

Université de Montréal

Déterminants génétiques de la susceptibilité au stress

Par
Pierre Dumas

**Département de Sciences Biomédicales
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 biomédicales**

Septembre 2001

© Pierre Dumas, 2001



W
4
U58
2002
v. 033

**Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures**

Cette thèse intitulée:

**Déterminants génétiques de la susceptibilité au
stress**

Présentée par

Pierre Dumas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Bernard Brais

**président du jury
et représentant du Doyen**

Dr Johanne Tremblay

directeur de recherche

Dr Pavel Hamet

codirecteur de recherche

Dr Damien Labuda

membre du jury

Dr Thomas Hudson

examineur externe

Thèse acceptée le: 18 mars 2002

TABLE DES MATIÈRES

	IV
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	XVIII
REMERCIEMENTS	XXI
ABRÉGÉ	XXIII
MOTS-CLÉS	XXVII
ABSTRACT	XXVIII
KEYWORDS	XXXII

PREMIÈRE PARTIE - REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. CONTRÔLE PHYSIOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE	5
1.1 Rôle du rein.....	5
1.2 Rôle des vaisseaux.....	7
1.3 Rôle du système nerveux autonome.....	8
2. HAUTE PRESSION ARTÉRIELLE: HYPERTENSIONS MENDÉLIENNES ET HYPERTENSION ESSENTIELLE	8
2.1 Hypertensions mendéliennes.....	9
2.2 Hypertension essentielle, étiologie et modèles actuels.....	12
3. GÉNÉTIQUE DE L'HYPERTENSION ESSENTIELLE	14
3.1 Recherche de déterminants génétiques, méthodologie générale appliquée à la recherche en hypertension.....	14
3.2 Modèles animaux.....	22

3.3	Facteurs primaires et secondaires, phénotypes intermédiaires dans l'hypertension.....	29
4.	GÉNÉTIQUE QUANTITATIVE.....	30
4.1	Mesure de l'héritabilité (h^2).....	30
5.	INTERACTION GÈNES × ENVIRONNEMENT. CONCEPT DE SUSCEPTIBILITÉ GÉNÉTIQUE À L'ENVIRONNEMENT DANS L'HYPERTENSION.....	32
6.	STRESS ET MALADIES.....	40
6.1	Introduction, composante psychosomatique des maladies.....	40
6.2	Concept de stress.....	42
7.	LA RÉPONSE DIFFÉRENTIELLE AU STRESS COMME FACTEUR PRÉDICTIF DE L'HYPERTENSION.....	43
7.1	Impact du stress psychosocial sur les maladies cardiovasculaires.....	43
7.2	La stimulation par le froid comme modèle reproductible de stress.....	44
7.3	Stress psychogénique en remplacement du <i>Cold pressor test</i>	45
7.4	Réponse au stress accrue comme outil prédictif d'hypertension.....	47
7.5	Hyperréactivité vasculaire et maladies cardiovasculaires.....	49
7.6	Modèles animaux de la réponse au stress.....	50
7.7	Concept de susceptibilité génétique au stress.....	52
8.	TEMPÉRATURE AMBIANTE ET MODULATION DE LA TEMPÉRATURE CORPORELLE. EFFETS SUR L'INCIDENCE DES	

MALADIES CARDIOVASCULAIRES, ET RÔLE DANS LA RÉPONSE AU STRESS.....	53
8.1 Températures saisonnières, impact sur la mortalité et sur l'incidence des maladies cardiovasculaires.....	54
8.2 Thermosensibilité dans l'hypertension.....	55
8.3 Stress psychogénique et température corporelle.....	56
9. GÈNES DE STRESS ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	57
9.1 Expression tissu-spécifique des gènes de stress <i>in vivo</i> , interaction et coopération entre la réponse au stress cellulaire et "générale" de l'organisme.....	58
9.2 Protéines de stress et maladies.....	60
9.3 Protéines de stress et hypertension.....	61
9.4 Importance clinique de la réponse des protéines de stress.....	63
10. LIGNÉES RECOMBINANTES CONSANGUINES.....	64
10.1 Lignées recombinantes consanguines chez le rat, lignées B×H/H×B.....	67
10.2 Lignées congéniques construites entre BN.Lx et SHR.....	79
10.3 Considérations statistiques.....	81
 DEUXIÈME PARTIE - PRÉSENTATION DES MANUSCRITS	
INTRODUCTION ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	83
11. IDENTIFICATION ET LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DES DÉTERMINANTS ÉCOGÉNÉTIQUES DE L'EXCRÉTION DES ÉLECTROLYTES URINAIRES.....	91

	VII
Abrégé.....	92
Introduction.....	94
Méthodes.....	96
Animaux	
Calcul de l'héritabilité (h^2) de l'excrétion de sodium	
Électrolytes urinaires à jeun chez 26 RIS	
Analyses génétiques	
Cartographie des locus responsables de l'excrétion des électrolytes urinaires	
Résultats.....	99
Excrétion urinaire du sodium et du potassium à l'équilibre et lors du jeûne	
Profil de distribution de l'excrétion des électrolytes lors du jeûne chez les RIS	
Discussion.....	103
Références.....	107
Remerciements.....	116
Abréviations.....	117
12. PARTICIPATION DE LOCUS AUTOSOMAUx ET DU CHROMOSOME	
 Y À LA RÉPONSE AU STRESS CHEZ LE RAT.....	128
Abrégé.....	129
Introduction.....	130
Méthodes.....	131
Rats	
Réponse thermique au stress	
Analyse génétique	
TGS	
Statistiques	
Résultats.....	134

TGS	
Impact du chr 10, congéniques	
QTLs associés négativement	
Modulation de la réponse au stress chez des lignées consomiques pour le chromosome Y	
Contribution relative des QTLs significatifs sur T20	
Discussion.....	138
Références.....	140
Remerciements.....	145
Abréviations.....	146
13. LOCALISATION DE LOCUS RESPONSABLES DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES GÈNES DE STRESS CHEZ DES LIGNÉES DE RATS RECOMBINANTES CONSANGUINES.....	158
Abrégé.....	159
Introduction.....	161
Méthode.....	163
Lignées RIS originant du croisement BN.Lx × SHR	
Expression des <i>hsp</i> chez les lignées RIS	
Localisation des QTLs responsables de l'expression des <i>hsp</i>	
Statistiques	
Analyse du polymorphisme de conformation simple brin et localisation chromosomique de <i>hstf1</i> chez les lignées RIS	
Séquençage direct de <i>hstf1</i>	
Résultats.....	166
Profils de distribution de l'expression des <i>hsp</i> chez les lignées RIS	
QTLs responsables de l'expression des ARNm de <i>hsp</i> chez les lignées RIS	

Localisation de *hstf1* sur le chromosome 7

Discussion.....	168
Références.....	170
Remerciements.....	175

14. ÉTUDES LONGITUDINALES CHEZ LES LIGNÉES RECOMBINANTES CONSANGUINES, UN OUTIL POUR LA RECHERCHE DES CIBLES DE L'HYPERTENSION.....	186
Contribution au travail.....	188
Abrégé.....	189
Introduction.....	190
Méthode.....	192
Résultats.....	193
Discussion.....	195
Références.....	197
Remerciements.....	202

TROISIÈME PARTIE - DISCUSSION GÉNÉRALE.....216

15. INTERACTION ENTRE LE SODIUM ET LE STRESS. Modulation de la pression artérielle et des paramètres cardiovasculaires.....	222
15.1 Modulation de la température corporelle et de la réponse thermique au stress d'immobilisation par le sodium et le calcium.....	223
15.2 Contribution du stress et du sodium à la pression artérielle.....	225
15.3 Mécanismes possibles.....	228

16. DIMORPHISME SEXUEL DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET DE LA RÉPONSE AU STRESS.....	230
17. IMPORTANCE DES ÉTUDES LONGITUDINALES POUR DÉTER- MINER LE LIEN DE CAUSALITÉ ENTRE UN QTL ET UNE PATHOLOGIE.....	236
18. ORIGINALITÉ ET IMPORTANCE DES RÉSULTATS.....	239
19. CONCLUSIONS ET COMMENTAIRES GÉNÉRAUX.....	247
BIBLIOGRAPHIE.....	251
ANNEXE 1 - LISTE DES PUBLICATIONS ET DES PRÉSENTATIONS.....	298
ANNEXE 2 - AUTORISATION DES COAUTEURS POUR LE MICRO- FILMAGE ET LA REPRODUCTION DES MANUSCRITS INCLUS DANS LA THÈSE.....	305

LISTE DES FIGURES

PREMIÈRE PARTIE - REVUE DE LA LITTÉRATURE

FIGURE I

Gènes et environnement dans l'hypertension.....34

FIGURE II

Interactions phénotypes-génotypes.....37

FIGURE III

Construction schématique de lignées recombinantes consanguines.....72

DEUXIÈME PARTIE - PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

FIGURE IV

Réponse thermique au stress d'immobilisation.....85

IDENTIFICATION ET LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DES DÉTERMINANTS ÉCOGÉNÉTIQUES DE L'EXCRÉTION DES ÉLECTROLYTES URINAIRES

FIGURE 1

a. Strain distribution pattern of Na excretion in a RIS subset of 10 strains under normal diet and fasting conditions. *b.* Variance of Na excretion in the subset of 10 RIS tested.....119

FIGURE 2

Strain distribution pattern of BP-modulating electrolyte excretion in RIS under fasting.

a. Strain distribution pattern of Na excretion in 26 RIS.....122

b. Strain distribution pattern of K excretion in 26 RIS.....123

c. Strain distribution pattern of Ca excretion in 21 RIS.....124

d. Strain distribution pattern of the Na/K excretion ratio in 26 RIS.....125

FIGURE 3

LOD plot for K excretion measured in a set of 26 RIS under fasting conditions.....126

PARTICIPATION DE LOCUS AUTOSOMAUX ET DU CHROMOSOME Y À LA RÉPONSE AU STRESS CHEZ LE RAT

FIGURE 1

Body temperature during immobilization stress in BN.Lx and
SHR strains.....148

FIGURE 2

Strain distribution pattern of T20 (mean \pm SEM) measured under normal Na
intake in 25 RIS and under high-Na intake in 24 RIS.....150

FIGURE 3

QTL plot for T20 measured in 21 RIS under normal and high Na intake.....152

FIGURE 4

Impact of BB genotype at *Myh3* marker on stress response for SHR.BN-
RN010 congenic strain.....154

FIGURE 5

Impact of the Y Chr on the stress response in RIS and in WKY.SHR-Y and
SHR.WKY-Y consomic strains.....156

LOCALISATION DE LOCUS RESPONSABLES DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES GÈNES DE STRESS CHEZ DES LIGNÉES DE RATS RECOMBINANTES CONSANGUINES

FIGURE 1

Strain distribution pattern of *hsp* expression in the RIS adrenal (a).....179
heart (b)..... 180
and kidney (c)..... 181

FIGURE 2

Partial linkage map of rat chromosome 4.....182

FIGURE 3

a. Autoradiograms of SSCP obtained after PCR with the use of HSF1-1419
and HSF1-1624; b. Chromosomal localization of *hstf1* on rat
chromosome 7.....184

**ÉTUDES LONGITUDINALES CHEZ LES LIGNÉES RECOMBINANTES
CONSANGUINES, UN OUTIL POUR LA RECHERCHE DES
DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DES ATTEINTES AUX ORGANES
CIBLES DE L'HYPERTENSION**

FIGURE 1

Distribution of newborn (A) and adult (B) relative kidney weight values in the recombinant inbred strain (RIS).....206

FIGURE 2

Correlation between newborn and adult relative kidney weight (KW/BW) in the recombinant inbred strain (RIS).....208

FIGURE 3

Correlation between systolic blood pressure (SBP) and adult relative kidney weight (KW/BW) in the recombinant inbred strain (RIS).....210

FIGURE 4

Quantitative trait locus of adult relative kidney weight (KW/BW) and systolic blood pressure (SBP) on rat chromosome 1.....212

FIGURE 5

Distribution of the difference between newborn and adult kidney weight (KW/BW) values in the recombinant inbred strain (RIS).....214

TROISIÈME PARTIE - DISCUSSION GÉNÉRALE

FIGURE V

Pharmacogénétique, pression artérielle systolique chez SHR par télémétrie.....245

LISTE DES TABLEAUX

PREMIÈRE PARTIE - REVUE DE LA LITTÉRATURE

TABLEAU I

Hypertension essentielle, sommaire des résultats des études d'association et de liaison effectuées chez l'humain à ce jour.....18

TABLEAU II

Hypertension essentielle, sommaire des résultats des études de liaisons effectuées chez le rat à ce jour.....24

TABLEAU III

Construction des lignées B×H/H×B.....70

TABLEAU IV

Progrès scientifiques accomplis grâce aux lignées recombinantes consanguines (RIS) B×H/H×B.....75

DEUXIÈME PARTIE - PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

TABLEAU V

Stratégie employée pour la recherche des déterminants génétiques de la susceptibilité au stress. Utilisation de phénotypes intermédiaires modulés par l'environnement.....85

