1												48.4
Temp. Initiale	0.187	0.217	1											66.2
EMO-OF	0.41	<b>-0.601</b>	-0.324	1										45.8
OFD	0.482	<b>-0.594</b>	-0.191	<b>0.917</b>	1									86.6
OFA	-0.297	0.531	0.393	<b>-0.942</b>	<b>-0.73</b>	1								74.9
EMPM	0.403	<b>-0.593</b>	-0.251	<b>0.744</b>	<b>0.585</b>	<b>-0.78</b>	1							86.3
FPM	-0.344	0.529	0.358	<b>-0.77</b>	<b>-0.619</b>	<b>0.798</b>	<b>-0.926</b>	1						74.5
TFPM	<b>0.546</b>	<b>-0.561</b>	-0.126	0.483	0.369	-0.515	<b>0.725</b>	<b>-0.684</b>	1					72.6
DPM	0.353	-0.526	-0.354	<b>0.841</b>	<b>0.834</b>	<b>-0.74</b>	<b>0.615</b>	<b>-0.661</b>	0.42	1				48.8
OPM	-0.244	0.397	0.268	-0.34	-0.277	0.349	<b>-0.702</b>	<b>0.706</b>	<b>-0.716</b>	-0.356	1			79.0
O%(PM)	-0.295	0.307	-0.076	-0.145	-0.058	0.2	<b>-0.549</b>	0.465	<b>-0.706</b>	-0.143	<b>0.794</b>	1		51.0
TOPM	-0.479	0.354	-0.013	-0.005	0.033	0.035	-0.189	0.125	<b>-0.735</b>	-0.011	0.359	0.428	1	48.5
														35.8

EMO-OF, émotionnalité dans l'open-field; OFD, nombre de défécations dans l'open-field; OFA, nombre de déplacements dans l'open-field; EMPM, latence d'émergence du plus-maze; FPM, nombre de visites des bras fermés; TFPM, durée des visites des bras fermés; DPM, nombre de défécations dans le plus-maze; OPM, nombre de visites des bras ouverts; O%(PM), proportion de visites des bras ouverts; TOPM, durée des visites des bras ouverts; temp., température.

environnementaux, qui par ailleurs n'est pas augmenté par l'emploi de l'analyse par composantes principales. Les mêmes auteurs ont également utilisé l'analyse factorielle pour conclure que les différentes dimensions mesurées (inhibition de l'activité, évitement des endroits éclairés, défécation et latence d'émergence) ont un poids plus grand en considérant chaque épreuve de façon indépendante. Ces derniers suggèrent donc une approche psychométrique multi-méthodes, ce qui implique des phénotypages/analyses extensifs tel que le nôtre (Stoll et al., 2001; Solberg et al., 2006).

Néanmoins, une forte relation inverse ( $r=-0.59$ ,  $p<0.0001$ ) est observée entre la thermogénèse en fin d'immobilisation et la latence d'émergence du *plus-maze*. Particulièrement dans le background albino, ces phénotypes partagent les mêmes souches informatives (AcB54, AcB51) qui sont moins anxieuses et récupèrent plus rapidement de l'immobilisation. Ces souches ont en commun l'allèle B6 dans la région du gène *Igfl* (*insulin-like growth factor*) sur le chr. 10, qui correspond au locus détecté pour la thermogénèse en fin d'immobilisation (LOD=3.5; voir tableau 1, article 5). Cependant, la résolution est trop faible (peu de souches dans le background albino) pour que cette région soit détectable dans le *plus-maze* (LOD=1.7, seuil de 2.8 pour un locus suggestif). Cette région mérite plus d'attention dans la mesure où nos souches informatives pourraient permettre d'explorer le potentiel d'*Igfl*, comme déterminant putatif de la longévité (Hamet & Tremblay, 2003). Bartke propose une revue sur l'axe GH/IGF-1 (GH pour hormone de croissance) qui souligne l'importance des modèles animaux pour élucider le rôle de ce système dans la sensibilité et les taux circulants d'insuline; le métabolisme des lipides; le stress oxydatif et la résistance au stress (Bartke, 2005). Ces paramètres coïncident avec la présence de conditions inflammatoires, pour lesquelles le stress semble de plus en plus un acteur important (Suarez, Boyle, Lewis, Hall, & Young, 2005; Hristova & Aloe, 2006; Chandola et al., 2006; Engler, Roy, Sen, Padgett, & Sheridan, 2005; Anisman et al., 2008).

### 6.1.2. QTL de la réactivité émotionnelle dans l'*open-field* : co-ségrégation ou pléiotropisme avec l'hypertension

Notre QTL de réactivité émotionnelle pourrait expliquer le **pléiotropisme** entre la susceptibilité au stress et à l'hypertension, c'est-à-dire que ces phénotypes pourraient être déterminés par un même gène. De plus, cette région correspond, par homologie des gènes contenus sur ce segment du Chr. 1 de la souris, à la région des QTL que notre groupe a publié récemment sur le Chr. 1 des familles hypertendus du Saguenay/Lac St-Jean (Hamet et al., 2005). La distribution des haplotypes ou des allèles (figure 5 de l'article 5) démontre que nos RCS informatives (BcA70 et BcA72) sont anxieuses comme les albinos en raison des allèles de A/J sur un segment précis du Chr. 1 (93.3 cM). Ceci se reflète par un QTL hautement significatif avec le programme MapManager QTX. La localisation correspond exactement à celle obtenu dans un autre modèle (Singer, Hill, Nadeau, & Lander, 2005).

En superposant les résultats des différents outils bioinformatiques, nous proposons de sélectionner les gènes avec plus d'une région (promotrice, codante ou UTR3) comportant un polymorphisme fonctionnel. Ainsi, nous retenons les gènes pour lesquels une expression différentielle est hautement probable. Des 83 gènes connus dans cette région, 38 comportent des SNPs; des répercussions multiples sont prédites pour cinq de ces gènes. La région ciblée contient plusieurs gènes candidats avec des SNPs fonctionnels, particulièrement dans les éléments de régulation. Certains se rapportent à des gènes liés à la réponse inflammatoire/immunitaire tels que *Slamf1* (*signaling lympho-cytic activation molecule family, member 1*), *Fcgr3* (*IgG Fc receptor low affinity III*) et *Crp* (*c reactive protein*) et qui partagent des modifications dans la structure secondaire de l'ARNm (sauf *Fcgr3*), dans les régions promotrice ou codante (sauf *Slamf1*). Des changements fonctionnels dans les éléments de régulation s'appliquent aux candidats du système cardiovasculaire: *Atp1a2* (*Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase alpha2*) and *Nhlh1* (*nescient helix loop helix*). La quantification de la PCR confirme une régulation à la baisse de *Atp1a2* dans le cœur des

souches susceptibles à l'anxiété. Ces résultats confirment l'intrication des altérations dans la susceptibilité au stress et du développement de l'HTA essentielle.

Les gènes impliqués cadrent bien avec l'hypothèse à l'effet qu'une réponse altérée au stress, mettant en jeu des cascades inflammatoires archaïques, qui pourrait être une composante à l'origine du développement de certaines pathologies cardiovasculaires. Les outils de recherche *in silico* permettent de passer des QTL à la génomique fonctionnelle guidée par des hypothèses spécifiques incluant les éléments de régulation. Par exemple, une altération d'un des gènes identifiés, soit *Atp1a2*, représente une cause possible de l'augmentation de l'anxiété et de l'activité du complexe amygdalien (Ikeda et al., 2003). Des données récentes confirment que l'augmentation de l'anxiété est spécifique aux KO de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Moseley et al., 2007). Comme cette sous-unité  $\alpha 2$  n'est exprimée majoritairement que dans les astrocytes chez l'adulte, il s'agirait d'un phénomène précoce d'excitotoxicité qui pourrait s'étudier dans notre souche informative BcA70. Il est également intéressant de mentionner que *Atp1a2* joue aussi un rôle dans le système cardiovasculaire, puisqu'il est impliqué dans la résistance à l'effet vasoconstricteur ou hypertensif de la ouabaine (Dostanic et al., 2005; Huang et al., 2006). Par ailleurs, les cascades inflammatoires telles que celles du *Crp* jouent un rôle déterminant dans l'issue des événements cardiovasculaires (Yeh, 2004). *Nhlh1* a été associé à des dysfonctions autonomiques (Cogliati et al., 2002).

Par ailleurs, si la beauté des modèles animaux réside dans une simplification des interactions gènes/environnement, chacun doit cerner la spécificité des phénotypes à l'étude (Pacak et al., 2001). Par exemple, dépendamment du critère ou de la variable choisie, certains considéreront que B6 est plus susceptible à l'anxiété que A/J en raison de l'hyperactivité en situation nouvelle ou de la susceptibilité à l'hypertension ou à l'athérosclérose (Fullerton, 2005a; Yalcin et al., 2004; Paigen, Morrow, Brandon, Mitchell, & Holmes, 1985; Phelan et al., 2002; Sugiyama et al., 2001). Par contre, ceux qui comme nous considèrent la mesure de défécation arrivent à la conclusion inverse considérant A/J



comme plus anxieuse (Singer et al., 2005; Solberg et al., 2006; Crawley et al., 1997). La prise en compte des différences concernant les cascades inflammatoires (Brandwein, Skamene, Aubut, Gervais, & Nesbitt, 1987; Matesic, Niemitz, De Maio, & Reeves, 2000) pourrait expliquer ces apparentes contradictions, dans la mesure où elles sont impliquées dans le développement de l'athérosclérose chez B6 (Clarke, Stewart-Phillips, & Skamene, 1987; Libby, 2003).

D'autres travaux ont montré que la composante d'activité motrice dans l'OF localise légèrement en aval et a été associée à un polymorphisme dans l'UTR5' de *Kcnj9* (canal potassique), qui en réduit l'expression chez B6 (Hitzemann et al., 2003). À partir d'un modèle multi-ancestral (*outbred*), un QTL en amont à 78 cM, contenant *Rgs2*, est proposé comme candidat pour l'anxiété (Yalcin et al., 2004; Yalcin et al., 2005); cependant, *Rgs2* peut aussi être impliqué dans certaines formes d'hypertension (Heximer et al., 2003). Hitzemann (Matthews et al., 2005) nous fait observer que *Kcnj9* et *Atp1a2* sont des effecteurs de *Rgs2* qui forment un regroupement fonctionnel (*cluster*) concernant la régulation du K<sup>+</sup>, particulièrement le pompage par les cellules gliales, permettant de moduler l'activité nerveuse (repolarisation). Ce locus contient *Usf1* qui réprime *GABA<sub>B</sub>R1b* au niveau pré-synaptique; alors que *Creb2* (eQTL lié au locus de *Usf1*) est un trans-régulateur qui facilite la transcription de *GABA<sub>B</sub>R1a* en post-synaptique (Matthews et al., 2005). *Creb2* se situe sur le deuxième locus d'émotionnalité (*Emo2*) à 43.3 cM sur le Chr. 15 (Gershenfeld et al., 1997a), à l'endroit même où une association a été rapportée avec le trouble de panique/agoraphobie sur la région homologue Chr. 12q13 humain (Smoller et al., 2001a).