IDENTIFICATION ET LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DES DÉTERMINANTS ÉCOGÉNÉTIQUES DE L'EXCRÉTION DES ÉLECTROLYTES URINAIRES

TABLEAU 1

Quantitative trait loci of urinary electrolytes excretion.....118

PARTICIPATION DE LOCUS AUTOSOMAUX ET DU CHROMOSOME Y À LA RÉPONSE AU STRESS CHEZ LE RAT

TABLEAU 1

T20 values resulting from the genotypic combination of *Myh3* (QTL on Chr 10) and *Lsn2* (QTL on Chr 12) loci: interaction between the 2 loci.....147

LOCALISATION DE LOCUS RESPONSABLES DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES GÈNES DE STRESS CHEZ DES LIGNÉES DE RATS RECOMBINANTES CONSANGUINES

TABLEAU 1

Total genome scan of <i>hsp</i> expression in the adrenal, heart and kidney of RIS	176
--	-----

ÉTUDES LONGITUDINALES CHEZ LES LIGNÉES RECOMBINANTES CONSANGUINES, UN OUTIL POUR LA RECHERCHE DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DES ATTEINTES AUX ORGANES CIBLES DE L'HYPERTENSION

TABLEAU 1

Relative kidney weight and blood pressure in newborn and adult progenitor strains.....	203
--	-----

TABLEAU 2

Total genome search: suggestive quantitative trait loci (QTL) of newborn and adult relative kidney weight (KW/BW).....	204
--	-----

TABLEAU 3

Total genome search: suggestive quantitative trait loci (QTL) of the difference (Δ) between newborn and adult relative kidney weight.....	205
--	-----

TROISIÈME PARTIE - DISCUSSION GÉNÉRALE

TABLEAU VI

QTL de quelques phénotypes de la réponse au stress et du poids relatif du rein (en fonction de l'âge) chez les lignées RIS.....	219
---	-----

TABLEAU VII

Approche systématique proposée pour la dissection génétique d'une maladie complexe.....	241
---	-----

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADH	<i>Anti-Diuretic Hormone</i> , hormone anti-diurétique
ANF	<i>Atrial Natriuretic Facteur</i> , Facteur natriurétique des oreillettes
B×H	Souches recombinantes consanguines provenant d'un croisement entre une femelle BN.Lx et un mâle SHR
BN.Lx	Rat Brown-Norway (BN) congénique pour une région du chromosome 8 contenant le locus <i>Lx</i>
Ca	Calcium
Chr(s)	Chromosome(s)
cM	Centimorgan
h²	Héritabilité
H×B	Souches recombinantes consanguines provenant d'un croisement entre une femelle SHR et un mâle BN.Lx
HSP	<i>Heat Stress Protein</i> , protéines de choc thermiques
hstf	<i>Heat Shock Transcription Factor</i> , facteur de transcription des protéines de choc thermiques
K	Potassium
Na	Sodium
PA	Pression Artérielle
QTL(s)	<i>Quantitative Trait Locus</i> , locus de trait quantitatif
RAA	<i>Renin-Angiotensin Aldosterone system</i> , système rénine-angiotensine aldostérone
RIS	<i>Recombinant Inbred Strains</i> , lignées recombinantes consanguines
RM	Récepteur aux Minéralocorticoïdes
RN_o10	Chromosome 10 de <i>Rattus norvegicus</i>
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i> , Rat spontanément hypertendu

SHR.BN-RNo10	Lignée SHR congénique où une partie du chromosome 10 provient d'un rat BN normotendu
SHR.BN-Y	Lignée SHR consomique où le chromosome Y provient d'un mâle BN normotendu
SHR.WKY-Y	Lignée SHR consomique où le chromosome Y provient d'un mâle WKY normotendu
TGS	<i>Total Genome Scan</i> , Recherche par le génome total
WKY.SHR-Y	Lignée WKY consomique où le chromosome Y provient d'un mâle SHR spontanément hypertendu
WKY	Rat Wistar-Kyoto normotendu
Ys ou SHR-Y	Chromosome Y provenant d'un mâle SHR

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement mentionner la contribution déterminante et sans doute ignorée du Docteur Claude Petitlerc qui me suggéra un jour d'aller voir le Docteur Pavel Hamet à l'Institut de Recherche Clinique pour poursuivre mes études graduées (Il y a de cela quelque temps déjà...).

La suite est maintenant connue.

Cette thèse n'aurait pu être rédigée sans le soutien et les encouragements de plusieurs personnes. Il me faut souligner l'aide précieuse et l'amitié des membres des équipes de recherche des laboratoires de Biologie Cellulaire de l'Hypertension (Dr.Tremblay) et de Médecine Moléculaire (Dr. Hamet) de l'Hôtel-Dieu de Montréal: Caroline Koch, Sandra Tremblay, Nicolas Solban, David Hum, Sylvie Richard, François Francoeur, Richard Desjardins; Gilles Corbeil, Benoît Deslauriers, Sonia Girouard, Francis Gossard, Dewen Kong, Yulin Sun, Bun Seng-Tea. Un merci tout particulier au coeur de ces équipes sans qui les deux labos ne seraient pas les mêmes: Suzanne (Suz) Cossette, Carole Long, Régis Tremblay et Monique Poirier. Merci aussi à Julie Bérubé du laboratoire de Denis DeBlois. Merci aux collègues et amis pour les discussions, les sorties et les souvenirs de voyage: France Gagnon, Zdenka Pausova, Jaroslav Kunes, Pierre Moreau, N'Guessan Kouame, Manon Bernard, Sergei Orlov, Stéphane Thifault, Jean Labrecque, Christine Denis, Nalini Vadappali, Denis DeBlois et Jacinthe Lemay; Dominic Devost, Sylvain Foisy, Nina N'Diaye, Sylvie Oble.

Un apprentissage de qualité ne serait pas complet sans l'interaction avec les chercheurs invités étrangers. Merci aux Professeurs Francis Bayard et Noboru Kukuda; aux Post-

doc: Emmanuel Teiger, Nathalie Thorin-Trescases, Tian-Tian Wang, Hong-Peng Jia, Yasuhiro Ono, Rocio Sanchez.

Comment aurais-je pu publier mes manuscrits sans l'aide de M. Marc Dumont pour les statistiques, Josée Baker et Ginette Dignard pour le secrétariat et Ovid Da Silva pour la révision (mon anglais s'est d'ailleurs amélioré depuis). Mes recherches auraient été impossibles sans Suzanne Carioto et son équipe de l'animalerie, de même que sans l'aide précieuse de France Robin, Bruno Lachance et Carole Brabant. Une pensée toute particulière pour le sourire et la gentillesse des infirmières Sylvie Blaquièrre et Danielle de Guise.

Mon projet (et le Dr Hamet) m'a donné la chance de voyager. Merci aux Professeurs Vladimir Kren et Drahomira Krenova de m'avoir accueilli à Prague et guidé dans cette nouvelle ville. Merci à Lucie Soltysova, Ales Panczak, Rudolf Kasperek et Michal Pravenec pour leur amitié et leur gentillesse.

Merci au Docteur Johanne Tremblay et au Docteur Pavel Hamet pour avoir cru en moi (ils ont la foi, c'est certain!). Merci pour leur patience. Merci pour l'environnement de qualité, stimulant intellectuellement. Merci de m'avoir montré Prague et de m'avoir confié un projet aussi ambitieux.

Merci à mes parents Hélène et Charles sans qui cette thèse n'aurait jamais abouti et qui vont enfin pouvoir dormir...

Merci à Carrie. Elle sait pourquoi.

Finalement, Merci à l'outil essentiel de ce travail, les rats, que j'ai fait beaucoup souffrir et qui me l'ont bien rendu.

ABRÉGÉ

La détermination des bases génétiques de maladies complexes comme le diabète, le cancer ou l'hypertension essentielle pose plusieurs défis aux chercheurs. En effet, le tableau clinique de chacune de ces pathologies est variable, les patients ne se présentant pas tous avec la même maladie. La pénétrance et la sévérité variables de ces maladies traduit l'implication de plusieurs systèmes physiologiques, de même que l'implication probable de plusieurs gènes morbides simultanément.

On définit l'hypertension essentielle par défaut comme étant une haute pression artérielle se développant au cours des ans et n'ayant pas de cause primaire (i.e. monogénique). Le diagnostic positif survient lorsque la pression dépasse 134/90 mm Hg de pression systolique et diastolique, respectivement. La pression artérielle étant un continuum, l'hypertension ne représente que la partie supérieure de la courbe de pression. Cette définition explique la sévérité variable de la maladie, un patient étant qualifié d'hypertendu avec une pression de 140/95 mm Hg aussi bien qu'avec une pression de 220/100 mm Hg. La pénétrance inégale s'explique par le fait que l'hypertension essentielle est une maladie polygénique avec une forte composante environnementale. On estime qu'il y aurait de 5 - 7 gènes majeurs expliquant 30% de la variance de la pression artérielle, alors que l'environnement serait responsable des 70% restant.

L'identification des gènes morbides est en cours. Chez l'homme on effectue principalement des études d'associations en ciblant des gènes candidats du système cardiovasculaire, alors que les études animales permettent la création de croisements ségréants utilisant des souches génétiquement hypertendues. L'emploi de croisements ségréants utilisant des lignées de rats génétiquement hypertendus permet de disséquer l'hypertension en ses composants possiblement monogéniques. Ainsi, plusieurs travaux ont permis la découverte de locus de traits quantitatifs (QTLs) responsables d'une partie de la variance de la pression artérielle dans les croisements étudiés. Cependant, la pression artérielle reste un phénotype trop "général", influencé beaucoup de gènes, ce qui se traduit

par la découverte d'une quantité importante de QTLs sur tous les chromosomes du génome du rat. Il y a donc un besoin de disséquer l'hypertension en phénotypes intermédiaires possiblement monogéniques qui permettraient de départager les "vrais" QTLs du "bruit de fond".

Nous nous sommes proposés de caractériser en partie la composante environnementale de la maladie, puisqu'elle explique 70% de la variance de la pression artérielle. Nous avons proposé qu'il existe des susceptibilités environnementales indépendantes de l'hypertension mais pouvant interagir avec le système cardiovasculaire pour amplifier le phénotype. Il existerait donc des gènes de susceptibilités environnementales, mais seulement en présence d'un environnement délétère l'effet néfaste de ces gènes se manifesterait.

Dans cette thèse, nous avons tenté de caractériser les bases génétiques de la susceptibilité au stress dans l'hypertension. Nous avons utilisé un jeu de lignées recombinantes consanguines (RIS) construites entre le rat spontanément hypertendu (SHR) et le rat normotendu BN.Lx. Grâce à ces lignées ségrégant, nous avons montré qu'un changement d'environnement est nécessaire pour augmenter la contribution génétique du trait mesuré (i.e. il faut trouver les conditions permettant d'observer l'effet des gènes de susceptibilité). En effet, un jeûne de 36 heures, considéré comme un stress, nous a permis de découvrir des QTLs responsables de l'excrétion urinaire du sodium (Na), du potassium (K), du calcium ainsi que du rapport Na/K urinaire expliquant chacun entre 60 et 80% de la variance de leur trait respectif.

Le rat SHR est sensible au stress, et présente une augmentation accrue de la température corporelle lors d'un stress d'immobilisation par rapport aux animaux témoins. Nous avons trouvé 2 locus positivement associés à cette réponse thermique au stress d'immobilisation. De plus, la réponse est augmentée par la diète à forte teneur en sel. Nous

avons aussi trouvé les déterminants génétiques de la réponse des gènes de stress (*hsp*) suite à l'immobilisation, et proposé le facteur de transcription des gènes de stress (*hstf1*) comme candidat sérieux pour la réponse altérée des gènes de stress chez SHR. Dans ces trois études, le chromosome Y d'origine SHR amplifia les phénotypes, suggérant qu'un ou plusieurs gènes présents sur le chromosome Y ou en interaction avec celui-ci contribuent à la réponse pathologique.

Finalement, nous montrons que l'étude des déterminants génétiques de maladies complexes peut bénéficier de l'emploi de lignées RIS pour des études longitudinales. Nous avons montré qu'il existe des locus responsables du poids du rein néonatal, d'autres impliqués dans la détermination du poids du rein adulte alors que d'autres modulent le poids du rein à tous les âges.

Nous proposons donc une approche systématique pour la détermination des QTLs de susceptibilités environnementales. Celle-ci repose sur le choix de phénotypes bien caractérisés, et sur la mesure systématique de ceux-ci dans différents environnements et à divers âges de façon à trouver tous les QTLs responsables, et afin de mieux caractériser la séquence des événements qui conduisent à la pathologie. Nous espérons ainsi avoir pu contribuer à la découverte future des gènes de la susceptibilité au stress.

MOTS-CLÉS

Lignées recombinantes consanguines; gène; liaison; locus de trait quantitatif; SHR; rat; chromosome Y; hypertension; stress; environnement; susceptibilité; température; *hsp*; électrolyte; rein; organe cible;

ABSTRACT

The discovery of the genetic determinants of complex diseases such as diabetes, cancer or essential hypertension poses many challenges to the researcher. The clinical picture within each disease is highly variable, the patients displaying a wide range of more or less severe symptoms. This variable penetrance and severity illustrate the numerous physiological systems involved, as well as the probable simultaneous involvement of many morbid genes.

Essential hypertension is defined by a gradual appearance of high blood pressure over time with no obvious underlying cause (in contrast to monogenic hypertension). The diagnosis is established when the ratio of the systolic over diastolic blood pressure is equal or higher than 140 over 90 mm of Hg. Being a continuum, hypertension represents only the right side of the blood pressure distribution. This definition explains the variation found in the disease state: one patient can have a blood pressure of 140/95 mm of Hg and another a blood pressure of 220/100 mm of Hg, both will be considered "hypertensive" regardless of the severity. The unequal penetrance of essential hypertension is explained by its polygenic nature and the strong environmental component modulating the disease. It is estimated that 30% of the blood pressure variance is due to 5 - 7 "major" genes, the environment being responsible for the 70% left.

The search for the causal genes is ongoing. Association studies in humans are aimed at candidate genes of the cardiovascular system whereas animal studies in rats use the "blind" genome scan approach in crosses of genetic models of hypertension. Segregating crosses allow to dissect the disease, possibly in its monogenic components. Many QTLs have been unveiled, each explaining some of the blood pressure variance. However, QTLs have been found on almost every rat chromosome, suggesting a need to better define the disease, "blood pressure" *per se* being not accurate enough. Thus, there is a need to dissect the disease in intermediate phenotypes that could be linked to specific QTLs, allowing to distinguish the "true" from the spurious QTLs.

In this work, we have chosen to characterize the environmental susceptibility of the disease since it explains 70 % of the blood pressure variance. We have hypothesized that environmental susceptibilities independent of hypertension exist that can sometimes contribute to high blood pressure, thereby amplifying the disease. The negative impact of susceptible genes would therefore manifest itself only in a deleterious environment for which the genes are susceptible.

In this thesis, we have tried to characterize the genetic basis of the stress susceptibility in hypertension as an example of environmental susceptibility impacting on blood pressure. We have used a panel of recombinant inbred rat strains derived from the spontaneously hypertensive (SHR) and Brown-Norway (BN.Lx) normotensive rats. These strains allowed us to demonstrate the importance to challenge the environment in order to evaluate the contribution of susceptible genes (i.e. the right conditions have to be determined in order to observe the impact of susceptibility genes). For instance, a 36 hour fast enabled us to see QTLs responsible for the urinary excretion of sodium (Na), potassium (K), calcium as well as of the Na/K ratio explaining each between 60 and 80% of the variance of their respective traits.

The SHR is sensitive to stress, displaying an increased body temperature response to immobilization as compared to the control animals. We have found 2 loci positively associated with the thermal response to immobilization in SHR. The thermal response to stress was also found to be enhanced by a high Na diet. Furthermore, we have studied the genetic determinants of the stress genes expression (*hsps*) following immobilization. We have found many QTLs and suggested one of them bearing the heat shock transcription factor (*hstf1*), having a pleiotropic effect on expression of several different *hsp* in three different organs. Finally, we have shown that the Y chromosome of hypertensive origin enhances the

to stress, suggesting that genes on the hypertensive Y chromosome or interacting with the Y chromosome are involved in the pathogenesis of the enhanced stress response of SHR.

Finally, we have demonstrated the usefulness of recombinant inbred strains as a tool for longitudinal studies of complex traits. We have demonstrated that loci are involved in the determination of neonatal but not adult kidney weight, others in adult but not neonatal kidney weight, and others impacting kidney weight throughout life. RIS are thus essential to study time, an essential vector to consider when one wants to understand the pathogenesis of any disease.

We have therefore proposed a systematic approach to help find the QTLs of environmental susceptibilities. A specific well-defined phenotype measured on different environments at different ages may help unveil all the genes involved, and the sequence of their implication in the disease. We have hopefully contributed by this work to the future discovery of the genes impacting the susceptibility to stress.

KEYWORDS

Recombinant inbred strains; gene; linkage; quantitative trait loci; SHR; rat; Y chromosome; hypertension; stress; environment; susceptibility; temperature; *hsp*; electrolyte; kidney; target organ;

AVANT-PROPOS

Claude Bernard (1966) en son temps avait compris l'importance de la vivisection et des autres techniques d'intervention pour comprendre le fonctionnement du vivant:

"On ne pourra arriver à connaître les lois et les propriétés de la matière vivante qu'en disloquant les organismes vivants pour s'introduire dans leur milieu intérieur".

Claude Bernard (1813 - 1878)

C'est ainsi que, graduellement, la physiologie est née de l'anatomie. Depuis, la "biologie moléculaire" est apparue, reléguant la physiologie classique au second plan, et maintenant, avec le premier brouillon de la séquence du génome humain complété nous sommes entrés dans l'ère de la génomique! Au delà de ces querelles de clochers pour savoir quelle est LA vraie science du vivant, la question fondamentale reste la même: comment expliquer la complexité du vivant avec les pièces détachées obtenues des diverses sciences biologiques?

Le danger de cette nouvelle discipline qu'est la génomique est encore de vouloir tout expliquer à partir des morceaux que l'on a devant les yeux, et surtout de croire que tout peut être expliqué par ces morceaux. Ainsi, la séquence complète du génome devrait nous donner la solution à tous ces problèmes et expliquer toutes les maladies!

La présente thèse se propose donc d'étudier l'impact de l'environnement sur une maladie commune, l'hypertension essentielle. Ainsi, nous voulons montrer qu'il existe des susceptibilités environnementales d'origine génétique indépendantes mais pouvant moduler la maladie, et nous nous proposons de trouver les déterminants génétiques de quelques-une. Par le fait même, nous montrerons le danger déterministe qui guette la génomique: en effet, en exposant les interactions complexes entre l'environnement et les gènes nous voulons montrer que l'étude du génome pour expliquer "la Vie" ne consiste pas seulement à répertorier tous les gènes et à faire la somme de tous les métabolismes.

Considérer l'environnement comme étant en interaction avec les organismes et non seulement comme une influence extérieure illustrera notre préoccupation qui est de toujours garder l'esprit ouvert à de nouveaux concepts ou modèles.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. CONTRÔLE PHYSIOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE

Nous reverrons ici rapidement les mécanismes généraux de contrôle de la pression artérielle chez l'Homme. Il s'agit ici uniquement d'introduire certains concepts que nous croyons nécessaires pour la compréhension des buts de ce travail. Cet aperçu ne se veut pas complet et exhaustif, et nous prions les lecteurs de bien vouloir se référer aux articles de revues pour une description plus complète des mécanismes régissant la pression artérielle.

La pression artérielle est la résultante de la puissance d'éjection cardiaque multipliée par la résistance périphérique (système artériel), c'est la loi de Starling. La pression artérielle est donc un phénotype quantitatif continu dont seules les valeurs de l'extrême droite de la courbe de distribution sont considérées comme pathologiques, ce qui faisait dire à Sir George Pickering que l'hypertension essentielle n'était pas une pathologie en soi. L'hypertension artérielle doit néanmoins être considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire important prédisposant aux accidents vasculaires cérébraux, cardiaques et rénaux. Cette observation épidémiologique est aussi valable dans les pays en voie de développement depuis peu.

Le contrôle de l'homéostasie du flot sanguin, de la résistance vasculaire périphérique et ultimement de la pression sanguine requiert la participation de plusieurs organes du système cardiovasculaire. Nous avons choisi d'étudier plus spécifiquement le rôle du rein, des vaisseaux et du système nerveux autonome dans la régulation de la tension.

1.1 Rôle du rein (Guyton *et al.* 1995)

Une caractéristique remarquable et essentielle de l'organisme est sa capacité à maintenir constant le volume sanguin (autour de 5 L) indépendamment de l'apport liquidien. En effet, lorsque le volume sanguin augmente, le débit sanguin et la pression

artérielle augmentent proportionnellement. Cette augmentation de pression va alors induire une augmentation de production d'urine par les reins de façon à rétablir le volume. Mais l'augmentation de pression peut être due aussi à une augmentation de la pression osmotique des liquides extracellulaires. La concentration de l'ion sodium détermine plus de 95% de la pression osmotique. On assimile ainsi les variations d'osmolarité du sang aux variations de concentrations de sodium.

Plusieurs hormones sont impliquées dans ces mécanismes de rétroactions du contrôle du volume et du sodium de l'organisme:

Vasopressine (antidiuretic hormone, ADH) (Gavras et Gavras 1995) Cette hormone, sécrétée par la région supraoptique de l'hypothalamus (barorécepteurs et osmorécepteurs sensibles au sodium et au chlore), permet la réabsorption d'eau par les tubules distaux et collecteurs. Elle permet ainsi de diluer le sodium extracellulaire et de concentrer l'urine en sodium. Lorsque le milieu extracellulaire devient hypo-osmotique, la sécrétion de vasopressine est supprimée, favorisant la perte d'eau et le retour à un volume sanguin et extracellulaire normal.

Système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA) (Sealey et Laragh 1995). Le système RAA permet de maintenir la pression artérielle lors de baisses rapides de pression lorsque les baro-récepteurs détectent une chute de tension (voir section 1.3). Cependant, le système RAA permet aussi la régulation à long terme de la balance des fluides et du sodium de l'organisme. Une baisse de pression artérielle (PA) ou de sodium va être détectée par le rein qui sécrètera la rénine. La rénine clivera l'angiotensinogène pour produire l'angiotensine I qui sera à son tour clivée pour donner l'angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur et aussi un facteur de croissance pour les cellules de muscle lisse. Finalement, l'angiotensine II va stimuler la sécrétion d'aldostérone qui stimulera la réabsorption de sodium au niveau des tubules rénaux.

Facteur natriurétique des oreillettes (Atrial Natriuretic Factor, ANF) (de Bold *et al.* 2001). Lors d'une modification du débit cardiaque consécutif à une augmentation de volume ou de pression, les oreillettes du coeur libèrent l'ANF suite à la stimulation de mécanorécepteurs. Ce peptide induit une diurèse et une natriurèse au niveau des glomérules et des tubules rénaux. Dans l'insuffisance cardiaque, le système des peptides natriurétiques est bien connu pour son rôle vasodilatateur protecteur qui s'oppose à l'action du système RAA afin de protéger le muscle cardiaque (Nicholls *et al.* 1996).

1.2 Rôle des vaisseaux (Mulvany 1987, Hamet 1995, Diez *et al.* 1998)

Les vaisseaux sanguins et plus particulièrement les artères de résistance sont les effecteurs sur lesquels ces hormones agissent. Ainsi, une contractilité anormalement élevée due à une hypersensibilité aux agonistes comme l'angiotensine II aura pour effet d'amplifier la réponse normale de l'organisme et de provoquer l'hypertension. Inversement, tout mécanisme vasodilatateur anormal pourra être responsable d'une hypertension. Une croissance accrue des cellules de muscle lisse responsable de la contractilité vasculaire pourrait aussi expliquer l'établissement graduel de l'hypertension.

Finalement, mentionons le cas particulier de l'activité de l'ANF qui semble accrue dans l'hypertension. Cette augmentation de l'activité d'un système vasodilatateur pourrait être responsable de l'hypertension à l'âge adulte. En effet, on peut imaginer que l'organisme va lutter pendant des années pour contrer l'hyperactivité de ce système, provoquant ainsi des changements permanents dans la vasculature. Avec l'âge, le débit cardiaque perd de son importance au profit de la résistance vasculaire périphérique dans le contrôle de la PA. Ainsi, la surstimulation d'un système constricteur en réponse à une surdilatation pendant des années pourrait conduire à l'hypertension. Cet exemple cherche à montrer les difficultés sous-jacentes à l'étude des bases génétiques de l'hypertension, et l'importance d'étudier le développement de la maladie.

1.3 Rôle du système nerveux autonome (Wyss et Carlson 2001)

Le système nerveux autonome exerce son action "directement" sur le système cardiovasculaire par un réseau de fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques qui innervent le coeur, les artères et les veines, et "indirectement" en stimulant la sécrétion de catécholamines dans les médullosurrénales qui seront libérées dans la circulation. Lors du fonctionnement normal, la pression artérielle est maintenue constante par une voie réflexe: Les changements de pressions soudains (augmentation ou diminution) seront perçus par les barorécepteurs cardiaques et vasculaires. Après intégration de l'information par le système nerveux central au niveau du tronc cérébral, une réponse inhibitrice ou activatrice des fibres efférentes sympathiques permettra de rétablir la pression.

Ce résumé succinct nous permet de définir la notion de seuil (*set-point*) de pression artérielle. En effet, si l'organisme réagit aux variations de pression pour s'ajuster et revenir à une pression "normale", cela implique la reconnaissance par l'organisme d'une valeur de pression optimale. Cette valeur pourra varier à l'intérieur de certaines limites normales au-delà desquelles on parlera d'*hypo-* ou d'*hyper-*tension.