### 6.1.3. Limites et perspectives de l'approche *in silico*

Notre approche partant des QTL aux SNPs s'est développée en parallèle, mais d'une façon tout à fait cohérente à celle du groupe de Paigen des laboratoires de Jackson (DiPetrillo, Wang, Stylianou, & Paigen, 2005). Ces derniers offrent désormais un site très bien intégré pour la recherche des SNPs dans près d'une centaine de souches de souris

consanguines communes (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=snpQF>). L'originalité de notre travail fût d'inclure l'impact potentiel des SNPs sur la structure secondaire de l'ARNm et la liaison des ARN d'interférence. Si nous avons contribué à souligner l'importance de ces derniers éléments, c'est cependant avec des outils relativement primitifs. Une limite majeure concerne le biais que nous avons dû pratiquer de façon à sélectionner, parmi l'ensemble des gènes contenus dans le QTL, seulement les gènes connus pour lesquels des évidences en lien avec le phénotype étaient disponibles dans la littérature. La première façon de repousser cette limite serait d'automatiser l'étape du repérage visuel des changements de la structure secondaire des ARNm, qui fût pour nous l'étape limitante. D'une façon similaire, des outils plus complets sont maintenant disponibles pour l'analyse des séquences-cibles des micro-ARN (Bao et al., 2007). Les haplotypes des souches consanguines (*HapMap*) peuvent maintenant être comparée de façon à exclure les régions du génome qui sont identiques parceque héritées d'ancêtres communs (IBD pour *identical by descent*); ceci permettant parfois de préciser la localisation du locus à l'étude (Cervino et al., 2006; Cervino, Darvasi, Fallahi, Mader, & Tsinoremas, 2007).

Un des défis actuel est de reconstituer les réseaux (*transcription modules*) de la mécanique transcriptionnelle impliquée par les SNPs fonctionnels; dans ce domaine, l'intégration des données provenant des biopuces d'expression dans différents pannels expérimentaux sont forts utiles (Li et al., 2006; Petretto et al., 2006; Seda et al., 2005). À ce titre, le site du *GeneNetwork* (<http://www.genenetwork.org:82/search.html>) permet d'accéder aux données des génotypes, phénotypes et patrons d'expression génique par biopuce (particulièrement pour les régions cérébrales), pour la plupart des populations expérimentales cartographiées à ce jour; de plus, des analyses statistiques complexes peuvent être réalisées en ligne. Les RI BxD sont à ce jour les mieux caractérisées (Chesler et al., 2005), y compris pour l'anxiété, particulièrement en regard des efforts remarquables du groupe INIA (*Integrative Neuroscience Initiative on Alcoholism*, <http://www.scripps.edu/cnad/inia/index.html>), à l'intérieur du *Complex Trait Consortium*

(<http://www.complexttrait.org/>). L'utilitaire récent *SNP Miner* permet quant à lui de se concentrer sur les mutations codantes délétaires en lien avec un profil d'expression génique pour les souches consanguines les plus communes (Reuveni, Ramensky, & Gross, 2007).

#### **6.1.4. Vers une définition Lamarckiste du stress ?**

Le rôle des déterminants de la réponse au stress comme *CRF* dépasse le domaine de la génétique et, comme le démontre les travaux de Meaney (Plotsky et al., 2005), traduit aussi l'influence des premières expériences de la vie sur l'altérité des réponses émotionnelles. Un peu à la manière de Kandel, pour qui l'apprentissage suscite la croissance de nouvelles connexions (Kandel, 2001), certains proposent que la qualité du maternage détermine, à long terme mais réversiblement (*environmental programming*), l'état de méthylation du promoteur et l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe des descendants (Meaney & Szyf, 2005). Ce type de conditionnement a également été évoqué pour expliquer le lien entre le faible poids à la naissance et l'hypertension (Jones et al., 2006; Pausova, Paus, Sedova, & Berube, 2003). L'espoir d'une thérapeutique pourrait donc s'appliquer à renverser les effets de l'environnement - qu'on choisisse l'entourage ou les gènes comme cibles.

Ainsi le stress implique des événements épigénétiques dans la mesure où l'adaptabilité (*plasticity*) comportementale ou neuronale aux changements dans l'environnement peut impliquer des modifications à long terme dans l'expression des gènes. Certaines voies de signalisation (PKA, CaM kinases, ERK) agissent sur les facteurs de transcription tels que CREB (protéine liant l'élément de réponse à l'AMPC). Ce-dernier a été impliqué dans de nombreuses études (McClung & Nestler, 2007; Tsankova, Renthal, Kumar, & Nestler, 2007) dans des modifications (sensibilisation ou désensibilisation) test/région spécifiques de circuits neuronaux, suite à l'exposition aux drogues addictives (noyau accumbens) ou dans les modèles animaux d'anxiété/dépression (amygdale). De plus, une stimulation intense (thérapie électroconvulsive) ou chronique viendrait modifier l'ADN des régions promotrices : l'acétylation des histones facilite la relaxation de la

chromatine qui précède la transcription (effet de l'imipramine sur l'expression de *Bdnf* ou *brain-derived neurotrophic factor*); au contraire, la méthylation de l'ADN (cytosine-5 des îlots CpG) permet d'innactiver un gène de manière transitoire.

Notre groupe a déjà proposé que le stress est un cas particulier d'interaction gène/environnement, dans lequel certains gènes décrivent une susceptibilité à l'environnement, qui à son tour est une composante de l'hypertension essentielle (Pravenec et al., 1991; Malo et al., 1989; Dumas et al., 2000b). D'autres proposent des mécanismes particuliers pour expliquer l'héritabilité et l'évolution des réponses au stress (Badyaev, 2005). Les modifications dans l'environnement suscitent des variations et des accommodations dans l'intégration des systèmes de régulation du développement, neuroendocriniens et d'ajustements comportementaux. En parallèle des changements morphologiques, l'accroissement de la variabilité génétique et phénotypique s'inscrit dans une direction dictée par la complexité ou la redondance des systèmes développementaux. Des conditions environnementales extrêmes ou récurrentes peuvent favoriser l'expression de certaines tendances résultant de l'accumulation de variations auparavant neutres. De plus, l'environnement familial et socioculturel exerce une pression sélective supplémentaire en faveur d'une transmission inter générationnelle de certaines réponses. Ainsi, différents niveaux de transmission se conjuguent pour expliquer la mémorisation, l'héritabilité et l'évolution des stratégies de réponse au stress.

## Chapitre 7. Conclusion

L'évaluation des effets du vieillissement sur les souris HBP, LBP a permis de mettre en évidence des déficits précoces dans l'appréciation du danger, la coordination motrice et les fonctions visuo-motrices. Ces phénotypes montrent aussi une polarité entre les souches A/J et B6, desquelles les RCS sont dérivées. Plusieurs de nos QTL de stress convergent vers des régions impliquées dans le contrôle de la tension artérielle. La recherche des polymorphismes fonctionnels entre A/J et B6 dans la région du QTL d'émotivité sur le chr 1, implique des gènes liés aux réponses cardiovasculaire / inflammatoire / immunitaire.

D'autres groupes ont utilisé les QTL murins d'anxiété pour les transposer dans l'étude de la susceptibilité au stress chez l'humain, sans pour autant obtenir de conclusion définitive (Fullerton, 2005b; Willis-Owen et al., 2005; Smoller et al., 2001b; Smoller et al., 2001a; Smoller et al., 2005; Fullerton et al., 2007). Une des directions dans l'avenir serait possiblement de considérer nos souches RCS susceptibles à un âge plus avancé (Hamet et al., 2003; Epel et al., 2006), ou du moins dans des modèles de stress chronique (Ha, Kim, Yeom, Lee, & Han, 2003; Silberman, Wald, & Genaro, 2003), dans lesquels il serait particulièrement intéressant d'étudier l'expression de nos gènes candidats. En effet, peu de groupes ont exploré les déterminants génétiques de la susceptibilité au stress dans la perspective de la physiopathologie cardiovasculaire. Enfin, certains ont suggéré une dichotomie entre les modèles animaux physiologiques versus psychologiques (Willis-Owen & Flint, 2007), selon laquelle les QTL d'émotivité ne seraient possiblement pas conservés chez l'humain, comme c'est le cas pour les phénotypes de nature physiologique comme l'hypertension. Les nombreuses convergences entre nos mesures de stress vers des cascades physiologiques soupçonnés d'être impliqués dans l'hypertension induite par le stress, questionnent fortement cette conception dualiste.

Par ailleurs, nos collègues de l'Université McGill s'entendent pour placer en priorité les variations génétiques affectant les régions régulatrices, celles-ci couvrant près de 99 % du génome en dehors des séquences codant les gènes (Lee et al., 2006). Ces derniers utilisent les RCS dans un modèle de régression multiple qui permet d'identifier des gènes pour lesquels les profils d'expression (puce Affimétrie) varient en fonction de la provenance des allèles. Des SNPs dans la région 3'UTR sont présents dans 64 % de gènes ainsi identifiés, contre 29 % pour ceux dont le profil d'expression n'est pas associé à l'héritabilité des allèles. Ainsi, un test de déséquilibre allélique permet de retrouver 50 % de ces gènes, dont *rgs2* dans la région du chr 1 qui nous a intéressée chez la souris. Ainsi, nos résultats représentent une contribution importante dans la constitution d'un répertoire des variations génomiques fonctionnelles dans les RCS pour la dissection des maladies complexes et du rôle possible des facteurs de susceptibilité au stress (Vale, 2005). Les nouvelles hypothèses découlant de ces travaux pourront donc se vérifier à l'aide des RCS informatives.

## Bibliographie

Abate, G., Zito, M., Ferrari-Ramondo, V., & Di Iorio, A. (2001). Blood pressure and dementia: A review. *Arch.Gerontol.Geriatr.*, 33 Suppl 1, 7-18.

Anderson, D. E., Dietz, J. R., & Murphy, P. (1987). Behavioural hypertension in sodium-loaded dogs is accompanied by sustained sodium retention. *J Hypertens*, 5, 99-105.

Anisman, H., Merali, Z., & Hayley, S. (2008). Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog.Neurobiol.*, 85, 1-74.

Appel, L. J. (2002). The verdict from ALLHAT--thiazide diuretics are the preferred initial therapy for hypertension. *JAMA*, 288, 3039-3042.

Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J.Endocrinol.*, 160, 1-12.

Badyaev, A. V. (2005). Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation. *Proc Biol Sci*, 272, 877-886.

- Bakshi, V. P. & Kalin, N. H. (2000). Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions. *Biol Psychiatry*, *48*, 1175-1198.
- Bao, L., Zhou, M., Wu, L., Lu, L., Goldowitz, D., Williams, R. W. et al. (2007). PolymiRTS Database: linking polymorphisms in microRNA target sites with complex traits. *Nucleic Acids Res.*, *35*, D51-D54.
- Bartke, A. (2005). Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology*, *146*, 3718-3723.
- Bensi, N., Bertuzzi, M., Armario, A., & Gauna, H. F. (1997). Chronic immobilization stress reduces sodium intake and renal excretion in rats. *Physiol Behav*, *62*, 1391-1396.
- Bensoula, A. N., Guastavino, J. M., Lalonde, R., Portet, R., Bertin, R., & Krafft, B. (1995). Spatial navigation of staggerer and normal mice during juvenile and adult stages. *Physiol Behav.*, *58*, 823-825.
- Bertholet, J. Y. & Crusio, W. E. (1991). Spatial and non-spatial spontaneous alternation and hippocampal mossy fibre distribution in nine inbred mouse strains. *Behav. Brain Res*, *43*, 197-202.
- Biron, P., Mongeau, J. G., & Bertrand, D. (1976). Familial aggregation of blood pressure in 558 adopted children. *Can Med Assoc J*, *115*, 773-774.
- Black, H. R., Elliott, W. J., Grandits, G., Grambsch, P., Lucente, T., White, W. B. et al. (2003). Principal results of the Controlled Onset Verapamil Investigation of Cardiovascular End Points (CONVINCE) trial. *JAMA*, *289*, 2073-2082.
- Blum, K., Sheridan, P. J., Wood, R. C., Braverman, E. R., Chen, T. J., & Comings, D. E. (1995). Dopamine D2 receptor gene variants: association and linkage studies in impulsive-addictive-compulsive behaviour. *Pharmacogenetics*, *5*, 121-141.
- Bonneau, M., Mormede, P., Vogler, G. P., McClearn, G. E., & Jones, B. C. (1998). A genetic basis for neuroendocrine-immune interaction. *Brain Behav. Immun.*, *12*, 83-89.



Bourjeili, N., Turner, M., Stinner, J., & Ely, D. (1995). Sympathetic nervous system influences salt appetite in four strains of rats. *Physiol Behav*, *58*, 437-443.