2. HAUTE PRESSION ARTÉRIELLE: HYPERTENSIONS MENDÉLIENNES ET HYPERTENSION ESSENTIELLE

La pression artérielle est un phénotype continu, ce qui démontre sa nature polygénique. À l'intérieur de ce continuum, on a défini un seuil au-delà duquel les individus sont considérés comme hypertendus (134/90 mm Hg de pression systolique et diastolique respectivement) (Pickering 1995). La notion d'hypertension pourra donc refléter une haute pression proche de ce seuil aussi bien qu'une hypertension aggravée nécessitant l'hospitalisation. Si l'origine génétique de la maladie ne fait aucun doute étant

donné la composante familiale de la majorité des cas, la pénétrance et la sévérité variable de la maladie compliquent l'étude de ses bases génétiques. Notons que Mongeau et Biron (1981) ont bien distingué entre la contribution héréditaire (60%) et l'influence de l'environnement commun (40%) dans cette composante familiale de la pression artérielle par leur étude dans les familles adoptives à Montréal.

On distingue les hypertensions monogéniques dites "Mendéliennes" et l'hypertension essentielle. L'hypertension essentielle est donc définie par défaut comme étant une hypertension non mendélienne se développant graduellement. Ce problème de définition se reflète ainsi dans l'estimation de l'héritabilité de la maladie, alors que l'on a calculé qu'environ 30% de la variance de la pression artérielle est génétiquement déterminé chez l'humain. Cette héritabilité moyenne est donc en partie consécutive à une définition trop large. Par exemple, comme la maladie est polygénique, elle regroupera toutes les formes d'hypertension reflétant les différentes combinaisons de gènes morbides possibles, et les multiples organes, systèmes et métabolismes impliqués. Les effets directs ou indirects de l'environnement représentent la majeure partie des 70% de variance restante, les problèmes méthodologiques cités expliquant en partie la variance résiduelle.

2.1 Hypertensions Mendéliennes

Les hypertensions mendéliennes, comme leur nom l'indique, sont le fait du défaut d'un seul gène et représentent environ de 5 - 15% des cas d'hypertension artérielle. Elles proviennent toutes de pathologies rénales ou surrénaliennes altérant la balance des fluides et du sodium. Il s'agit entre autres, de l'hyperaldostéronisme suppressible par les glucocorticoïdes, de l'excès apparent en minéralocorticoïdes et de la maladie de Liddle.

Hyperaldostéronisme suppressible par les glucocorticoïdes (Lifton et al. 1992, et 1992a)

L'aldostérone est un minéralocorticoïde normalement synthétisée par la corticosurrénale sous le contrôle de l'angiotensine II. L'aldostérone favorise la

réabsorption du sodium et de l'eau par les cellules épithéliales tubulaires du rein. Dans l'hyperaldostéronisme suppressible par les glucocorticoïdes, les patients se présentent avec une sécrétion d'aldostérone indépendante de la régulation par l'angiotensine II. La sécrétion d'aldostérone est ici sous le contrôle de l'ACTH, qui normalement module la synthèse du cortisol dans le cortex surrénalien. L'aldostérone synthétase impliquée dans la synthèse d'aldostérone, et la 11β -hydroxylase responsable de la synthèse de cortisol partagent des séquences d'ADN similaires et la même organisation exon/intron. Ainsi, suite à une recombinaison inégale, il y a formation d'un gène chimérique où le promoteur de la 11β -hydroxylase est fusionné à la séquence codante de l'aldostérone synthétase. La transcription de l'aldostérone synthétase tombe ainsi sous le contrôle de l'ACTH, et s'effectue de façon ectopique dans la *zona fasciculata* de la cortico-surrénale. La réabsorption chronique d'eau et de sel due à cette production constitutive d'aldostérone provoquera donc une hypertension suite à l'augmentation du volume sanguin. L'administration de doses physiologiques de glucocorticoïdes permettra de supprimer l'ACTH et de réduire l'expression du gène mutant normalisant ainsi la pression artérielle.

Excès apparent en minéralocorticoïdes (Apparent Mineralocorticoid Excess, AME) (Ulick et al. 1979)

Les patients présentent ici une activité accrue des récepteurs des minéralocorticoïdes (RM) en dépit de niveaux très bas d'aldostérone. Le cortisol s'est avéré être le stéroïde responsable. Cela fut d'autant surprenant que les niveaux de cortisol sont en général 100 à 1000 fois supérieurs aux niveaux d'aldostérone, mais que le cortisol n'est pas connu pour être un bon agoniste des RM *in vivo*. Le cortisol étant cependant un agoniste très puissant de ces récepteurs *in vitro*, cela laissait supposer une modification des RM, ou un changement du rapport des taux circulants de cortisol/aldostérone. Chez les sujets normaux, le cortisol est rapidement hydrolysé par la 11β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11β -HSD) en cortisone possédant une très faible

affinité pour les RM. Les patients étudiés présentaient tous une élévation des taux des métabolites urinaires du cortisol, laissant croire à une baisse d'activité 11 β -HSD. Cette observation fut étayée par le fait que l'acide glycyrrhétique de la réglisse inhibe la 11 β -HSD, et provoque un syndrome identique à l'AME chez les grands buveurs de pastis. On a ainsi trouvé chez tous les patients souffrant d'AME des mutations dans la 11 β -HSD ayant pour effet d'inhiber la conversion de cortisol en cortisone, rendant ainsi les concentration de cortisol assez élevées pour stimuler les RM.

Syndrome de Liddle (Shimkets et al. 1994)

Ce syndrome est une hypertension hypovolémique due à une rétention sodique accompagnée d'une hypokaliémie laissant croire à un hyper-aldostéronisme. Il s'agit cependant d'un pseudo-aldostéronisme puisque la rénine est supprimée, et l'aldostérone basse. L'inhibition des RM n'affectant pas la pression artérielle indiqua un défaut en aval de la liaison aldostérone-RM. On savait cependant que le rein est essentiel puisqu'une transplantation rénale a pu guérir un patient. Ainsi, on trouva que le syndrome de Liddle découle de l'anomalie de la sous-unité β du canal sodique épithelial sensible au triamterène (ENaC). Plusieurs mutations peuvent produire des sous-unités β non fonctionnelles. Il s'ensuit un gain de fonction du canal sodique entraînant une réabsorption de sodium et d'eau, provoquant une hypertension volumique. Récemment, des mutations causant la même pathologie ont aussi été trouvées dans les sous-unités α et γ de ENaC.

Plus récemment, le groupe de Lifton (Geller et al. 2000) a élucidé une nouvelle forme d'hypertension monogénique s'exprimant pendant la grossesse. En effet, dans 6% des grossesses, les femmes présentent une hypertension pouvant conduire à la pré-éclampsie. Dans les cas étudiés par Geller, toutes les femmes présentèrent une augmentation de l'activité des RM malgré des taux inférieurs d'aldostérone circulante. Les

auteurs trouvèrent une mutation du RM (S810L) rendant celui-ci sensible à la progestérone. Ainsi, la progestérone devient chez ces femmes un agoniste égal à l'aldostérone pour stimuler le RM.

Encore ici, le RM est responsable de l'hypertension. Toutes ces formes d'hypertension mendéliennes affectent le métabolisme sodique et la balance des fluides au niveau du rein. Notons que les quelques formes d'hypotension mendéliennes sont aussi des pathologies rénales. Mentionons le pseudohypoaldostéronisme de type 1 (PHA-1) affectant ENaC comme dans le syndrome de Liddle, mais entraînant ici une perte de fonction (perte de sodium par absence de réabsorption), ou le syndrome de Gitelman provoquant une perte de sodium à cause de mutations dans le cotransporteur Na-Cl rénal. Ainsi, parce que presque toutes les hypo- ou hypertensions monogéniques rapportées à ce jour sont des maladies rénales, Lifton (1996) suggéra que l'hypertension dite "essentielle" est peut-être aussi une maladie rénale. Il propose d'utiliser les enseignements obtenus par la découverte des hypo- hypertensions mendéliennes pour trouver de nouvelles avenues de recherche des causes de l'hypertension polygénique commune, et suggère de cibler les métabolismes rénaux, voyant le rein comme organe central dans l'homéostasie du sodium et du volume sanguin.

2.2 Hypertension essentielle, étiologie et modèles actuels (Pour revue, voir Hamet *et al.* 1998)

L'hypertension essentielle se manifeste par l'établissement graduel de valeurs de pression artérielles anormalement élevées sans cause primaire évidente. Dit plus simplement, il s'agirait d'une augmentation permanente de la cible (*set-point*) de la pression artérielle. L'homéostasie du système serait donc réajustée à des niveaux de pression plus élevés, ce qui est facilement observable chez des patients à qui l'on retire la médication anti-hypertensive, et qui voient alors leur pression artérielle remonter à son niveau pathologique pré-traitement.

Nous avons vu que la pression artérielle était le produit du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique. Le modèle précédant de Lifton propose que l'augmentation de pression artérielle dans l'hypertension s'explique par une augmentation du volume sanguin causée par une pathologie rénale. Cependant, comme nous l'avons vu, le système sympathique peut augmenter le débit cardiaque, et de ce fait augmenter la pression pour un volume sanguin donné. D'autres mécanismes ont pour effet d'augmenter la résistance périphérique en altérant la contractilité des cellules de muscle lisse des artères de résistance.

Tous ces mécanismes fonctionnent lors de la régulation rapide de la pression artérielle. Cependant, plusieurs évidences suggèrent qu'une hyper-activation à long terme de ces mécanismes pourrait entraîner une hausse stable de la pression artérielle. Il semblerait en effet qu'il y ait un déséquilibre de la croissance et de l'apoptose pouvant expliquer une hyperplasie des cellules musculaires lisses si elles sont stimulées à long terme (Hamet *et al.* 2001). Le rein, dans ce cas jouerait un rôle secondaire, ne servant qu'à compenser cette hausse de pression artérielle. La pathologie rénale se manifesterait ici comme conséquence de l'hypertension.

Il n'y aurait donc pas de modèle universel expliquant l'hypertension essentielle. La multiplicité des acteurs et les redondances des systèmes de contrôles de la pression viennent compliquer la présentation et font croire qu'il y a peut-être autant d'hypertensions qu'il y a d'hypertendus. Il est toutefois possible de chercher les bases génétiques de certaines formes d'hypertension, particulièrement dans les populations isolées où la même "forme" de la maladie est peut-être partagée par un grand nombre d'individus. Le chapitre suivant décrit les techniques de l'étude des déterminants génétiques d'une maladie complexe et souligne les difficultés associées.

3. GÉNÉTIQUE DE L'HYPERTENSION ESSENTIELLE

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'hypertension essentielle est une maladie polygénique fortement modulée par l'environnement, compliquant du fait l'étude de ses composantes génétiques. Jusqu'à maintenant, les recherches chez les populations humaines ont porté principalement sur l'évaluation de gènes candidats choisis pour leur importance pathophysiologique dans les différents métabolismes régissant la pression artérielle. Par exemple, le système rénine-angiotensine-aldostérone a été particulièrement ciblé. Les résultats de génétique expérimentale utilisant les croisements animaux viennent quant à eux appuyer ces recherches d'une part, et d'autre part permettent d'étendre le champ de connaissances par la facilité relative à réaliser des études de liaison chez des populations ségréantes. Nous reverrons ici brièvement les méthodes de recherche des déterminants génétiques dans les maladies communes avec des exemples spécifiques des recherches en hypertension. Finalement, nous donnerons un résumé des principaux résultats traitant des locus de pression artérielle découverts dans les études humaines et animales obtenus à ce jour.

3.1 Recherche de déterminants génétiques, méthodologie générale appliquée à la recherche en hypertension

La recherche de déterminants génétiques consiste à trouver les corrélations statistiquement significatives entre la variabilité phénotypique (i.e. la pression artérielle) et la variabilité génétique de certains gènes (approche par gènes candidats), ou de marqueurs génétiques neutres *a priori*, distribués sur le génome entier (approche par la recherche du génome total, *genome-wide search*).

L'approche par gènes candidats se prête particulièrement bien aux études chez l'humain où l'on effectue la plupart du temps des études d'association, c'est à dire cas-témoins. Il s'agit de déterminer si un certain allèle du gène candidat se retrouve avec une

fréquence significativement plus grande chez la population atteinte que chez la population témoin. C'est de l'épidémiologie génétique où l'héritabilité n'entre pas en ligne de compte. La ségrégation (liaison, *linkage*) de cet allèle avec la maladie devra être prouvée à l'intérieur d'une famille ou d'une population ségrégente afin de pouvoir affirmer le lien de causalité advenant la découverte d'une association significative.

Les études de liaison génétique (*linkage*) chez l'humain ne sont possible que si l'on dispose de familles nombreuses où au moins 1 enfant est atteint. On pourra alors analyser les germains 2 à 2 (*sibpair*), soit en paires concordantes (les 2 sont atteints), ou discordantes (1 des 2 est atteint). Plus récemment, l'analyse de trios, quadruplets etc... possible dans les grandes familles est venue compléter cette technique en en augmentant la puissance statistique. Il s'agit donc ici de trouver les régions du génome communes aux frères et soeurs malades portant le(s) gènes morbide(s). On pourra ensuite tirer plus d'information en combinant les résultats de plusieurs familles. Cette approche est particulièrement souhaitable lorsque le type d'hypertension à caractériser semble homogène (effet fondateur).