Brandwein, S. R., Skamene, E., Aubut, J. A., Gervais, F., & Nesbitt, M. N. (1987). Genetic regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 production by murine peritoneal macrophages. *J Immunol.*, *138*, 4263-4269.

Briese, E. & Cabanac, M. (1991). Stress hyperthermia: physiological arguments that it is a fever. *Physiol Behav.*, *49*, 1153-1157.

Burcelin, R., Uldry, M., Foretz, M., Perrin, C., Dacosta, A., Nenniger-Tosato, M. et al. (2004). Impaired glucose homeostasis in mice lacking the alpha1b-adrenergic receptor subtype. *Journal of biological Chemistry*, *279*, 1108-1115.

Butz, G. M. & Davisson, R. L. (2001). Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. *Physiol Genomics*, *5*, 89-97.

Caldarone, B., Saavedra, C., Tartaglia, K., Wehner, J. M., Dudek, B. C., & Flaherty, L. (1997). Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. *Nat.Genet.*, *17*, 335-337.

Cervino, A. C., Darvasi, A., Fallahi, M., Mader, C. C., & Tsinoremas, N. F. (2007). An integrated in silico gene mapping strategy in inbred mice. *Genetics*, *175*, 321-333.

Cervino, A. C., Gosink, M., Fallahi, M., Pascal, B., Mader, C., & Tsinoremas, N. F. (2006). A comprehensive mouse IBD database for the efficient localization of quantitative trait loci. *Mamm.Genome*, *17*, 565-574.

Chandola, T., Brunner, E., & Marmot, M. (2006). Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study. *BMJ*, *332*, 521-525.

Chesler, E. J., Lu, L., Shou, S., Qu, Y., Gu, J., Wang, J. et al. (2005). Complex trait analysis of gene expression uncovers polygenic and pleiotropic networks that modulate nervous system function. *Nat.Genet.*, *37*, 233-242.

- Choi, D. C., Furay, A. R., Evanson, N. K., Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2007). Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J.Neurosci.*, *27*, 2025-2034.
- Clarke, A., Stewart-Phillips, J. L., & Skamene, E. (1987). Genetic control of susceptibility to atherosclerosis (with special emphasis on the role of the macrophage). *Clin Invest Med.*, *10*, 499-512.
- Cogliati, T., Good, D. J., Haigney, M., Delgado-Romero, P., Eckhaus, M. A., Koch, W. J. et al. (2002). Predisposition to arrhythmia and autonomic dysfunction in Nhlh1-deficient mice. *Mol.Cell Biol*, *22*, 4977-4983.
- Cohen, R. M., Kang, A., & Gulick, C. (2001). Quantitative trait loci affecting the behavior of A/J and CBA/J intercross mice in the elevated plus maze. *Mamm.Genome*, *12*, 501-507.
- Crabbe, J. C., Wahlsten, D., & Dudek, B. C. (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, *284*, 1670-1672.
- Crawley, J. N., Belknap, J. K., Collins, A., Crabbe, J. C., Frankel, W., Henderson, N. et al. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)*, *132*, 107-124.
- Dahlof, B., Sever, P. S., Poulter, N. R., Wedel, H., Beevers, D. G., Caulfield, M. et al. (2005). Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, *366*, 895-906.
- Dampney, R. A. & Horiuchi, J. (2003). Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using c-fos gene expression. *Prog.Neurobiol.*, *71*, 359-384.
- DeFries, J. C. (1969). Pleiotropic effects of albinism on open field behaviour in mice. *Nature*, *221*, 65-66.

DeFries, J. C., Gervais, M. C., & Thomas, E. A. (1978). Response to 30 generations of selection for open-field activity in laboratory mice. *Behav.Genet.*, 8, 3-13.

Demant, P. & Hart, A. A. M. (1986). Recombinant congenic strains - A new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene. *Immunogenetics*, 24, 416-422.

Deng, A. Y., Dene, H., Pravenec, M., & Rapp, J. P. (1994). Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes. *J Clin Invest*, 93, 2701-2709.

Diana, G. (2002). Does hypertension alone lead to cognitive decline in spontaneously hypertensive rats? *Behav.Brain Res.*, 134, 113-121.

Diana, G., Scotti de Carolis, A., Frank, C., & et al. (1994). Selective reduction of hippocampal dentate frequency potentiation in aged rats with impaired place learning. *Brain Res Bull*, 35, 107-111.

Dibona, G. F. & Jones, S. Y. (1995). Acute environmental stress overrides cardiac volume receptor reflex in borderline hypertensive rats. *J Hypertens*, 13, 63-68.

Ding, J. H., Xu, X., Yang, D., Chu, P. H., Dalton, N. D., Ye, Z. et al. (2004). Dilated cardiomyopathy caused by tissue-specific ablation of SC35 in the heart. *EMBO J*, 23, 885-896.

DiPetrillo, K., Wang, X., Stylianou, I. M., & Paigen, B. (2005). Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends Genet.*, 21, 683-692.

Disterhoft, J. F., Thompson, L. T., Weiss, C., & et al. (1995). The calcium hypothesis for Alzheimer's disease : Insights from animal and human studies. *Neurosc Res Comm*, 17, 121-131.

Docherty, J. R. (1990). Cardiovascular responses in ageing: a review. *Pharmacol.Rev.*, 42, 103-125.

Doerge, R. W. & Churchill, G. A. (1996). Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics*, *142*, 285-294.

Dostanic, I., Paul, R. J., Lorenz, J. N., Theriault, S., Van Huysse, J. W., & Lingrel, J. B. (2005). The alpha2-isoform of Na-K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol*, *288*, H477-H485.

Drolet, G., Proulx, K., Pearson, D., Rochford, J., & Deschepper, C. F. (2002). Comparisons of behavioral and neurochemical characteristics between WKY, WKHA, and Wistar rat strains. *Neuropsychopharmacology*, *27*, 400-409.

Dumas, P. (2001). *Déterminants génétiques de la susceptibilité au stress*. Ph. D. Université de Montréal.

Dumas, P., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Hamet, P., & Tremblay, J. (2002). Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. *J Hypertens*, *20*, 209-217.

Dumas, P., Pausova, Z., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Dumont, M. et al. (2000a). Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rat. *Hypertension*, *35*, 568-573.

Dumas, P., Sun, Y., Corbeil, G., Tremblay, S., Pausova, Z., Kren, V. et al. (2000b). Mapping of quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens*, *18*, 545-551.

Dumas, P., Tremblay, J., & Hamet, P. (1994). Stress modulation by electrolytes in salt-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Am J Med Sci*, *307(Suppl. 1)*, 130-137.

Elias, M. F. & Schlager, G. (1974). Discrimination learning in mice genetically selected for high and low blood pressure: initial findings and methodological implications. *Physiol Behav.*, *13*, 261-267.

Ely, D. L., Daneshvar, H., Turner, M. E., Johnson, M. L., & Salisbury, R. L. (1993). The hypertensive Y chromosome elevates blood pressure in F<sub>11</sub> normotensive rats. *Hypertension*, *21*, 1071-1075.

Engler, A., Roy, S., Sen, C. K., Padgett, D. A., & Sheridan, J. F. (2005). Restraint stress alters lung gene expression in an experimental influenza A viral infection. *J.Neuroimmunol.*, *162*, 103-111.

Epel, E. S., Lin, J., Wilhelm, F. H., Wolkowitz, O. M., Cawthon, R., Adler, N. E. et al. (2006). Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology*, *31*, 277-287.

Falconer, D. S. (1960). *Introduction to quantitative genetics*. New York.

Farmer, M. E., Kittner, S. J., Abbott, R. D., Wolz, M. M., Wolf, P. A., & White, L. R. (1990). Longitudinally measured blood pressure, antihypertensive medication use, and cognitive performance: the Framingham Study. *J.Clin.Epidemiol.*, *43*, 475-480.

Flint, J. (2003). Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *J.Neurobiol.*, *54*, 46-77.

Flint, J., Corley, R., DeFries, J. C., Fulker, D. W., Gray, J. A., Miller, S. et al. (1995). A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science*, *269*, 1432-1435.

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.

Folkow, B. (1990). «Structural factor» in primary and secondary hypertension. *Hypertension*, *16*, 89-101.

Folkow, B. (2001). Mental stress and its importance for cardiovascular disorders; physiological aspects, "from-mice-to-man". *Scand Cardiovasc J*, *35*, 163-172.

- Forette, F., Seux, M. L., Staessen, J. A., Thijs, L., Birkenhager, W. H., Babarskiene, M. R. et al. (1998). Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet*, 352, 1347-1351.
- Fortin, A., Diez, E., Rochefort, D., Laroche, L., Malo, D., Rouleau, G. A. 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.
- Fortin, A., Stevenson, M. M., & Gros, P. (2002). Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice. *Genes Immun.*, 3, 177-186.
- Fullerton, J. (2005a). New Approaches to the Genetic Analysis of Neuroticism and Anxiety. *Behav.Genet.*, 1-15.
- Fullerton, J. (2005b). New Approaches to the Genetic Analysis of Neuroticism and Anxiety. *Behav.Genet.*, 1-15.
- Fullerton, J. M., Willis-Owen, S. A., Shifman, S., Copley, R. R., Miller, S. R., Bhomra, A. et al. (2007). Human-Mouse Quantitative Trait Locus Concordance and the Dissection of a Human Neuroticism Locus. *Biol.Psychiatry*, 63(9):874-83, 874-883.
- Garrett, K. M., Niekrasz, I., Haque, D., Parker, K. M., & Seale, T. W. (1998a). Genotypic differences between C57BL/6 and A inbred mice in anxiolytic and sedative actions of diazepam. *Behav.Genet.*, 28, 125-136.
- Garrett, M. R., Dene, H., Walder, R., Zhang, Q. Y., Cicila, G. T., Assadnia, S. et al. (1998b). Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res*, 8, 711-723.
- Garrett, M. R., Saad, Y., Dene, H., & Rapp, J. P. (2000). Blood pressure QTL that differentiate dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats [In Process Citation]. *Physiol Genomics*, 3, 33-38.
- Gershenfeld, H. K., Neumann, P. E., Mathis, C., Crawley, J. N., Li, X., & Paul, S. M. (1997a). Mapping quantitative trait loci for open-field behavior in mice. *Behav.Genet.*, 27, 201-210.

Gershenfeld, H. K. & Paul, S. M. (1997b). Mapping quantitative trait loci for fear-like behaviors in mice. *Genomics*, *46*, 1-8.

Gershenfeld, H. K. & Paul, S. M. (1998). Towards a genetics of anxious temperament: from mice to men. *Acta Psychiatr.Scand.Suppl*, *393*, 56-65.

Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S. et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, *428*, 493-521.

Gong, L., Shang, W., Zhu, Y., Jo, G., 11 collaborating centers in the Shanghai area (Shanghai Institute of Hypertension, R. J. H. o. S. i. C., Kong, D. et al. (1996). Shanghai Trial of Nifedipine in the Elderly (STONE). *J Hypertens*, *14*, 1-9.

Gordon, C. & J. (1993). *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*. Cambridge: Cambridge University Press.

Gould, R. J., Murphy, K. M., & Snyder, S. H. (1985). Autoradiographic localization of calcium channel antagonist receptors in rat brain with [3H]nitrendipine. *Brain Res.*, *330*, 217-223.

Gower, A. J. & Lamberty, Y. (1993). The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. *Behav.Brain Res*, *57*, 163-173.

Grauer, E. & Kapon, Y. (1993). Wistar-Kyoto rats in the Morris water maze: impaired working memory and hyper-reactivity to stress. *Behav.Brain Res.*, *59*, 147-151.

Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G., & Sanger, D. J. (2000). Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *148*, 164-170.

Gross, V. & Luft, F. C. (2003). Exercising restraint in measuring blood pressure in conscious mice. *Hypertension*, *41*, 879-881.

Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K., & Kozak, L. P. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J.Clin.Invest*, 102, 412-420.

Guyton, A. C. (1987). *Basic neuroscience: anatomy and physiology*. Philadelphia: Saunders, Toronto.

Ha, H. Y., Kim, K. S., Yeom, Y. I., Lee, J. K., & Han, P. L. (2003). Chronic restraint stress massively alters the expression of genes important for lipid metabolism and detoxification in liver. *Toxicol.Lett.*, 146, 49-63.

Haas, M., Yilmaz, N., Schmidt, A., Neyer, U., Arneitz, K., Stummvoll, H. K. et al. (1998). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism determines the antiproteinuric and systemic hemodynamic effect of enalapril in patients with proteinuric renal disease. Austrian Study Group of the Effects of Enalapril Treatment in Proteinuric Renal Disease. *Kidney Blood Press Res*, 21, 66-69.

Hachinski, V. C., Iliff, L. D., Zilhka, E., Du Boulay, G. H., McAllister, V. L., Marshall, J. et al. (1975). Cerebral blood flow in dementia. *Arch.Neurol.*, 32, 632-637.

Haïat, R. & Leroy, G. (2004). Hypertension artérielle: Les enseignements des grands essais cliniques. Frisson-Roche. 3. Rogers Media. Collection Médecine et Preuves.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Hamet, P., Pausova, Z., Tremblay, J., & Deng, A. Y. (2002a). Hypertension as a genetic disease. In G. Mancia, J. Chalmers, A. Ferrari, S. Julius, T. Saruta, & M. Weber (Eds.), *Hypertension Manual* (Scotland, UK: Robert Stevenson House).

Hamet, P. & Gong, L. (1996). Antihypertensive therapy debate: contribution of STONE and beyond. *J Hypertens*, 14, S9-S14.

Hamet, P., Kaiser, M. A., Sun, Y. L., Page, V., Vincent, M., Kren, V. et al. (1996). HSP27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension*, 28, 1112-1117.



- Hamet, P., Kong, D., Pravenec, M., Kunes, J., Kren, V., Klir, P. et al. (1992). Restriction fragment length polymorphism of *hsp70* gene, localized in the RT1 complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, *19*, 611-614.
- Hamet, P., Malo, D., & Tremblay, J. (1991). Genetic basis of increased sensitivity to environmental stress in hypertension. In G. Jasmin & L. Proschek (Eds.), *Methods and Achievements in Experimental Pathology - Stress Revisited* (pp. 27-46). Basel: S. Karger AG.
- Hamet, P., Merlo, E., Seda, O., Broeckel, U., Tremblay, J., Kaldunski, M. et al. (2005). Quantitative founder-effect analysis of French canadian families identifies specific Loci contributing to metabolic phenotypes of hypertension. *Am.J.Hum.Genet.*, *76*, 815-832.
- Hamet, P., Pausova, Z., Adarichev, S., Adaricheva, K., & Tremblay, J. (1998). Hypertension: genes and environment. *J Hypertens*, *16*, 397-418.
- Hamet, P., Pausova, Z., Dumas, P., Sun, Y. L., Tremblay, J., Pravenec, M. et al. (1998). Newborn and adult recombinant inbred strains: a tool for the search of genetic determinants of target organ damage in hypertension. *Kidney Int*, *53*, 1488-1492.
- Hamet, P., Richard, L., Dam, T. V., Teiger, E., Orlov, S. N., Gaboury, L. et al. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*, *26*, 642-648.
- Hamet, P., Sun, Y. L., Malo, D., Kong, D., Kren, V., Pravenec, M. et al. (1994). Genes of stress in experimental hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *21*, 907-911.
- Hamet, P., Thorin-Trescases, N., Moreau, P., Dumas, P., Tea, B. S., deBlois, D. et al. (2001). Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension*, *37*, 760-766.
- Hamet, P. & Tremblay, J. (2002b). Genetic determinants of the stress response in cardiovascular disease. *Metabolism*, *51*, 15-24.
- Hamet, P. & Tremblay, J. (2003). Genes of aging. *Metabolism*, *52*, 5-9.

Harshfield, G. A., Wilson, M. E., McLeod, K., Hanevold, C., Kapuku, G. K., Mackey, L. et al. (2003). Adiposity is related to gender differences in impaired stress-induced pressure natriuresis. *Hypertension*, *42*, 1082-1086.

Hayley, S., Kelly, O., & Anisman, H. (2004). Corticosterone changes in response to stressors, acute and protracted actions of tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide treatments in mice lacking the tumor necrosis factor-alpha p55 receptor gene. *Neuroimmunomodulation*, *11*, 241-246.

Heilig, M. (2004). The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides*, *38*, 213-224.

Henderson, N. D., Turri, M. G., DeFries, J. C., & Flint, J. (2004). QTL analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice. *Behav. Genet.*, *34*, 267-293.

Henry, J. P., Liu, J., & Meehan, W. P. (1995). Psychosocial stress and experimental hypertension. In J.H.Larah & B. M. Brenner (Eds.), *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Second ed., pp. 905-921). New York: Raven Press, Ltd.

Heximer, S. P., Knutsen, R. H., Sun, X., Kaltenbronn, K. M., Rhee, M. H., Peng, N. et al. (2003). Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J Clin Invest*, *111*, 445-452.

Hilbert, P., Lindpaintner, K., Beckmann, J. S., Serikawa, T., Soubrier, F., Dubay, C. et al. (1991). Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature*, *353*, 521-529.

Hitzemann, R., Demarest, K., Koyner, J., Cipp, L., Patel, N., Rasmussen, E. et al. (2000). Effect of genetic cross on the detection of quantitative trait loci and a novel approach to mapping QTLs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *67*, 767-772.

Hitzemann, R., Malmanger, B., Reed, C., Lawler, M., Hitzemann, B., Coulombe, S. et al. (2003). A strategy for the integration of QTL, gene expression, and sequence analyses. *Mamm. Genome*, *14*, 733-747.

Hofman, A., Ott, A., Breteler, M. M., Bots, M. L., Slooter, A. J., van Harskamp, F. et al. (1997). Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet*, *349*, 151-154.

Hristova, M. & Aloe, L. (2006). Metabolic syndrome - Neurotrophic hypothesis. *Med.Hypotheses*, *66*, 545-549.

Huang, B. S., Amin, M. S., & Leenen, F. H. (2006). The central role of the brain in salt-sensitive hypertension. *Curr.Opin.Cardiol.*, *21*, 295-304.

Huff, F. J. & Boller, F. (1987). Les démences. In M.I.D.d.c.d.Botez (Ed.), *Neuropsychologie clinique et neurologie du comportement* (pp. 357-370). Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal.

Ichida, T., Takeda, K., Sasaki, S., Nakagawa, M., Hashimoto, T., & Kuriyama, K. (1996). Age-related decrease of gamma-aminobutyric acid (GABA) release in brain of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, *58*, 209-215.

Ikeda, K., Onaka, T., Yamakado, M., Nakai, J., Ishikawa, T. O., Taketo, M. M. et al. (2003). Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice. *J Neurosci.*, *23*, 4667-4676.

Imumorin, I. G., Dong, Y., Zhu, H., Poole, J. C., Harshfield, G. A., Treiber, F. A. et al. (2005). A gene-environment interaction model of stress-induced hypertension. *Cardiovasc Toxicol.*, *5*, 109-132.

Jacob, H., Lindpaintner, K., Lincoln, S., Kusumi, K., Bunker, R., Mao, Y. et al. (1991). Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*, *67*, 213-224.

Jaworski, R. L., Jirout, M., Closson, S., Breen, L., Flodman, P. L., Spence, M. A. et al. (2002). Heart rate and blood pressure quantitative trait loci for the airpuff startle reaction. *Hypertension*, *39*, 348-352.

- Joffres, M. R., Ghadirian, P., Fodor, J. G., Petrasovits, A., Chockalingam, A., & Hamet, P. (1997). Awareness, treatment, and control of hypertension in Canada. *Am J Hypertens*, *10*, 1097-1102.
- Joffres, M. R., Hamet, P., Maclean, D. R., L'Italien, G. J., & Fodor, G. (2001). Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens*, *14*, 1099-1105.
- Joffres, M. R., Hamet, P., Rabkin, S. W., Gelskey, D., Hogan, K., & Fodor, G. (1992). Prevalence, control and awareness of high blood pressure among Canadian adults. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *CMAJ*, *146*, 1997-2005.
- Johansson, C., Jansson, M., Linner, L., Yuan, Q. P., Pedersen, N. L., Blackwood, D. et al. (2001). Genetics of affective disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, *11*, 385-394.
- Jones, A., Godfrey, K. M., Wood, P., Osmond, C., Goulden, P., & Phillips, D. I. (2006). Fetal Growth and the Adrenocortical Response to Psychological Stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *91*(5):1868-71, 1868-1871.
- Jones, B. C., Sarrieau, A., Reed, C. L., Azar, M. R., & Mormede, P. (1998). Contribution of sex and genetics to neuroendocrine adaptation to stress in mice. *Psychoneuroendocrinology*, *23*, 505-517.
- Joober, R., Zarate, J. M., Rouleau, G. A., Skamene, E., & Boksa, P. (2002). Provisional mapping of quantitative trait loci modulating the acoustic startle response and prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuropsychopharmacology*, *27*, 765-781.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, *294*, 1030-1038.
- Karasek, R. A., Theorell, T., Schwartz, J. E., Schnall, P. L., Pieper, C. F., & Michela, J. L. (1988). Job characteristics in relation to the prevalence of myocardial infarction in the US Health Examination Survey (HES) and the Health and Nutrition Examination Survey (HANES). *Am J Public Health*, *78*, 910-918.

Karl, T., Burne, T. H., & Herzog, H. (2005). Effect of Y(1) receptor deficiency on motor activity, exploration, and anxiety. *Behav. Brain Res*, *167*, 87-93.

Kask, A. & Harro, J. (2000). Inhibition of amphetamine- and apomorphine-induced behavioural effects by neuropeptide Y Y(1) receptor antagonist BIBO 3304. *Neuropharmacology*, *39*, 1292-1302.

Kask, A., Harro, J., von Horsten, S., Redrobe, J. P., Dumont, Y., & Quirion, R. (2002). The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, *26*, 259-283.

Kavety, B., Jenkins, N. A., Fletcher, C. F., Copeland, N. G., & Morgan, J. I. (1994). Genomic structure and mapping of precerebellin and a precerebellin-related gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, *27*, 152-156.

Keck, M. E., Ohl, F., Holsboer, F., & Muller, M. B. (2005). Listening to mutant mice: a spotlight on the role of CRF/CRF receptor systems in affective disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, *29*, 867-889.

Kilander, L., Nyman, H., Boberg, M., Hansson, L., & Lithell, H. (1998). Hypertension is related to cognitive impairment: a 20-year follow-up of 999 men. *Hypertension*, *31*, 780-786.

Kishi, T., Aschkenasi, C. J., Choi, B. J., Lopez, M. E., Lee, C. E., Liu, H. et al. (2005). Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor. *J Comp Neurol.*, *482*, 217-243.

Klimes, I., Weston, K., Gasperikova, D., Kovacs, P., Kvetnansky, R., Jezova, D. et al. (2005). Mapping of genetic determinants of the sympathoneural response to stress. *Physiol Genomics*, *20*, 183-187.

Knardahl, S. & Sagvolden, T. (1979). Open-field behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behav. Neural Biol.*, *27*, 187-200.

Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., & Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science*, *269*, 1427-1429.

Kunes, J., Tremblay, J., Bellavance, F., & Hamet, P. (1991). Influence of environmental temperature on the blood pressure of hypertensive patients in Montreal. *Am J Hypertens*, 4, 422-426.

Lamberty, Y. & Gower, A. J. (1990). Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from maturity to middle age. *Physiol Behav.*, 47, 1137-1144.

Lander, E. S. & Kruglyak, L. (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11, 241-247.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.

Lander, E. S. & Schork, N. J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science*, 265, 2037-2048.

LeDoux, J. E., Sakaguchi, A., & Reis, D. J. (1982). Behaviorally selective cardiovascular hyperreactivity in spontaneously hypertensive rats. Evidence for hypoemotionality and enhanced appetitive motivation. *Hypertension*, 4, 853-863.

Lee, P. D., Ge, B., Greenwood, C. M., Sinnott, D., Fortin, Y., Brunet, S. et al. (2006). Mapping Cis-Acting Regulatory Variation In Recombinant Congenic Strains. *Physiol Genomics*, 25, 294-302.

Leon, L. R., Kozak, W., Rudolph, K., & Kluger, M. J. (1999). An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am.J.Physiol*, 276, R81-R89.

Levine, A. S., Jewett, D. C., Cleary, J. P., Kotz, C. M., & Billington, C. J. (2004). Our journey with neuropeptide Y: effects on ingestive behaviors and energy expenditure. *Peptides*, 25, 505-510.

Li, H., Chen, H., Bao, L., Manly, K. F., Chesler, E. J., Lu, L. et al. (2006). Integrative genetic analysis of transcription modules: towards filling the gap between genetic loci and inherited traits. *Hum.Mol.Genet.*, 15, 481-492.

Libby, P. (2003). Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol.*, *91*, 3A-6A.

Lifton, R. P. & Jeunemaitre, X. (1993). Finding genes that cause human hypertension. *J Hypertens*, *11*, 236-239.

Logue, S. F., Owen, E. H., Rasmussen, D. L., & Wehner, J. M. (1997). Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience*, *80*, 1075-1086.

Long, N. C., Vander, A. J., & Kluger, M. J. (1990). Stress-induced rise of body temperature in rats is the same in warm and cool environments. *Physiol Behav*, *47*, 773-775.

Lynch, M. & Walsh, B. (1997). *Genetics and analysis of quantitative traits*. (vols. Chap. 22) Sunderland.

Malo, D., Schlager, G., Tremblay, J., & Hamet, P. (1989). Thermosensitivity, a possible new locus involved in genetic hypertension. *Hypertension*, *14*, 121-128.

Manly, K. F., Cudmore, R. H., Jr., & Meer, J. M. (2001). Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm.Genome*, *12*, 930-932.

Marchetti, B., Morale, M. C., Testa, N., Tirolo, C., Caniglia, S., Amor, S. et al. (2001). Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, *37*, 259-272.

Marieb, E. N. & [traduction: Jean-Pierre Artigau et al.] (1993). *Anatomie et physiologie humaine [Human anatomy and physiology]*. **Bruxelles**.

Marmot, M. G., Bosma, H., Hemingway, H., Brunner, E., & Stansfeld, S. (1997). Contribution of job control and other risk factors to social variations in coronary heart disease incidence. *Lancet*, *350*, 235-239.

- Marshall, K. E., Godden, E. L., Yang, F., Burgers, S., Buck, K. J., & Sikela, J. M. (2002). In silico discovery of gene-coding variants in murine quantitative trait loci using strain-specific genome sequence databases. *Genome Biol.*, 3, RESEARCH0078.
- Matesic, L. E., Niemitz, E. L., De Maio, A., & Reeves, R. H. (2000). Quantitative trait loci modulate neutrophil infiltration in the liver during LPS-induced inflammation. *FASEB J*, 14, 2247-2254.
- Mathew, S. J., Price, R. B., & Charney, D. S. (2008). Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. *Am.J.Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.*, 148, 89-98.
- Mathis, C., Neumann, P. E., Gershenfeld, H., Paul, S. M., & Crawley, J. N. (1995). Genetic analysis of anxiety-related behaviors and responses to benzodiazepine-related drugs in AXB and BXA recombinant inbred mouse strains. *Behav.Genet.*, 25, 557-568.
- Mathis, C., Paul, S. M., & Crawley, J. N. (1994). Characterization of benzodiazepine-sensitive behaviors in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice. *Behav.Genet.*, 24, 171-180.
- Matthews, D. B., Bhave, S. V., Belknap, J. K., Brittingham, C., Chesler, E. J., Hitzemann, R. J. et al. (2005). Complex genetics of interactions of alcohol and CNS function and behavior. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 29, 1706-1719.
- McClung, C. A. & Nestler, E. J. (2007). Neuroplasticity Mediated by Altered Gene Expression. *Neuropsychopharmacology*, 33, 3-17.
- McMurtry, J. P. & Wexler, B. C. (1981). Hypersensitivity of spontaneously hypertensive rats (SHR) to heat, ether, and immobilization. *Endocrinology*, 108, 1730-1735.
- Meaney, M. J. & Szyf, M. (2005). Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? *Trends Neurosci.*, 28, 456-463.
- Meneses, A., Castillo, C., Ibarra, M., & Hong, E. (1996). Effects of aging and hypertension on learning, memory, and activity in rats. *Physiol Behav.*, 60, 341-345.



Messer, A. (1988). Thyroxine injections do not cause premature induction of thymidine kinase in sg/sg mice. *J.Neurochem.*, 51, 888-891.

Mongeau, J. G., Biron, P., & Sing, C. F. (1986). The influence of genetics and household environment upon the variability of normal blood pressure: the Montreal Adoption Survey. *Clin Exp Hypertens (A)*, 8, 653-660.

Moore, K. J. & Nagle, D. L. (2000). Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. *Annu.Rev.Genet.*, 34, 653-686.

Mori, S., Kato, M., & Fujishima, M. (1995). Impaired maze learning and cerebral glucose utilization in aged hypertensive rats. *Hypertension*, 25, 545-553.

Morich, F. J., Bieber, F., & Lewis, J. M. (1996). Nimodipine in the treatment of probable Alzheimer's disease : results of two multicentre trials. *Clin Drug Invest*, 11, 185-195.

Morimoto, A., Watanabe, T., Morimoto, K., Nakamori, T., & Murakami, N. (1991). Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced responses in rats. *J Physiol*, 443, 421-429.

Morley, R. M., Conn, C. A., Kluger, M. J., & Vander, A. J. (1990). Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, 258, R1064-R1069.

Mormede, P., Courvoisier, H., Ramos, A., Marissal-Arvy, N., Ousova, O., Desautes, C. et al. (2002). Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 563-583.

Moseley, A. E., Williams, M. T., Schaefer, T. L., Bohanan, C. S., Neumann, J. C., Behbehani, M. M. et al. (2007). Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J.Neurosci.*, 27, 616-626.

Mugnaini, E. & Morgan, J. I. (1987). The neuropeptide cerebellin is a marker for two similar neuronal circuits in rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84, 8692-8696.

- Nakano, Y., Oshima, T., Watanabe, M., Matsuura, H., Kajiyama, G., & Kambe, M. (1997). Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and acute response to captopril in essential hypertension. *Am J Hypertens*, *10*, 1064-1068.
- Nemeroff, C. B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol. Psychiatry*, *1*, 336-342.
- Owen, E. H., Logue, S. F., Rasmussen, D. L., & Wehner, J. M. (1997). Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience*, *80*, 1087-1099.
- Pacak, K. & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, *22*, 502-548.
- Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., & Holmes, P. (1985). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, *57*, 65-73.
- Papay, R., Gaivin, R., McCune, D. F., Rorabaugh, B. R., Macklin, W. B., McGrath, J. C. et al. (2004). Mouse alpha1B-adrenergic receptor is expressed in neurons and NG2 oligodendrocytes. *J. Comp Neurol.*, *478*, 1-10.
- Pare, W. P. & Redei, E. (1993). Depressive behavior and stress ulcer in Wistar Kyoto rats. *J. Physiol Paris*, *87*, 229-238.
- Pausova, Z., Deslauriers, B., Gaudet, D., Tremblay, J., Kotchen, T. A., Larochelle, P. et al. (2000). Role of tumor necrosis factor-alpha gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension*, *36*, 14-19.
- Pausova, Z., Kunes, J., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Tremblay, J. et al. (1999a). Contribution of the TNF alpha gene region of rat chromosome 20 to the body temperature response to endotoxin. *Transplant Proc*, *31*, 1622-1623.
- Pausova, Z., Kunes, J., Kren, V., Krenova, D., Pravenec, M., Tremblay, J. et al. (1999b). Endotoxin response in spontaneously hypertensive rats: a role of the TNF- $\alpha$ -gene region. *Folia Biologica (Praha)*, *45*, 189-192.

Pausova, Z., Paus, T., Sedova, L., & Berube, J. (2003). Prenatal exposure to nicotine modifies kidney weight and blood pressure in genetically susceptible rats: a case of gene-environment interaction. *Kidney Int*, *64*, 829-835.

Pausova, Z., Richard, L., Dumas, P., Tremblay, J., & Hamet, P. (1999c). Body temperature response to immobilization stress in hypertensive mice: a role of TNF $\alpha$ . *unpublished data, Submitted to J Hypertens*.

Pausova, Z., Sedova, L., Berube, J., Hamet, P., Tremblay, J., Dumont, M. et al. (2003). Segment of Rat Chromosome 20 Regulates Diet-Induced Augmentations in Adiposity, Glucose Intolerance, and Blood Pressure. *Hypertension*, *41*, 1047-1055.

Pedrazzini, T., Seydoux, J., Kunstner, P., Aubert, J. F., Grouzmann, E., Beermann, F. et al. (1998). Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat.Med.*, *4*, 722-726.

Petretto, E., Mangion, J., Dickens, N. J., Cook, S. A., Kumaran, M. K., Lu, H. et al. (2006). Heritability and tissue specificity of expression quantitative trait loci. *PLoS.Genet.*, *2*, e172.

Phelan, S. A., Beier, D. R., Higgins, D. C., & Paigen, B. (2002). Confirmation and high resolution mapping of an atherosclerosis susceptibility gene in mice on Chromosome 1. *Mamm.Genome*, *13*, 548-553.

Pickering, G. (1961). *The nature of essential hypertension*. London.

Plotsky, P. M., Thiruvikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Caldji, C., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2005). Long-Term Consequences of Neonatal Rearing on Central Corticotropin-Releasing Factor Systems in Adult Male Rat Offspring. *Neuropsychopharmacology*, *30*, 2192-2204.

Poulter, N. R., Shipley, M. J., Bulpitt, C. J., Markowe, H. J., & Marmot, M. G. (1988). Pulse rate and twenty-four hour urinary sodium content interact to determine blood pressure levels of male London civil servants. *J Hypertens Suppl*, *6*, S611-S613.

- 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, 217-222.
- Pravenec, M., Sun, Y. L., Kunes, J., Kong, D., Kren, V., Klir, P. et al. (1991). Environmental susceptibility in hypertension: potential role of *HSP70* and *TNF $\alpha$*  genes. *J Vasc Med Biol*, 3, 297-302.
- Rapp, J. P. (2000). Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev.*, 80, 135-172.
- Rapp, J. P. & Deng, A. Y. (1995). Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: Is it possible? *Hypertension*, 25, 1121-1128.
- Redrobe, J. P., Dumont, Y., Herzog, H., & Quirion, R. (2003). Neuropeptide Y (NPY) Y2 receptors mediate behaviour in two animal models of anxiety: evidence from Y2 receptor knockout mice. *Behav. Brain Res*, 141, 251-255.
- Reis, D. J. & LeDoux, J. E. (1987). Some central neural mechanisms governing resting and behaviorally coupled control of blood pressure. *Circulation*, 76, 12-19.
- Reuveni, E., Ramensky, V. E., & Gross, C. (2007). Mouse SNP Miner: an annotated database of mouse functional single nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics*, 8, 24.
- Rollnik, J. D., Mills, P. J., & Dimsdale, J. E. (1995). Characteristics of individuals who excrete versus retain sodium under stress. *J Psychosom Res*, 39, 499-505.
- Rosengren, A., Hawken, S., Ounpuu, S., Sliwa, K., Zubaid, M., Almahmeed, W. A. et al. (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.
- Rutherford, S. L. & Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396, 336-342.