Les recherches chez l'animal permettent plus facilement les études de liaison (*linkage*). Il est en effet relativement aisée d'obtenir des populations ségrégentes par croisement de lignées consanguines. La plupart des études publiées à ce jour ont utilisé surtout les croisements F₂ entre rats spontanément hypertendus SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*,) et normotendus Wistar-Kyoto (WKY), les progéniteurs consanguins permettant d'obtenir à un locus donné soient les 2 allèles de l'un ou l'autre progéniteur (locus homozygote), soit 1 allèle de chaque progéniteur (locus hétérozygote). On se référera aux articles de revue de Schork *et al.* (1996), et Hamet *et al.* (1998) pour une description complète des croisements employées.

Techniquement, la recherche de liaisons significative par l'approche du génome total dépend principalement du degré de polymorphisme entre les 2 génomes des progéniteurs et donc de la densité de marqueurs polymorphiques informatifs couvrant le

génomique recombinant. En effet, les génomes des progéniteurs doivent être suffisamment distants pour produire un génome recombinant informatif. D'autre part, les régions polymorphiques devront couvrir tout le génome également de façon à extraire le maximum d'information. On doit cependant tenir compte de plusieurs difficultés possibles compliquant la recherche des locus responsables. Nous en énumérerons quelques-une:

Pénétrance variable. La pénétrance traduit le degré d'atteinte. Ainsi, on peut être plus ou moins hypertendu, ce qui traduira l'implication de plusieurs gènes. Cependant, soulignons que même dans les hypertensions monogéniques, la pénétrance peut varier. Rappelons par exemple que des mutations sur les sous-unités α , β et γ de ENaC peuvent causer le syndrome de Liddle, mais à des degrés divers.

Hétérogénéité génétique. Il s'agit de la contribution indépendante de plusieurs gènes à la maladie. Ainsi, 1 seul gène morbide ou la combinaison de plusieurs parmi l'ensemble des gènes possibles pourront être responsable de la *même* maladie. Déjà, cette caractéristique modifiera le tableau clinique et affectera la pénétrance.

Héritabilité polygénique. L'héritabilité polygénique signifie que plusieurs gènes mutants doivent être présents pour l'expression de la pathologie. Ainsi, on pense que l'hypertension essentielle se caractérise par ces 2 phénomènes d'hétérogénéité génétique et d'héritabilité polygénique. Il semble en effet que plusieurs gènes morbides exprimés en même temps soient nécessaires puisque dans la plupart des résultats expérimentaux obtenus chez l'animal on observe plusieurs QTLs à l'intérieur d'un même croisement (voir la section *Modèles animaux*). Chez le rat SHR, on estime que jusqu'à 6 locus seraient impliqués dans la pathologie (Rapp 1983).

Épistasie, interaction épistatique ou interaction. Une interaction se produit lorsque plusieurs locus interagissent de façon non additive. Leur combinaison est synergique (addition ou soustraction). Ainsi, on parlera d'interaction si 2 gènes produisent chacun

une augmentation de pression de 10 mm Hg pris isolément, et une augmentation de 40 mm Hg ensemble.

Pléiotropie. Finalement, une difficulté majeure dans la recherche des composantes génétiques des maladies complexes est la pléiotropie des phénotypes étudiés. La pléiotropie traduit l'impact d'un gène sur plusieurs métabolismes. Ainsi, si le phénotype choisi est affecté par plusieurs métabolismes, la variance phénotypique sera la résultante de toutes les variances de ces métabolismes, rendant la détermination d'une possible différence entre individus atteints et normaux difficile.

Le Tableau I résume les résultats des études d'association et de liaison effectuées chez l'humain à ce jour. Notons le nombre impressionnant de QTLs sur presque tous les chromosomes, ainsi que la multitude de gènes candidats ayant été étudiés. Ces résultats nombreux et souvent contradictoires soulignent les difficultés rencontrés lors de ces recherches que nous avons rapidement revues.

TABLEAU I

Hypertension essentielle, sommaire des résultats des études d'association et de liaison effectuées chez l'humain à ce jour

Légende:

Phénotype: H, Hypertension; PAS, Pression artérielle systolique; PAD, Pression artérielle diastolique; PIH, *Pregnancy-induced hypertension*; Obésité-H/H-Ob, Hypertension associée à l'obésité; H-Pré-é, Pré-éclampsie; ISI, *Ischemic Stroke*; LVWT, *Left Ventricular Weight*.

Locus: ANP, *Atrial Natriuretic Peptide*; TNFRSF1B, *Tumor Necrosis Factor Receptor Sub-Family - 1-Beta*; APNH, *Antiporter, Sodium-Hydrogen ion, Amiloride-sensitive*; REN, Rénine; AT3, Antithrombine III; AGT, Angiotensine I; AT2R1, Récepteur à l'Angiotensine, type 1; ADD, ADD1, Adducine; EDNRA, Récepteur à l'endothéline, type A; ADRB1/B2/B3, Récepteur adrénergique bêta-1, bêta-2, bêta-3; D1A, Récepteur à la dopamine D1A; TNF α , *Tumor Necrosis Factor alpha*; EDN1, Endothéline 1; OB, Leptine; NOS3/2A, Synthétase de l'Oxyde Nitrique 3/2A ; eNOS, Synthétase de l'Oxyde Nitrique 3 (endothéliale); LPL, Lipoprotéine Lipase; NEFL, *Neurofilament protein, Light polypeptide*; CYP11B1/B2, Cytochrome P450 11B1/11B2; ADRA2A/C10, Récepteur alpha adrénergique Type 2A/sous-type C10 ; IGF2, *Insulin-Like Growth Factor II*; INS, Insuline; TH, Tyrosine Hydroxylase; GNB3, *Guanine Nuclotide-Binding Protein, beta 3*; SA, Gène SA; HP, Haptoglobine; β/γ -ENaC, Canal Sodique Épithélial, sous-unité β/γ ; ACE, Enzyme de Conversion de l'Angiotensine; KLK1, Kallikréine 1; IR, Récepteur à l'Insuline; LDLR, Récepteur aux LDL; Gs α , *Guanine nucleotide-binding Protein, alpha-stimulating activity*;

		Association		Liaison	
Chromosome	Locus	Phénotype		Référence	Référence
1p36.2	ANP	H	-	Barley 1991 Morris 1993 Daniel 1997	
1p36.3-36.2	TNFRSF1B	H	+	Glenn 2000	+ Glenn 2000
1p36.1-35	APNH	H	-	Lifton 1991	
1q21.3-32.3	REN	H	+	Barley 1991 Frossard 1999	Naftilan 1989 - Zee 1991 Jeunemaître 1992a Niu 1999
		PAS, PAD	-	Naftilan 1989 Soubrier 1990 Zee 1991 Barley 1991	
1q23-25	AT3	H	-	Zee 1991	- Zee 1991
1q42-43	AGT	H	+	Kamitani 1994 Rotimi 1994 Schmidt 1995 Caulfield 1995 Hegele 1997	Jeunemaitre 1992b + Caulfield, 1994 Caulfield 1995
		H	-	Rotimi 1994 Hingorani 1996 Rotimi 1997 Hegele 1997 Wang 1999 Larson 2000	- Jeunemaitre 1992b Lesage 1997 Brand 1998a Wang 1999 Niu 1999
		PIH	+	Ward 1993 Kobashi 1995	
		AGT	+	Jeunemaitre 1992 Rotimi 1997	
			-	Rotimi, 1997 Busjahn 1997	
3q21-25	AT2R1	H	+	Bonnardeaux 1994 Wang 1997	Bonnardeaux 1994 - Lesage 1997
4p16.3	ADD1, D4S95	H	+	Cusi 1997	+ Cusi 1997
	ADD	H	-	Kato 1998 Larson 2000 Melander 2000	- Kamitani 1998 Niu 1999
	ADD	Transport Na	+	Manunta 1999	- Kamitani 1998
4	EDNRA	H	-	Stevens 1995	
5q31-32	ADRB2	H	+	Svetkey 1996 Kotanko 1997	+ Svetkey 1997 - Svetkey 1997

			-	Baldwin 1999	
5q31.1-qter	ADRB1/D1A	PAS	+	Krushkal 1998	+ Krushkal 1998
6	TNFα	Obésité-H	+	Pausova 2000	
6p23-24	EDN1	H	+	Stevens 1995	
		H-Ob	+	Tiret 1999	
7q31.3	OB	H			- Onions 1998
7q35-36	NOS3, eNOS		-	Bonnardeaux 1995 Kato 1999 Benjafield 2000 Lade 1999	- Bonnardeaux 1995 + Miyamoto 1998
	eNOS	H	-	Hunt 1996	
8p22	LPL NEFL	PAS PAD			+ Wu 1996
8p12-11.2	ADRB3		-	Fujisawa 1997	
8q22	CYP11B1 CYP11B2	H H	+ +	Brand 1998b Tamaki 1999 Komiya 2000	- Brand 1998b
10q24-26	ADRA2A ADRB1	H	+ -	Svetkey 1996 Morris 1993	- Svetkey 1997
	ADRA2C10		-	Svetkey 1996	
11p15.5	IGF2, INS	H	-	Morris 1993 Nabika 1995	- Nabika 1995
	TH		+	Sharma 1998	- Sharma 1998
12p13	GNB3	H	+ - -	Hegele 1998 Benjafield 1998 Brand 1999 Larson 2000	
16p13.11-12.3SA		H	-	Nabika 1995 Zee 1997	- Nabika 1995 + Iwai 1994 + Iwai 1994a
16q22.1	HP	H	+	Robinson 1996	
16	β/γ-ENaC	H	-	Mellander 1998	- Persu 1998 Niu 1999
17q23	ACE	H	+	Morris 1993 O'Donnell 1998a	- Jeunemaître 1992c Summers 1993 Lindpaintner 1996

					Rigat 1990	
					Tiret 1992	
					Summers 1993	
					Schmidt 1993	
					Morris 1994	
					McKenzie 1995	
					Maguchi 1996	
					Kario 1996	
					Lindpaintner 1996	
				-	Frossard 1997	
					Jeng 1997	
					Chiang 1997	
					Perticone 1997	
					Busjahn 1997	
			ISI	+	Kario 1996	
			ACE	+	Tiret 1992	+ Tiret 1992
					McKenzie 1995	McKenzie 1995
					Rigat 1990	
					Busjahn 1997	
			LVWT			
				+	Schunkert 1994	
					Perticone 1997	
					Schunkert 1994	
				-	Busjahn 1997	
				-	Glenn 1999	
17cen-q11.2	NOS2A					
17q	D17S946 à	H				+ Julier 1997
	D17S932					
17q	D17S1814 à	H				+ Baima 1999
	D17S800					
19q13.3-13.4	KLK1	H		-	Morris 1993	- Niu 1999
19p13.2	IR			+	Morris 1993	
	LDLR			-	Morris 1993	
20q13.2-13.3	G _s α	PAS		+	Jia 1999	
mitochondrie	anonyme	H		+	Robinson 1996	

3.2 Modèles animaux

Chez les mammifères, les modèles animaux ont d'abord été utilisés pour les études de la physiologie normale. La progression des connaissances a permis la découverte et l'obtention par croisement et sélection d'animaux possédant une ou plusieurs des caractéristiques retrouvées dans les pathologies humaines. Les chercheurs ont ensuite développé des lignées consanguines possédant l'avantage de pouvoir fidèlement reproduire la même pathologie à chaque génération. En effet, les lignées consanguines permettent une meilleure reproductibilité puisque plusieurs animaux peuvent être étudiés simultanément afin d'obtenir une mesure phénotypique reproductible et fiable. Il devient aussi possible de comparer les 2 sexes ou encore d'évaluer le développement et la progression d'une maladie par des études longitudinales. Dans le domaine de l'hypertension, il faut souligner le travail de Okamoto et Aoki (1963) qui développèrent le rat spontanément hypertendu (*Spontaneously Hypertensive Rats*, SHR) en sélectionnant comme reproducteurs les males et femelles hypertendus de leur colonie de rats Wistar. Cet outil unique ainsi que les autres modèles consanguins de pathologies humaines ont favorisé l'émergence d'une profusion de résultats physiologiques différenciant ces modèles des animaux témoins.

Ces études d'observation ont fait surgir plusieurs questions qui sont à l'origine de l'utilisation plus systématique de la génétique par la communauté médicale. La première question est de savoir si les modèles étudiés illustrent fidèlement les pathologies humaines, ou à tout le moins certaines variantes. La masse de données physiologiques disponibles, et les médicaments obtenus par expérimentation chez les modèles animaux permettent de confirmer l'utilité de ces recherches et leur pertinence pour la médecine humaine.

Donc, si ces modèles animaux sont le reflet de maladies humaines, se peut-il que les mêmes gènes soient responsables de ces maladies chez l'animal et chez l'Homme? La réponse à cette question ne peut-être obtenue que par la génétique, et il s'agit dès lors

premièrement de trouver les gènes anormaux chez l'animal. Les études génétiques emploient donc des croisements pour déterminer si un phénotype 1) est héréditaire (génétique, et non environnemental), et 2) quelles sont les régions chromosomiques associées (ségréantes) à ce phénotype.

Dans l'hypertension, plusieurs modèles génétiques (spontanés) ont été développés chez le rat. Des croisements de ces lignées avec leurs témoins respectifs ont permis de trouver une multitude de régions chromosomiques liées à la variance de pression artérielle ou à d'autres phénotypes connexes comme l'hypertrophie cardiaque. Le Tableau II présente les résultats obtenus.

Ces résultats montrent qu'une multitude de QTLs sur tous les chromosomes semblent porter des gènes déterminant la pression artérielle. On peut alors se demander si tous ces QTLs sont "vrais" ou s'ils sont spécifiques au modèle étudié ou simplement des artéfacts. On remarquera que plusieurs études ont porté sur la PA sous diète à forte teneur en sodium. L'hypothèse de ces chercheurs est que certaines formes d'hypertension sont sensibles au sel, et que les gènes responsables sont peut-être différents des gènes impliqués dans l'hypertension non-sensible au sel.

TABLEAU II

Hypertension essentielle, sommaire des résultats des études de liaison effectuées chez le rat à ce jour

Légende:

Souches: SHR, *Spontaneously Hypertensive Rat*; SHRSP, *Spontaneously Hypertensive Rat, Stroke-Prone*; SS/Jr, *Dahl Salt-Sensitive Rat (John Rapp)*; GH, *Genetically Hypertensive Rat*; FHH, *Fawn-Hooded Hypertensive Rat*; LH, *Lyon Hypertensive Rat*; MHS, *Milan Hypertensive Rat*; Sabra, *Sabra Hypertensive Rat*.

Phénotypes: PAS, Pression Artérielle Systolique; PAD, Pression Artérielle Diastolique; PAM, Pression Artérielle Moyenne; PA-Na, Pression Artérielle sensible au sel; LACV, Latence, accident cérébro-vasculaire; PAP, Pression Artérielle Pulsatile; PC, Polyploïdie des cellules de muscle lisse; IC, Infarctus Cérébral.

Locus: La description des marqueurs anonymes ou des gènes identifiant les locus mentionnés peut s'obtenir du site Internet "*Rat Genome Database*", <http://www.rgd.mcw.edu>.

chromo- some	Locus	Phenotype	SHR	SHRSP	SS/Jr	GH, FHH, LH, MHS, Sabra
1	<i>Igf2</i>	PAS	+ (Samani 1993a) + (Kovacs 1997)	+ (Nara 1993)		
		PAD	+ (Samani 1993a)	+ (Nara 1993)		
		PAM	+ (Iwai 1992)			
		PA-Na	+ (Schork 1995)	+ (Lindpaintner 1993)		
	<i>Myl2</i>	PAS	+ (Kovacs 1997)	+ (Kreutz 1997)		+ (Brown 1997)
	<i>Mt1pa</i>			- (Rubattu 1996)		- (Grunder 1997)
	<i>Lsn</i>	PAD	+ (Kovacs 1997)	+ (Kreutz 1997)		- (Grunder 1997)
	<i>Sa</i>	PAS	+ (Samani 1993) - (St Lezin 2000)	- (Rubattu 1996)		
	<i>Scnn1b</i>	PA-Na		+ (Kreutz 1997)	+ (Gu 1996)	
	<i>Scnn1g</i>	LACV		+ (Rubattu 1996)		
	<i>Klk1</i>	PAS, PAD	+ (Pravenec 1991)			
	<i>D1Mco1</i>	PAM				
	<i>D1Mco2</i>	PA-Na			+ (Gu 1996)	
	<i>SS1a</i>	PAS-Na				+ (Yagil 1998)
	<i>SS1b</i>					
	<i>Map-1</i>	PAM	+ (Innes 1998)			
	<i>D1Rat121</i>	PAS				+ (Zagato 2000)
	<i>Atp4a</i>	PAS-Na			- (Rapp 1990)	
	2	<i>D2N35</i>	PAD	+ (Pravenec 1995)		
<i>Camk</i>						
<i>NaKα1</i>		PAS	+ (Samani 1996)	+ (Jacob 1991)		+ (Harris 1995)
		PA-Na			+ (Herrera 1998)	
<i>Gca</i>		PAD	+ (Samani 1996)			
		PA-Na	+ (Schork 1995)	+ (Clark 1996)	+ (Deng 1992) - (Deng 1992) + (Deng 1994a) + (Deng 1997a)	
		PC		+ (Clark 1996)	+ (Deng 1997a)	+ (Harris 1995)
<i>Cpb</i>		PAS, PAD		+ (Clark 1996)	+ (Deng 1994b)	+ (Dubay 1993)
<i>At1b</i>		PA-Na		+ (Clark 1996)		
		PC		+ (Clark 1996)		
3	<i>Et3</i>	PAM		- (Rubattu 1996)		
	<i>Svp1</i>	PAS, PAD		+ (Clark 1996)		
	<i>D3Mit2</i>	PAP		+ (Clark 1996)		
		PA-Na	+ (Deng 1994c)		+ (Cicila 1994) + (Deng 1994c)	
		LACV		+ (Rubattu 1996)		
		PC		+ (Clark 1996)	+ (Cicila 1994)	
	<i>Adra2b</i>	PA-Na			+ (Ginn 1994)	
	<i>D3Mgh16</i>	PAS, PAD		+ (Clark 1996)		
	<i>Scn2a</i>	PAP				

		PA-Na		+ (Clark 1996)	
				+ (Nara 1994)	
		PC		+ (Clark 1996)	
	MITR244	PAD, PAS-Na		+ femelle (Matsumoto 1995)	
4	<i>Nos3</i>	PAM	+ (Pravenec 1995)		– (Deng 1997b)
	<i>Il6</i>				
	<i>D4Mgh16</i>	PAM		– (Rubattu 1996)	
		LACV		+ (Rubattu 1996)	
	<i>R514</i>	PA-Na	+ (Schork 1995)		
	<i>Scnn1a</i>	PAS, PAD			– (Kreutz 1997)
	<i>Eno2</i>	PA-Na			
	<i>NPY</i>	PA	+ (Katsuya 1993)		
5	<i>Et2</i>	PA-Na			+ (Deng 1994c)
	<i>Cyp4a2</i>	PAS, PAD		– (Rubattu 1996)	+ (Stec 1996)
				– (Jeffs 1997)	
	<i>Anf</i>	IC		+ (Jeffs 1997)	
	<i>Ela</i>	LACV		+ (Rubattu 1996)	
6	<i>Kbp</i>	PA-Na		+ (Lindpaintner 1994)	
		PAS			– (Chen 1997)
	<i>Cebrp97s14</i>	PC	+ (Hamet 1996)		
	<i>D6mit4</i>				
7	<i>Cyp11b</i>	PA-Na			+ (Cicila 1993)
8	<i>R19</i>	PA-Na	+ (Schork 1995)		
	<i>Cebr16s5</i>	PC	+ (Hamet 1996)		
	<i>Cebr103s2</i>				
	<i>Cebrp97s22</i>				
	<i>D8Mit6</i>	PAS	+ (Kren 1997)		
	<i>Rbp2</i>	PAD, PC	+ (Kren 1997)		
10	<i>Nos1</i>	PAD, PAS		+ (Kreutz 1995)	
	<i>Nos2</i>	PA			+ (Deng 1995)
	<i>Myh3</i>	PA-Na		– (Kreutz 1995)	
	<i>Atpb2s</i>	PAD		+ (Jacob 1991)	
				+ (Hilbert 1991)	
				+ (Kreutz 1995)	

	<i>Ace</i>	PAS PAM	+ (Kovacs 1997)	+ (Jacob 1991) + (Hilbert 1991) + (Kreutz 1995)	+ (Harris 1995)
	<i>Gh</i>	PA-Na			+ (Harris 1995)
	<i>D10mcol</i>			+ (Jacob 1991) + (Hilbert 1991) + (Kreutz 1995)	+ (Deng 1992) + (Dukhanina 1997)
	<i>D10mco6</i>	PC			- (Deng 1992)
	<i>Apb</i>				+ (Dukhanina 1997) + (Harris 1995)
	<i>D10Rat33</i>	PAS			+ (Zagato 2000)
12	<i>Hsp27</i>	PAD PAM, PAS PC	+ (Hamet 1996) - (Hamet 1996) + (Hamet 1996)		
13	<i>Ren</i>	PAD PA		+ (Kurtz 1990) + (Samani 1996)	+ (Rapp 1989) + (Dubay 1993)
	<i>D13Mit3</i>	PAD, PAS PAS PAM PA-Na		- (Lindpaintner 1990) + (Kurtz 1990)	+ (Dubay 1993) + (Harris 1995) + (Jiang 1997) + (Rapp 1996) + (St Lezin 1996) + (Jiang 1997) - (Deng 1992) - (Rapp 1996)
		PC			+ (Harris 1995)
14	<i>Adra2c</i>	PA-Na			+ (Ginn 1994) + (Bianchi 1994)
	<i>D1b</i>				- (Ginn 1994)
	<i>Add1</i>	PC PAS		+ (Clark 1996)	+ (Zagato 2000)
16	<i>Cebr204s1</i>	PA-Na	+ (Schork 1995)		
	<i>R762</i>	PC	+ (Hamet 1996)		
17	<i>Drd1a</i>	PAM	- (Pravenec 1995)		
	<i>Hith</i>	PC	+ (Pravenec 1995)		
		PA-Na			+ (Deng 1994c)
	<i>SS17</i>	PAS-Na			+ (Yagil 1998)
18	<i>RR1094</i>	PAD		+ (Jacob 1991)	
	<i>Ttr</i>	PAS	+ (Kovacs 1997)	+ (Jacob 1991)	
	<i>D18Mit9</i>	PA-Na		+ (Jacob 1991)	
19	<i>Agt</i>	PAS	+ (Pravenec 1995)	- (Hubner 1994)	- (Deng 1994c)
	<i>D19Mit7</i>				
	<i>Eta</i>				

20	<i>RT1</i> <i>Hsp70</i>	PAS	+ (Pravenec 1989)		
			– (Lodwick 1993)		
			– (Kren 1997)		
		PAD	– (Lodwick 1993)		
			– (Kren 1997)		
		PAM	+ (Hamet 1992)		
	PA–Na	+ (Kunes 1994)			
	PA–Na	– (Lodwick 1993)			
X		PAS	– (Vincent 1994)	+ (Hilbert 1991)	– (Vincent 1996)
		PAD			+F (Yagil 1999)
					–M (Yagil 1999)
		PAM			+ (Harris 1995)
					– (Vincent 1996)
		PAP			– (Vincent 1996)
		PA–Na		+ (Hilbert 1991)	
	PC			+ (Harris 1995)	
				+ (Vincent 1996)	
Y		PAS	+ (Ely 1990)	+ (Hilbert 1991)	– (Vincent 1996)
			– (Vincent 1994)	+ (Davidson 1995)	
		PAD	– (Vincent 1994)	+ (Hilbert 1991)	– (Vincent 1996)
				+ (Davidson 1995)	
		PAM		+ (Davidson 1995)	– (Vincent 1996)
		PA–Na		+ (Hilbert 1991)	
			+ (Davidson 1995)		
		PAP			– (Vincent 1996)

3.3 Facteurs primaires et secondaires, phénotypes intermédiaires dans l'hypertension

La pression artérielle étant la résultante de plusieurs métabolismes, le phénotype de PA ou "d'hypertension" est peut-être trop général, expliquant la multitude de QTLs trouvés. Une façon de contourner le problème est de disséquer la pathologie en phénotypes intermédiaires possiblement monogéniques. Ainsi, la PA sous diète en sodium est un phénotype plus spécifique. Par l'amplification de la variance obtenue par la diète en sodium, il devient possible de trouver des QTLs spécifiques avec une plus grande confiance. Il y a donc un besoin de mieux définir la maladie pour trouver des phénotypes intermédiaires.

Hamet et coll. (1985) ont suggéré que ces phénotypes intermédiaires doivent être primaires, c'est à dire causal, et non secondaires à hausse de PA. Ainsi, ils postulèrent qu'un phénotype d'intérêt devrait être indépendant de la PA tout en étant possiblement impliqué dans la modulation de la PA, et être "anormal" avant la manifestation de l'hypertension (causalité). De plus, si le phénotype se retrouve chez plusieurs espèces et en particulier chez l'humain, son importance possible se voit renforcer d'autant. Si toutes ces conditions sont remplies, les études génétiques doivent montrer une ségrégation mendélienne (monogénique) et une co-ségrégation avec la pression artérielle. Finalement, l'existence d'un gène anormal doit sous-tendre ces observations.

Dans cette thèse, nous nous proposons d'étudier une susceptibilité à l'environnement, plus spécifiquement la susceptibilité au stress. Nous tenterons de trouver des phénotypes intermédiaires possiblement monogéniques de cette susceptibilité. Cependant, comme nous allons le montrer, une susceptibilité environnementale ne co-ségrègue pas toujours avec la PA. L'impact de l'environnement se manifestera seulement chez les individus sensibles à la condition que l'environnement délétère soit présent.