Sagvolden, T., Metzger, M. A., Schiorbeck, H. K., Rugland, A. L., Spinnangr, I., & Sagvolden, G. (1992). The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. *Behav. Neural Biol.*, *58*, 103-112.

Saitoh, A., Onodera, K., Morita, K., Sodeyama, M., & Kamei, J. (2002). Prazosin inhibits spontaneous locomotor activity in diabetic mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *72*, 365-369.

Saklatvala, J., Dean, J., & Clark, A. (2003). Control of the expression of inflammatory response genes. *Biochem. Soc. Symp.*, 95-106.

Samani, N. J., Gauguier, D., Vincent, M., Kaiser, M. A., Bihoreau, M. T., Lodwick, D. et al. (1996). Analysis of quantitative trait loci for blood pressure on rat chromosome 2 and 13. *Hypertension*, *28*, 1118-1122.

Sanoudou, D., Vafiadaki, E., Arvanitis, D. A., Kranias, E., & Kontrogianni-Konstantopoulos, A. (2005). Array lessons from the heart: focus on the genome and transcriptome of cardiomyopathies. *Physiol Genomics*, *21*, 131-143.

Sapolsky, R. (2003). Taming stress. *Sci Am*, *289*, 86-95.

Sasaki, M., Oki, T., Iuchi, A., Tabata, T., Yamada, H., Manabe, K. et al. (1996). Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies. *J Hypertens*, *14*, 1403-1408.

Sax, D. S., Hirano, A., & Shofer, R. J. (1968). Staggerer, a neurological murine mutant. An electron microscopic study of the cerebellar cortex in the adult. *Neurology*, *18*, 1093-1100.

Schlager, G. (1974). Selection for blood pressure levels in mice. *Genetics*, *76*, 537-549.

Schlager, G. (1981). Longevity in spontaneously hypertensive mice. *Exp. Gerontol.*, *16*, 325-330.

Schlager, G., Freeman, R., & Sustarsic, S. S. (1979). Brain catecholamines and organ weight of mice genetically selected for high and low blood pressure. *Experientia*, 35, 67-69.

Schorck, N. J., Nath, S. P., Lindpainter, K., & Jacob, H. J. (1996). Extensions to quantitative trait locus mapping in experimental organisms. *Hypertension*, 28, 1104-1111.

Seda, O., Tremblay, J., Sedova, L., & Hamet, P. (2005). Integrating genomics and transcriptomics with geo-ethnicity and the environment for the resolution of complex cardiovascular diseases. *Curr.Opin.Mol.Ther.*, 7, 583-587.

Selye, H. (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J*, 115, 53.

Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., III, Tonnerre, B., Roux, R., Garcia, G., Griebel, G. et al. (2005). An overview of SSR149415, a selective nonpeptide vasopressin V(1b) receptor antagonist for the treatment of stress-related disorders. *CNS.Drug Rev*, 11, 53-68.

Sever, P. (2002). The SCOPE trial. Study on Cognition and Prognosis in the Elderly. *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.*, 3, 61-62.

SHEP Cooperative Research Group (1991). Prevention of stroke by anti-hypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension: Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *JAMA*, 265, 3255-3264.

Shimomura, K., Low-Zeddies, S. S., King, D. P., Steeves, T. D., Whiteley, A., Kushla, J. et al. (2001). Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Res.*, 11, 959-980.

Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R. et al. (1998). Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat.Genet.*, 18, 45-48.

Silberman, D. M., Wald, M. R., & Genaro, A. M. (2003). Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J Neuroimmunol.*, 144, 53-60.

Silver, L. M. (2001). *Mouse Genetics: Concepts and Applications*. **Oxford University Press**.

Simon, N. M., Smoller, J. W., McNamara, K. L., Maser, R. S., Zalta, A. K., Pollack, M. H. et al. (2006). Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol.Psychiatry*, *60*, 432-435.

Singer, J. B., Hill, A. E., Nadeau, J. H., & Lander, E. S. (2005). Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice. *Genetics*, *169*, 855-862.

Skoog, I. (1997). Elevated blood pressure and Alzheimer's disease. *Hosp.Pract.(Off Ed)*, *32*, 13-14,16,21.

Skoog, I., Andreasson, L. A., Landahl, S., & Lernfelt, B. (1998). A population-based study on blood pressure and brain atrophy in 85-year-olds. *Hypertension*, *32*, 404-409.

Slemmon, J. R., Goldowitz, D., Blacher, R., & Morgan, J. I. (1988). Evidence for the transneuronal regulation of cerebellin biosynthesis in developing Purkinje cells. *J.Neurosci.*, *8*, 4603-4611.

Smithies, O., Kim, H. S., Takahashi, N., & Edgell, M. H. (2000). Importance of quantitative genetic variations in the etiology of hypertension. *Kidney Int*, *58*, 2265-2280.

Smoller, J. W., Acierno, J. S., Jr., Rosenbaum, J. F., Biederman, J., Pollack, M. H., Meminger, S. et al. (2001a). Targeted genome screen of panic disorder and anxiety disorder proneness using homology to murine QTL regions. *Am J Med Genet.*, *105*, 195-206.

Smoller, J. W., Rosenbaum, J. F., Biederman, J., Susswein, L. S., Kennedy, J., Kagan, J. et al. (2001b). Genetic association analysis of behavioral inhibition using candidate loci from mouse models. *Am J Med Genet.*, *105*, 226-235.

Smoller, J. W., Yamaki, L. H., Fagerness, J. A., Biederman, J., Racette, S., Laird, N. M. et al. (2005). The corticotropin-releasing hormone gene and behavioral inhibition in children at risk for panic disorder. *Biol Psychiatry*, *57*, 1485-1492.

Snowdon, D. A., Greiner, L. H., Mortimer, J. A., & et al. (1997). Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *J Am Med Assoc*, 277, 813-817.

Société québécoise d'hypertension artérielle (2002). *Guide thérapeutique de la Société québécoise d'hypertension artérielle*. (2e éd. ed.) Montréal.

Soderpalm, B. (1989). The SHR exhibits less "anxiety" but increased sensitivity to the anticonflict effect of clonidine compared to normotensive controls. *Pharmacol.Toxicol.*, 65, 381-386.

Solberg, L. C., Valdar, W., Gauguier, D., Nunez, G., Taylor, A., Burnett, S. et al. (2006). A protocol for high-throughput phenotyping, suitable for quantitative trait analysis in mice. *Mamm.Genome*, 17, 129-146.

Spinazzi, R., Andreis, P. G., & Nussdorfer, G. G. (2005). Neuropeptide-Y and Y-receptors in the autocrine-paracrine regulation of adrenal gland under physiological and pathophysiological conditions (Review). *Int.J.Mol.Med.*, 15, 3-13.

Staessen, J., Bulpitt, C. J., Thijs, L., Fagard, R., Joossens, J. V., Van Hoof, R. et al. (1989). Sympathetic tone and relation between sodium intake and blood pressure in the general population. *Br Med J*, 299, 1502-1503.

Staessen, J., Bulpitt, C. J., Thijs, L., Fagard, R., Joossens, J. V., Van Hoof, R. et al. (1991). Pulse rate and sodium intake interact to determine blood pressure. A population study. *Am J Hypertens*, 4, 107-112.

Staessen, J. A., Poulter, N. R., Fletcher, A. E., Markowe, H. L. J., Marmot, M. G., Shipley, M. J. et al. (1994). Psycho-emotional stress-salt intake may interact to raise blood pressure. *J Cardiovasc Risk*, 1, 45-51.

Steckler, T. (2001). The molecular neurobiology of stress - evidence from genetic and epigenetic models. *Behav Pharmacol*, 12, 381-427.

Steinmayr, M., Andre, E., Conquet, F., Rondi-Reig, L., Delhaye-Bouchaud, N., Auclair, N. et al. (1998). staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 3960-3965.



- Steptoe, A. (1997). Behavior and blood pressure: implications for hypertension. In A.Zanchetti & G. Mancia (Eds.), *Pathophysiology of Hypertension* (pp. 674-708). Elsevier Science.
- Stoll, M., Cowley, A. W., Jr., Tonellato, P. J., Greene, A. S., Kaldunski, M. L., Roman, R. J. et al. (2001). A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science*, *294*, 1723-1726.
- Strazielle, C., Lalonde, R., Thifault, S., & Hamet, P. (2004). Regional brain variations of cytochrome oxidase activity in spontaneously hypertensive mice. *Exp.Brain Res.*, *157*, 255-264.
- Suarez, E. C., Boyle, S. H., Lewis, J. G., Hall, R. P., & Young, K. H. (2005). Increases in stimulated secretion of proinflammatory cytokines by blood monocytes following arousal of negative affect: The role of insulin resistance as moderator. *Brain Behav.Immun.*, *20*, 331-338.
- Sugiyama, F., Churchill, G. A., Higgins, D. C., Johns, C., Makaritsis, K. P., Gavras, H. et al. (2001). Concordance of murine quantitative trait loci for salt-induced hypertension with rat and human loci. *Genomics*, *71*, 70-77.
- Svensson, L., Harthorn, C., & Linder, B. (1991). Evidence for a dissociation between cardiovascular and behavioral reactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Behav.*, *49*, 661-665.
- Svoboda, P. & Cara, A. D. (2006). Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol.Life Sci*, *63*, 901-908.
- Talbot, C. J., Nicod, A., Cherny, S. S., Fulker, D. W., Collins, A. C., & Flint, J. (1999). High-resolution mapping of quantitative trait loci in outbred mice. *Nat.Genet.*, *21*, 305-308.
- Taylor, B. K., Holloway, D., & Printz, M. P. (1994). A unique central cholinergic deficit in the spontaneously hypertensive rat: physostigmine reveals a bradycardia associated with sensory stimulation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, *268*, 1081-1090.

- Terry, A. V., Jr., Hernandez, C. M., Buccafusco, J. J., & Gattu, M. (2000). Deficits in spatial learning and nicotinic-acetylcholine receptors in older, spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, *101*, 357-368.
- Tivesten, A., Bollano, E., Andersson, I., & et al. (2002). Liver-Derived Insulin-Like Growth Factor-I Is Involved in the Regulation of Blood Pressure in Mice. *Endocrinology*, *143*, 4235-4242.
- Tong, X. K., Nicolakakis, N., Kocharyan, A., & Hamel, E. (2005). Vascular Remodeling versus Amyloid {beta}-Induced Oxidative Stress in the Cerebrovascular Dysfunctions Associated with Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *25*, 11165-11174.
- Torgersen, S. (1990). Comorbidity of major depression and anxiety disorders in twin pairs. *Am.J.Psychiatry*, *147*, 1199-1202.
- Tremblay, J., Hum, D., Sanchez, R., Dumas, P., Pravenec, M., Krenova, D. et al. (2003). TA Repeat Variation, Npr1 Expression, and Blood Pressure: Impact of the Ace Locus. *Hypertension*, *41*, 16-24.
- Trullas, R. & Skolnick, P. (1993). Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)*, *111*, 323-331.
- Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat.Rev.Neurosci.*, *8*, 355-367.
- Turri, M. G., Henderson, N. D., DeFries, J. C., & Flint, J. (2001). Quantitative trait locus mapping in laboratory mice derived from a replicated selection experiment for open-field activity. *Genetics*, *158*, 1217-1226.
- Turri, M. G., Talbot, C. J., Radcliffe, R. A., Wehner, J. M., & Flint, J. (1999). High-resolution mapping of quantitative trait loci for emotionality in selected strains of mice. *Mamm.Genome*, *10*, 1098-1101.
- Unlap, M. T., Peti-Peterdi, J., & Bell, P. D. (2000). Cloning of mesangial cell Na(+)/Ca(2+) exchangers from Dahl/Rapp salt-sensitive/resistant rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, *279*, F177-F184.

Urade, Y., Oberdick, J., Molinar-Rode, R., & Morgan, J. I. (1991). Precerebellin is a cerebellum-specific protein with similarity to the globular domain of complement C1q B chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 88, 1069-1073.

Vale, S. (2005). Psychosocial stress and cardiovascular diseases. *Postgrad.Med.J*, 81, 429-435.

Villegier, A. S., Drouin, C., Bizot, J. C., Marien, M., Glowinski, J., Colpaert, F. et al. (2003). Stimulation of postsynaptic alpha1b- and alpha2-adrenergic receptors amplifies dopamine-mediated locomotor activity in both rats and mice. *Synapse*, 50, 277-284.

Wang, X., Korstanje, R., Higgins, D., & Paigen, B. (2004). Haplotype analysis in multiple crosses to identify a QTL gene. *Genome Res.*, 14, 1767-1772.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P. et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520-562.

Wehner, J. M., Radcliffe, R. A., & Bowers, B. J. (2001). Quantitative genetics and mouse behavior. *Annu.Rev.Neurosci.*, 24, 845-867.

Wehner, J. M., Radcliffe, R. A., Rosmann, S. T., Christensen, S. C., Rasmussen, D. L., Fulker, D. W. et al. (1997). Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. *Nat.Genet.*, 17, 331-334.

Wiederkehr, S., Simard, M., Fortin, C., & van Reekum, R. (2008). Validity of the clinical diagnostic criteria for vascular dementia: a critical review. Part II. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.*, 20, 162-177.

Wilkie, G. S., Dickson, K. S., & Gray, N. K. (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem.Sci*, 28, 182-188.

Williams, G. H., Dluhy, R. G., Lifton, R. P., Moore, T. J., Gleason, R., Williams, R. et al. (1992). Non-modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension. *Hypertension*, 20, 788-796.

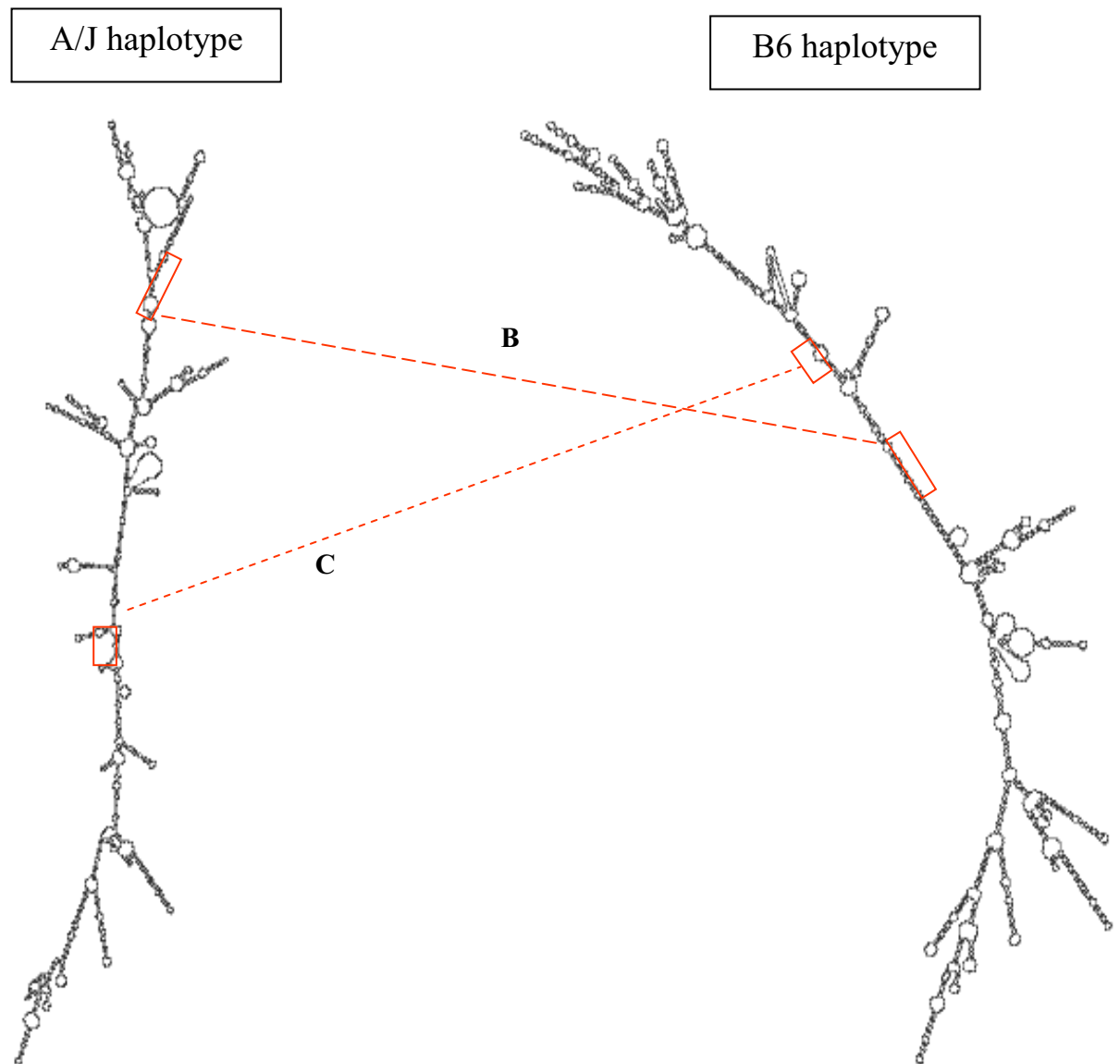
- Willis-Owen, S. A. & Flint, J. (2007). Identifying the genetic determinants of emotionality in humans; insights from rodents. *Neurosci.Biobehav.Rev*, *31*, 115-124.
- Willis-Owen, S. A., Fullerton, J., Surtees, P. G., Wainwright, N. W., Miller, S., & Flint, J. (2005). The Val66Met coding variant of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene does not contribute toward variation in the personality trait neuroticism. *Biol.Psychiatry*, *58*, 738-742.
- Wing, L. M. H., Reid, C. M., Ryan, P., & et al. (2003). A Comparison of Outcomes with Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitors and Diuretics for Hypertension in the Elderly. *N Engl J Med*, *348*, 583-592.
- Woo, D. D. & Kurtz, I. (2003). Mapping blood pressure loci in (A/J x B6)F2 mice. *Physiol Genomics*, *15*, 236-242.
- Wright, F. A., O'Connor, D. T., Roberts, E., Kutey, G., Berry, C. C., Yoneda, L. U. et al. (1999). Genome scan for blood pressure loci in mice. *Hypertension*, *34*, 625-630.
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K. et al. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, *434*, 338-345.
- Yalcin, B., Flint, J., & Mott, R. (2005). Using progenitor strain information to identify quantitative trait nucleotides in outbred mice. *Genetics*, *171*, 673-681.
- Yalcin, B., Willis-Owen, S. A., Fullerton, J., Meesaq, A., Deacon, R. M., Rawlins, J. N. et al. (2004). Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat.Genet.*, *36*, 1197-1202.
- Yeh, E. T. (2004). CRP as a mediator of disease. *Circulation*, *109*, II11-II14.
- Yoshikawa, T., Watanabe, A., Ishitsuka, Y., Nakaya, A., & Nakatani, N. (2002). Identification of multiple genetic loci linked to the propensity for "behavioral despair" in mice. *Genome Res.*, *12*, 357-366.

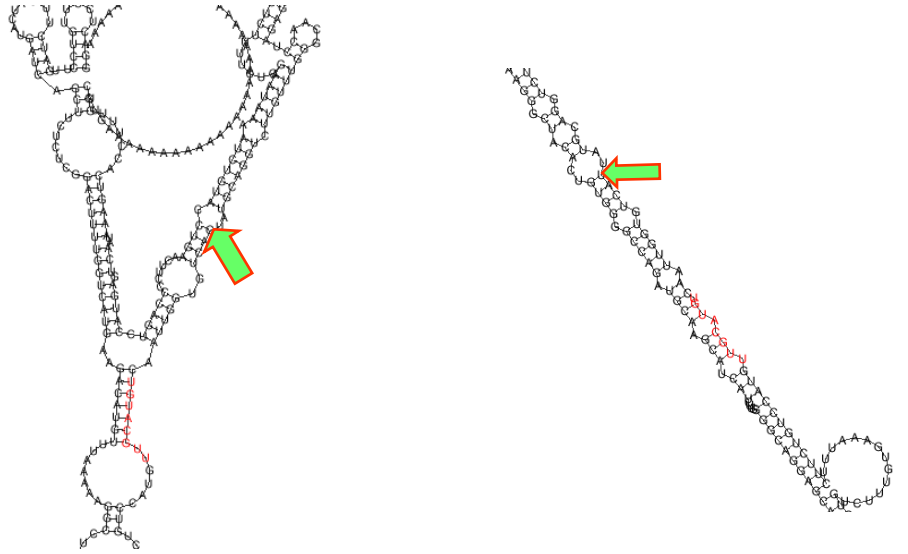
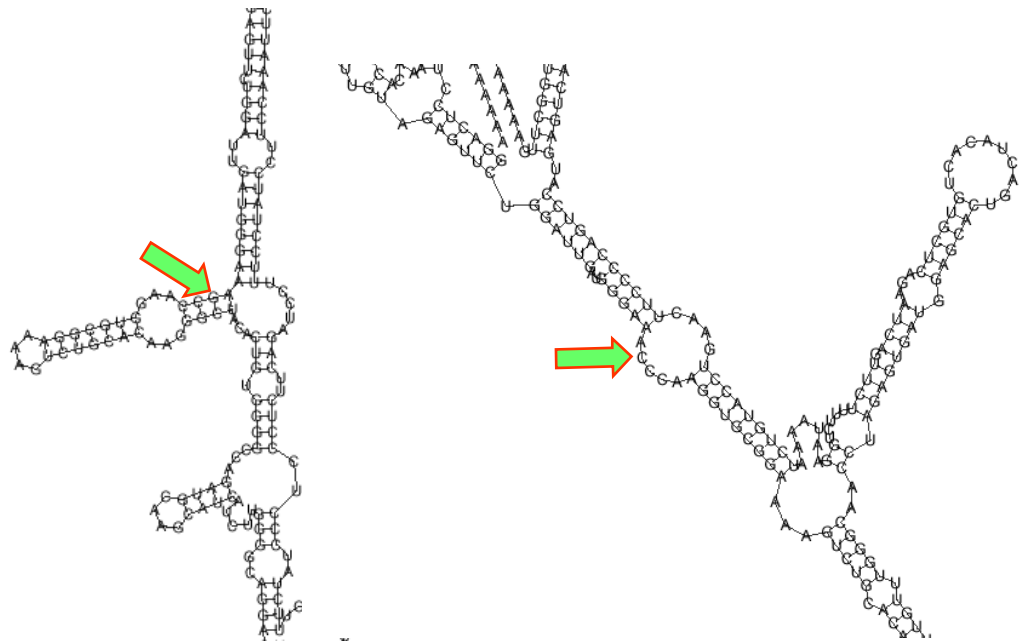
Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F. et al. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364, 937-952.

## Appendice 1

Supplementary Fig. 1 (article 5). A) Illustration of secondary structure changes in *Crp* mRNA between A/J and B6 haplotypes. B) A polymorphism in the 3'UTR changes the secondary structure within a microRNA target motif. C) The secondary structure is also changed at the location of a coding mutation within the Pentraxin family consensus domain.