En plus d'une meilleure définition de la pathologie, nous croyons que des techniques comme la méta-analyse ou la génomique comparée pourraient aider à cibler les régions chromosomiques majeures. Par exemple, Stoll et coll. (2000) ont combiné les résultats obtenus chez la souris, le rat et l'Homme afin d'obtenir par cartographie génétique comparée, les régions du génome humain ayant la plus grande probabilité de contenir des locus modulant l'hypertension. Ces analyses combinées permettent de mettre à profit les résultats disponibles qui, autrement, semblent trop nombreux et contradictoires.

4. GÉNÉTIQUE QUANTITATIVE

4.1 Mesure de l'héritabilité (h^2) (Falconer 1960)

Il convient de définir le concept d'héritabilité qui est à la base de toutes les recherches en génétique quantitative. De façon générale, l'héritabilité est une estimation de la contribution des gènes à un phénotype. Cependant, nous allons voir que cette notion d'héritabilité est souvent employée sans discernement et chargée d'une importance qu'elle n'a pas toujours.

L'héritabilité h^2 est le rapport de la variance génétique (V_G) sur la variance totale:

$$h^2 = V_G / (V_G + V_E)$$

avec V_E , la variance environnementale.

Ainsi, plus h^2 sera grand, plus la contribution des gènes à la variance totale sera importante, alors qu'inversement, un petit h^2 signifiera une forte contribution de l'environnement à la variance du phénotype étudié. Il faut cependant apporter des

nuances à cette interprétation purement mathématique de h^2 . En effet, une héritabilité de 0 ne signifie pas nécessairement que les gènes n'ont aucun rôle à jouer dans l'expression d'un caractère, alors qu'inversement, une très grande héritabilité ne signifie pas que le phénotype ne sera pas affecté par l'environnement (Suzuki *et al.* 1993). Cette erreur commune est bien illustrée par un article de Jensen (1969). Dans ce travail portant sur le quotient intellectuel (QI) et la réussite sociale, l'auteur soutient qu'il est difficile d'améliorer le QI d'une population donnée, et base ses conclusions sur la grande héritabilité du QI. Au delà des possibles critiques relative à son calcul de l'héritabilité du QI (que mesure-t-on?), sa principale erreur est d'associer la grande héritabilité du phénotype avec son immuabilité. Le paragraphe suivant illustrera notre propos par un exemple concret, et la section suivante portant sur l'interaction entre les gènes et l'environnement présentera les principes théoriques démontrant pourquoi l'interprétation de Jensen est erronée.

La mesure de l'héritabilité d'un phénotype sert donc à estimer la contribution de la composante génétique à une pathologie. Cette mesure est valable pour une population donnée, dans un environnement donné, et peut varier selon le phénotype mesuré. Par exemple, dans les recherches sur l'obésité, la nature familiale de la maladie ne fait aucun doute lorsqu'évaluée par l'indice de masse corporelle (*Body Mass Index, BMI*). Cependant, les chercheurs ne s'entendent pas sur la contribution relative de l'hérédité et de l'environnement, puisqu'on a rapporté des valeurs d'héritabilité variant de 0 à 90% pour le BMI (Pérusse *et al.* 1998). Ainsi, les auteurs montrèrent que h^2 varie de 50 à 80% dans les travaux portant sur des jumeaux, de 25 à 55% dans les familles nucléaires et de 10 à 30% dans les études portant sur les enfants adoptés. L'héritabilité variera donc en fonction des populations à l'étude.

Si le BMI possède une indéniable composante héréditaire, il est cependant aussi fortement influencé par l'environnement. Dans l'étude des familles de Québec (*Quebec*

Family Study, QFS), le BMI, le pourcentage de graisse, la masse maigre et la graisse viscérale ont une h^2 respective de 10%, 20%, 35% et 55%, la variance résiduelle étant environnementale (Allison *et al.* 1996, Pérusse *et al.* 1996). Ainsi, dans cette même population, plusieurs indices d'obésité ont une héritabilité différente. De plus, une partie de la variance environnementale peut être transmissible entre les générations (transmission culturelle, non génétique) et expliquerait jusqu'à 30% de la variance phénotypique au sein de la population QFS (Bouchard *et al.* 1998)! Cette transmission non génétique peut donc expliquer en partie les niveaux élevés de h^2 rapportés et la variabilité entre les études. Cependant, au delà de ce phénomène, nous voulons insister sur le fait que h^2 est dépendant du phénotype et de la population à l'étude (à cause des fréquences variables des génotypes selon les populations). Les valeurs calculées de h^2 sont donc rarement et difficilement applicables à d'autres contextes expérimentaux.

5. INTERACTION GÈNES × ENVIRONNEMENT. CONCEPT DE SUSCEPTIBILITÉ GÉNÉTIQUE À L'ENVIRONNEMENT DANS L'HYPERTENSION

Jusqu'à 70% de la variance de la pression artérielle serait due à l'environnement. Environ 15% de cette variance environnementale viendrait de l'environnement commun (diète, "maisonnée"...), le reste étant l'environnement "en général" (Williams *et al.* 1990, Havlik 1991). L'effet de l'environnement sur la pathologie, dans ce cas l'hypertension, peut être vu comme additif, en interaction avec les gènes causals ou de régulation ou encore comme la somme de ces effets. La Figure I, adaptée de Hamet (1995) résume l'impact des contributions génétiques et environnementales à l'ypertension.

Dans le premier cas (a), les gènes, comme l'environnement, exercent indépendamment leurs effets sur la pression. Ici, un gène morbide et un environnement délétère agiront séparément ou ensemble de façon additive (E+G) pour causer

l'hypertension. Dans le second cas (b), l'environnement, non délétère en soi, agira au travers de gènes sensibles dit de susceptibilité. Un gène de susceptibilité à l'environnement aura pour effet d'amplifier ou simplement de permettre les manifestations néfastes de cet environnement, c'est l'interaction $G \times E$. Ce dernier cas est bien illustré par la sensibilité au sel qui ne se manifeste que chez les sujets sensibles au sel (Weinberger 1990). L'impact différentiel de l'environnement est donc ici allèle-dépendant. Notons que, si dans tous les cas l'effet de l'environnement s'exerce au travers de la modulation de gènes, seul l'impact différentiel causant la pathologie traduira une *susceptibilité environnementale*.

FIGURE I

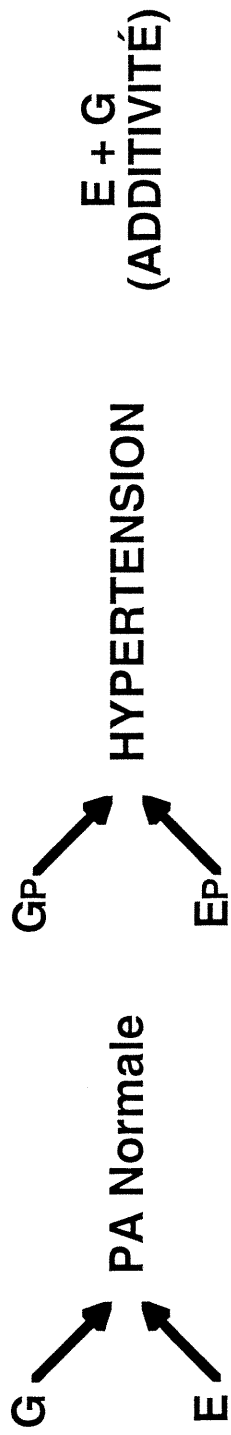
Gènes et environnement dans l'hypertension

G, Gène; E, Environnement. Gp (pathologique), Gène morbide; Ep, Environnement délétère.

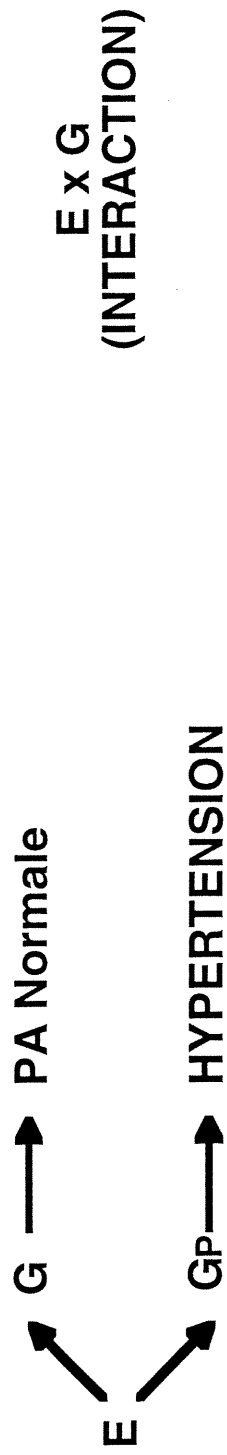
a. Dans ce cas, les gènes morbides ou l'environnement délétère exercent leurs effets indépendamment.

b. Ici, l'environnement n'a pas de "qualité" en soi, seulement en présence d'un gène susceptible, un environnement donné aura un effet néfaste.

a



b



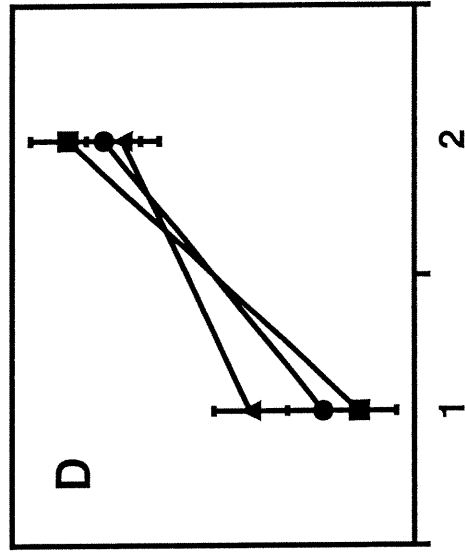
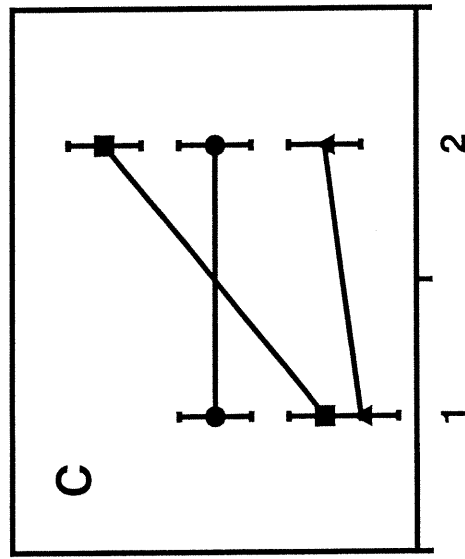
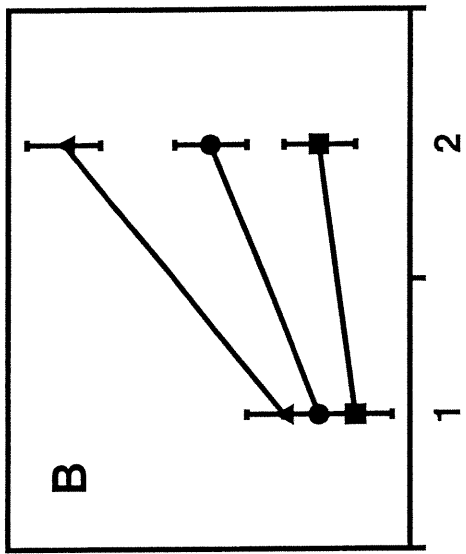
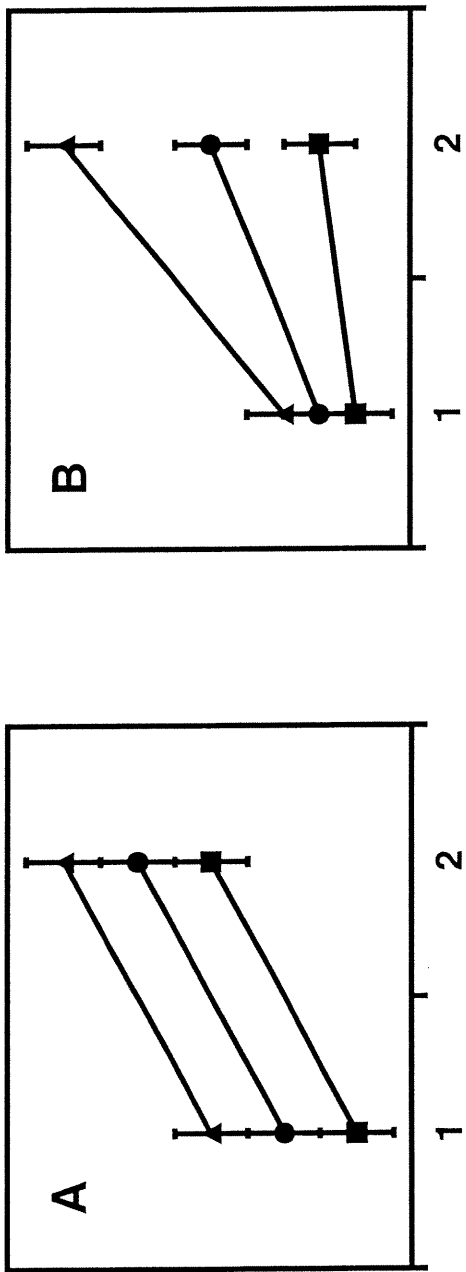
Ainsi, de la même façon qu'un polymorphisme génétique pourra définir un certain risque de développer une pathologie, la réponse variable à un environnement donné pourra définir une susceptibilité environnementale, (i.e. un risque environnemental). Cette susceptibilité à l'environnement étant modulée par des gènes, on pourra parler de gènes de susceptibilité à l'environnement, d'où le concept proposé de *susceptibilité génétique* à l'environnement. Il faut remarquer qu'un gène de susceptibilité ne pourra pas être qualifié de normal ou d'anormal puisqu'il ne causera pas de pathologie en soit. Des variantes de certains gènes pourraient donc être plus sensibles que d'autres à certains environnements. Néanmoins, seulement dans ces conditions exprimeront-elles pleinement leurs conséquences délétères (ou positives). Nous présenterons maintenant les principes théoriques qui sous-tendent les interactions gènes \times environnement (adapté de Lynch et Walsh 1997).