A



**B****C**

## Appendice 2. Loci de traits psychomoteurs dans les RCS

À l'inverse du *CRF*, le neuropeptide Y (NPY) à un effet anxiolytique (Heilig, 2004; Kask et al., 2002), principalement via les récepteurs Y1 (Kishi et al., 2005) et Y2 (Redrobe, Dumont, Herzog, & Quirion, 2003) de l'amygdale. Ce système module la réponse des surrénales et la tension artérielle, particulièrement en situation de stress (Spinazzi, Andreis, & Nussdorfer, 2005). D'une façon intéressante, les souris KO pour le Y1 (Karl, Burne, & Herzog, 2005) démontrent une hyperactivité dans l'*open-field* et une hypoanxiété (prise de risques accrue) dans le labyrinthe en croix surélevé; ce qui nous rappelle de très près le comportement des SHM dans notre second article. Par ailleurs, un antagoniste du récepteur Y1 prévient la désinhibition locomotrice induite par l'amphétamine, par modulation post synaptique des cibles du système dopaminergique (Kask & Harro, 2000).

Dans les RCS, nous observons un locus de coordination motrice à l'épreuve du cintre dans la région de *npylr* (Tableau V) dans laquelle les allèles de A/J chez les souches BcA81, BcA86, BcA67 sont associés à une piètre performance en comparaison à B6 ( $P < 0.01$ ). Dans la littérature, les transgeniques avec inactivation de *Npylr* montrent une diminution de la réponse pressive, de l'activité motrice et métabolique (Pedrazzini et al., 1998). De plus, NPY augmente l'appétit et l'efficacité énergétique de la thermogénèse (Levine, Jewett, Cleary, Kotz, & Billington, 2004).

Par ailleurs, les déficits d'orientation visuo-motrice en labyrinthe aquatique semblables à ceux observés chez les HBP et LBP (article 1 et 2), ou chez les A/J (article 4), ont été localisés sur le Chr. 8(40-43 cM; LOD = 6.8); pendant les moyennes des souches BcA possèdent des variances inégales ( $F_{11,23} = 5.74$ ,  $P < 0.01$ ), ce qui met en doute la représentativité de ces moyennes. Un plus grand nombre de souches ou d'individus serait nécessaire pour confirmer ce QTL. Néanmoins, cette région contient le gène *Cbln1*, codant la précérébelline 1 (Kavety, Jenkins, Fletcher, Copeland, & Morgan, 1994), précurseur métabolique de la cérébelline (Urade, Oberdick, Molinar-Rode, & Morgan, 1991).



**Tableau V. Loci significatifs des RCS aux épreuves motrice et visuo-spatiale.** Les régions en gras sont confirmées par la distribution des haplotypes des AcB et BcA; dans ce cas, toutes les 35 souches sont utilisées dans le test t.

Phénotypes	Locus (position)	LOD	Valeur P (t-test)	Gènes candidats	Synthénie humaine
<b>Cintre</b>					
Latence de redressement (s.)	D8mit131-D8mit342 (33-34 cM)	6.4	3.1x10 <sup>-3</sup> (dl = 20: BcAs)	<i>Npy1r</i> , récepteur Y1 du Neuropeptide Y (33 cM)	4q31.3-q32
	<b>D11mit135 (17.0 cM)</b>	4.0	<b>2.04x10<sup>-2</sup> (dl= 34)</b>	<i>Adra1b</i> , récepteur Alpha1B adrénergique (19 cM)	10q21
<b>Labyrinthe aquatique</b>					
Latence moyenne aux quatre derniers essais (s.)	<b>D8mit45-D8mit266 (40-43 cM)</b>	6.8 *	<b>1.17x10<sup>-9</sup> (dl = 34, variances inégales)</b>	<i>Cbln1</i> , préprocérébelline 1 (40 cM)	16q12.1
* Régression simple avec les moyennes de chaque souche comme score brut sans tenir compte des écart-types.					

La cérébelline est localisée en abondance dans les cellules de Purkinje du cervelet (Mugnaini & Morgan, 1987). La souris mutante *Rora*<sup>sg</sup> (*staggerer*) se caractérise par la délétion du gène *Rora* (Steinmayr et al., 1998), ce qui cause une dégénérescence des cellules de Purkinje (Sax, Hirano, & Shofer, 1968), des niveaux non détectables de la

cérébelline (Slemmon, Goldowitz, Blacher, & Morgan, 1988), l'insensibilité à la thyroxine (Messer, 1988), et des déficits d'orientation visuo-motrice qui s'apparentent (méthodologie identique) à ceux que nous avons observés (Bensoula et al., 1995).

Enfin, les récepteurs  $\alpha 1B$ , correspondants au QTL sur le Chr 11 murin, sont exprimés dans plusieurs structures cérébrales liées à la motricité, incluant les cellules de Purkinje du cervelet (Papay et al., 2004). Les récepteurs  $\alpha 1$  contrôlent l'activité du SNA, essentielle à la mobilisation motrice. L'inactivation des récepteurs *Adra1b* démontre leur implication dans l'hyperactivité induite par la dopamine (Villegier et al., 2003; Saitoh, Onodera, Morita, Sodeyama, & Kamei, 2002), et dans le métabolisme du glucose par la voie NPY de l'hypothalamus (Burcelin et al., 2004).

**Appendice 3. Article de collaboration (abstract seul)**  
**IMAGERIE DE L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE**  
**DANS LE CERVEAU DES SOURIS**  
**GÉNÉTIQUEMENT HYPERTENDUES À L'AIDE DU**  
**MARQUAGE DE LA CYTOCHROME OXIDASE**

Regional Brain Variations of Cytochrome Oxidase Activity in Spontaneously Hypertensive Mice

C. Strazielle\*, R. Lalonde, S. Thifault, P. Hamet

Manuscrit publié dans la revue *Experimental Brain Research*, 157: 255-264 (2004).

## Abstract

To explore the central disturbances resulting from blood pressure changes, spontaneously hypertensive mice (SHM) were compared to normotensive controls for cytochrome oxidase (CO) activity, an index of oxidative capacity in the central nervous system and a marker of long-term regional brain metabolism and neuronal activity. In all brain areas presenting significant enzymatic variations, only increases in CO activity were found in SHM, particularly the central autonomic network. However, only specific regions were affected, namely the insular cortex and the hypothalamic nuclei principally involved in high-order autonomic control. Altered limbic structures included the lateral septum, various hippocampal subregions, as well as prelimbic cortex. CO activity was also elevated in several forebrain regions, including those directly connected to the limbic system, such as the nucleus accumbens, the claustrum, and dorsomedial and reticular thalamic nuclei, as well as subthalamic and ventrolateral thalamic nuclei. In the brainstem, the only regions affected were the locus coeruleus, site of noradrenergic cell bodies, the trigeminal system, and four interconnected regions: the inferior colliculus, the paramedial reticular formation, the medial vestibular, and the cerebellar fastigial nuclei. These data show that specific regions modulating sympathetic nerve discharge are activated in young adult SHM, possibly due to mitochondrial dysfunction and excitotoxicity.

Keywords: Hypertension - Regional brain metabolism - Limbic system - Hippocampus - Autonomic central system.

## Appendice 4 CURRICULUM VITÆ

### Stéphane Thifault

Adresse: 6815 rue Renoir, Laval, Qc. H7H 1A6

Courriel : steftifo@videotron.ca

### DOSSIER ACADÉMIQUE

**Directeur de thèse:** Pavel Hamet, M.D., Ph.D.  
Chaire de recherche du Canada, Génomique prédictive (CRCHUM)  
Courriel : pavel.hamet@umontreal.ca

**Co-directeur:** Robert Lalonde, Ph.D.  
Professeur de neurobiologie, Université de Rouen, France  
Courriel : robert.lalonde@umontreal.ca

#### A) ÉTUDES UNIVERSITAIRES

<u>Programme</u>	<u>Université</u>	<u>Diplôme</u>	<u>Inscription</u>	<u>Fin</u>
Psychologie	U. de M.	B.Sc.	09-1986	05-1990
Sciences Neurologiques	U. de M.	M.Sc. 08-1996	01-1994	Dépôt 12-1995
Sciences Neurologiques	U. de M.	Ph.D.	01-1996	04-2003 (Interruption)
Sciences Neurologiques	U. de M.	Ph.D.	01-2006 Reprise rédaction	12-2007

#### B) BOURSES ET PRIX OBTENUS PAR VOIE DE CONCOURS:

<b>ORGANISME SUBVENTIONNAIRE</b>	<b>MONTANT OBTENU /ANNÉE</b>	<b>DÉBUT BOURSE MOIS/ANNÉE</b>	<b>FIN BOURSE MOIS/ANNÉE</b>
Bourse de Doctorat CRCHUM	3 000 \$	12/2006	01/2007
Prix meilleure affiche SQHA (travel)	3 000 \$	01/2006	06/2006
Supplément de bourse de voyage SQHA	750 \$	05/2006	06/2006
YI Forum Travel Award (NRFYICRH)	1 500 \$	03/2005	03/2005
Bourse de Doctorat CRCHUM	3 000 \$	12/2006	01/2007
Travel Award CHS/Merck-Frosst & Co	700 \$	10/2001	10/2001
Meilleures affiches doctorat CRCHUM	500 \$	12/2001	12/2001
Fond. Canadienne Maladies du Coeur	19 000\$	08/1997	06/2001
FES-U. de M. (suppléments de bourse)	3 500 \$	08/1998	12/2001

## Publications

### Articles (9)

- 1- **Lalonde, R. et THIFAUULT, S.** (1994). Absence of an association between motor coordination and spatial orientation in Lurcher mutant mice. Behavior Genetics, 24, 497-501.
- 2- **Lalonde, R., Joyal, C. C. et THIFAUULT, S.** (1996). Beam motor learning in Lurcher mutant mice. Behavioural Brain Research, 74, 213-216.
- 3- **THIFAUULT, S., Girouard, N. et Lalonde, R.** (1996). Climbing sensorimotor skills in Lurcher mutant mice. Brain Research Bulletin, 41, (6), 385-390.
- 4- **THIFAUULT, S., Kremerik, P. et Lalonde, R.** (1998). Effects of electrolytic nucleus accumbens lesions on exploration and spatial learning. Archives of Physiology and Biochemistry, 106, (4), 1-11.
- 5- **THIFAUULT, S., Lalonde, R., Joyal, C.C., et Hamet, P.** (1999). Neurobehavioral evaluation of high blood pressure and low blood pressure mice. Psychobiology, 27(3):415-425.
- 6- **THIFAUULT, S., Lalonde, R., Sanon N., et Hamet, P.** (2001). Longitudinal evaluation of anxiety, motor activity, coordination and spatial learning in high and low blood pressure mice. Brain Research, 910(1-2):99-105, Aug 10.
- 7- **THIFAUULT, S., Lalonde, R., Sanon N., et Hamet, P.** (2002). Motor activity and coordination, anxiety and spatial learning in C57BL/6J and A/J mice. Brain Research Bulletin, 58(2) :213-218.
- 8- **Strazielle, C., Lalonde, R., THIFAUULT, S., et Hamet, P.** (2004). Regional Brain Variations of Cytochrome Oxidase Activity in Spontaneously Hypertensive Mice. Experimental Brain Research, 157: 255-264.
- 9- **THIFAUULT, S., Sun, Y., Seda, O., Fortin, A., Skamene, E., Lalonde, R., Tremblay, J. et Hamet, P.** (2008). Genetic determinants of exploration of novel stimuli and stress-induced hypothermia in AcB/BcA recombinant congenic mice and in silico evidence of convergence with cardiovascular candidate genes. Human Molecular Genetics, 17(3), 331-344.

## Conférences

**THIFAUULT, S.** Gestion du stress et données psychophysiologiques récentes. Conférencier invité pour le cours SOI-3010: Gestion en soins infirmiers (Lorraine Bojanowski). (Automne 2000, Hivers 2001): Présentation sur la prévention des effets du stress en collaboration avec Éric Käfer (massothérapeute / psycho-éducateur).

**THIFAUULT, S.** Conférence cerveau et drogues. Conférencier pour la semaine « Cerveau en Tête ». Trois périodes les 15 et 16 Mars 2007. Pensionnat du Saint-Nom-de-Marie (Prof: Chantal Richard - V<sup>e</sup> secondaire).