La Figure II montre la réponse phénotypique de 3 génotypes en présence de 2 environnements différents. Quatre cas peuvent être envisagés. Dans la Figure IIA, les 3 génotypes vont réagir de façon parallèle au changement d'environnement, l'effet de l'environnement sera alors additif. Si l'effet est fonction du génotype, les courbes ne seront pas parallèles (Figure IIB), certains génotypes étant plus susceptibles que d'autres à l'environnement. Il s'agira alors d'une interaction gène \times environnement. *Il faut noter ici que la variance génétique a été modifiée par le changement d'environnement.* La Figure IIC présente aussi une interaction gène \times environnement, mais il y a ici un changement de rang entre les génotypes alors qu'il n'y avait qu'un changement d'échelle dans la Figure IIB. Finalement, la Figure IID combine les 2 phénomènes pour donner encore un exemple d'interaction gène \times environnement. *Dans les 3 cas d'interactions, le changement d'environnement provoque un changement de la variance génétique qui se répercutera sur la mesure de l'héritabilité.* Ces exemples illustrent bien l'erreur que fit Jensen, un phénotype pouvant posséder une très grande héritabilité tout en ayant une grande plasticité.

FIGURE II**Interactions phénotypes-génotypes**

1 et 2 représentent 2 environnements différents exerçant leur effet sur 3 génotypes, ▲, ●, ■.

MOYENNE PHÉNOTYPIQUE



ENVIRONNEMENT

Parce que l'on peut s'attendre à de pareils résultats dans la réalité, ces exemples nous permettent de définir les paramètres nécessaires à la découverte de gènes de susceptibilité à l'environnement. Ainsi, dans nos exemples théoriques, seulement dans les Figures IIB et IIC et pour l'environnement 2 trouve-t-on le critère essentiel, soit une grande variance phénotypique dépendante du génotype (i.e. une grande héritabilité).

Comme cette grande héritabilité ne se rencontrera pas *a priori* dans tous les environnements, il faudra donc chercher et choisir précisément les conditions expérimentales dans lesquelles les mesures devront être prises si l'on compte trouver des gènes de susceptibilité. Dans ce cas, la mesure préalable de l'héritabilité aura une importance primordiale. De plus, les exemples de la Figure II indiquent qu'un changement d'environnement est nécessaire pour faire varier (grandir) la variance phénotypique et trouver les conditions pour lesquelles l'impact du génotype sera maximum. Finalement, on remarque que l'interaction gène \times environnement peut comprendre un changement d'échelle et/ou un changement de rang dans la réponse des génotypes. Ce renseignement nous montre que l'on peut mesurer le phénotype dans un environnement donné pour autant que l'héritabilité soit grande, ou le mesurer *lors* du changement d'environnement. Dans ce cas, le changement de rang et d'échelle traduiront l'effet des gènes, alors que l'héritabilité à l'état basal ne permettait pas de détecter l'impact des gènes.

Ces exemples nous permettent, avec la discussion précédente sur l'héritabilité, de poser les balises nécessaires à la recherche de gènes de susceptibilité à l'environnement. En effet, non seulement le phénotype proposé devra être modulé par l'environnement, mais il faudra aussi l'étudier dans des conditions où l'héritabilité est grande, afin d'augmenter les chances de localiser un QTL s'il y a lieu. En d'autres termes, les gènes de susceptibilité ne vont pas ségréguer avec la pathologie à moins de les étudier dans l'environnement adéquat. Dans l'optique de cette thèse, la mesure de l'héritabilité servira donc à choisir les phénotypes et les conditions environnementales reflétant l'impact de

possibles susceptibilités génétiques, l'objectif étant révéler les locus de susceptibilité responsables.

Cet aspect fondamental est bien illustré par les travaux de Paterson et coll. (1991) chez la tomate. Ils ont mesuré des QTL liés à différents métabolismes dans un même croisement cultivé dans 3 endroits différents, soient en Californie (2) et en Israël. Ils montrèrent que sur un total de 29 QTL, seuls 4 furent détectés dans les 3 environnements, 10 furent communs à 2 environnements, les autres (15) étant uniques à un seul endroit. C'est une démonstration de l'importance de trouver les conditions permettant d'observer l'impact maximal de l'environnement si l'on veut trouver les déterminants génétiques responsables.

6. STRESS ET MALADIES

6.1 Introduction, composante psychosomatique des maladies

L'histoire de la médecine est truffée d'anecdotes où le tempérament optimiste des patients ainsi que le support psychologique reçu sont les garants d'une convalescence rapide et complète. Le dicton populaire dit bien que *les gens heureux n'ont pas d'histoire* (i.e. ne sont pas malades). Cependant, au delà de l'anecdote semble se profiler un effet réel et peut-être quantifiable des émotions et de l'état psychologique général sur le pronostic et la guérison. Certaines maladies comme l'asthme et la prédisposition aux ulcers d'estomac possèdent en effet une composante psychosomatique reconnue. Malgré tout, sans nier que l'état psychologique d'un patient soit important, peu de gens acceptent d'emblée qu'il puisse avoir un rôle majeur à jouer dans l'apparition et l'évolution d'une pathologie, et les cliniciens préféreront les facteurs de risques plus facilement quantifiables et démontrés comme le tabagisme et la diète par exemple.

Les effets du stress de la vie moderne, des croyances personnelles et de l'état mental général sur la santé ne font cependant plus de doute, et plusieurs études font

ressortir ces interactions. Mentionons le travail de Phillips et coll. (1993) qui ont postulé l'hypothèse que l'espérance de vie de personnes fatalistes, défaitistes ou simplement stoïques pourrait être réduite à cause de cette mentalité "négative" advenant qu'ils contractent une maladie. Afin de répondre à cette question difficile, ils ont épluché les certificats de décès de 28,169 américains d'ascendance chinoise pour obtenir la cause du décès, l'âge au décès et l'année de naissance.

L'utilisation de sujets d'ascendance chinoise et de l'année de naissance a permis au chercheurs de tester leur hypothèse plus facilement. En effet, l'astrologie chinoise affirme que le destin d'une personne est fortement influencé par son année de naissance, certaines années étant considérées "chanceuses", d'autres "malchanceuses". De plus, la médecine traditionnelle chinoise est imprégnée de ces croyances. Par exemple, les années sont associés à des éléments (le feu, le bois, l'eau et la terre), et les personnes nées une année de feu devraient être plus susceptibles aux maladies cardiovasculaires. Les chercheurs ont donc comparé les données obtenues de la population chinoise avec les données de sujets "caucasiens" provenant du même registre. On a ainsi sélectionné 20 témoins pour chaque patient chinois. Les témoins furent contrôlés pour le sexe, l'année de naissance, la cause du décès et l'année du décès. Un total de 412,632 témoins a ainsi servi à l'étude! Les causes de décès furent divisées en 15 catégories comprenant cancers, maladies cardiovasculaires, pulmonaires, rénales et infectieuses.

Les résultats montrèrent que les chinois meurent significativement plus tôt s'ils sont atteints d'une maladie associée à un mauvais pronostics selon leur année de naissance. Leur espérance de vie sera alors de 1.3 à 4.9 années plus courte que la normale! De plus, le nombre d'années de vie perdues est proportionnel à l'attachement aux traditions. Les auteurs se demandèrent alors pourquoi l'astrologie chinoise ne s'appliquerait qu'aux chinois, et plus particulièrement à ceux qui y croient le plus, l'âge de décès des témoins n'étant pas affecté par leur année de naissance? Ils conclurent que des facteurs psychosomatiques affectent significativement la longévité des patients atteints

de la plupart des maladies. Le *stress*, vécu (maladie) et aussi dans ce cas perçu, serait donc un déterminant significatif de notre santé.

6.2 Concept de stress

Le concept de stress a été développé dans les années cinquante par le Professeur Hans Selyé à Montréal (Selyé 1956). Il fut le premier à définir et caractériser ce qu'il appela le syndrome d'adaptation général ou *General Adaptation Syndrome, G.A.S.* Trois phases caractérisent le G.A.S., soient 1) la réaction d'alarme, 2) la période de résistance et 3) la phase d'épuisement. Il montra l'importance de la stimulation sympathique via l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien et le rôle des hormones du stress, le cortisol et les catécholamines (voir aussi Chrousos et Gold 1992). Henry (1992) a raffiné le modèle de Selyé qui présuppose une réponse identique à différents agents stressants. Au contraire, dans son modèle, Henry montre que la réponse neuroendocrine est fonction du stress perçu. Si celui-ci est facile à endurer, une réponse adaptative active caractérisée par une sécrétion de norépinéphrine va se produire. Cette réaction de fuite ou combat se caractérise par l'activation du système sympathique via l'amygdale et le relais à la médullo-surrénale. Au contraire, si le stress est trop grand ou constant et épuise les capacités de réaction de l'animal, un état dépressif s'installera. L'axe hypophyso-cortico-surrénalien est activé. Cet état se caractérise par des taux de cortisol et d'ACTH élevés alors que les catécholamines sont inchangées (stress chronique). La sécrétion accrue de rénine induira une hausse graduelle et constante de la pression artérielle pouvant conduire à l'hypertension.

7. LA RÉPONSE DIFFÉRENTIELLE AU STRESS COMME FACTEUR PRÉDICTIF DE L'HYPERTENSION

7.1 Impact du stress psychosocial sur les maladies cardiovasculaires

En 1939 Alexander suggéra un lien entre le développement de l'hypertension et le stress émotionnel. Gutmann et Benson (1971) observèrent que les sujets exposés à un environnement changeant nécessitant une adaptation continue voient leur pression sanguine augmenter. Dès 1973, le lien entre le stress de la vie moderne et diverses maladies commença à être plus systématiquement exploré (Cobb et Rose 1973). Les études HANES (*Health and Nutrition Examination Survey*) et HES (*Health Examination Survey*) permirent d'évaluer le lien possible entre le stress professionnel et la prévalence d'infarctus passés chez 4,833 hommes participant aux études (Karasek *et al.* 1988). Les résultats montrèrent que l'absence de contrôle au travail est perçue comme un stress psychologique chez les participants salariés, cette "tension" étant significativement et positivement associée à une prévalence accrue d'infarctus du myocarde (Karasek *et al.* 1988, Pieper *et al.* 1989). Une étude cas-témoins de 2,556 hommes montra aussi que les employés dont le travail laissait peu de latitude (peu de pouvoir décisionnel, absence de "maîtrise", *job strain*), avaient une prévalence accrue d'hypertension et d'hypertrophie ventriculaire gauche (Schnall *et al.* 1990). Les auteurs soulignèrent ainsi l'importance possible du stress professionnel, ou "*job strain*" comme facteur de risque cardiovasculaire. Une autre recherche, l'étude de Framingham, avait pour but d'évaluer sur une vingtaine d'années les facteurs de risques cardiovasculaires d'une cohorte d'hommes et de femmes normotendus en début d'étude (Markovitz *et al.* 1993). Les résultats montrèrent que le niveau d'anxiété, définie comme de la tension et des symptômes de colère, est un prédicteur d'hypertension future chez les hommes d'âge moyen, cette relation n'étant toutefois pas vérifiée pour les femmes de la cohorte.

Cependant, dans la population de Tecumseh, la réactivité cardiovasculaire est en relation inverse avec les paramètres d'anxiété étudiés, les sujets possédant un score d'anxiété bas présentant une plus grande réactivité que ceux ayant un score élevé (Young *et al.* 1998). Cette apparente contradiction dans les résultats montra le besoin de mieux définir le stress psychologique afin de trouver des méthodes reproductibles permettant de tester objectivement les hypothèses ou encore pour permettre l'utilisation de modèles animaux.

7.2 La stimulation par le froid comme modèle reproductible de stress

Hines et Brown (1936), émirent l'hypothèse selon laquelle l'hypertension serait la conséquence d'une période d'hyperactivité vasculaire soutenue. Ils proposèrent l'utilisation d'une stimulation par le froid (*cold pressor test*) comme méthode reproductible pour mesurer les changements cardiovasculaires dus au stress. Dans ce test, le sujet doit plonger sa main, son coude ou tout son avant-bras dans un mélange d'eau et de glace à 4°C, et l'y laisser le plus longtemps possible pendant que l'on enregistre des paramètres cardiovasculaires tels que la PA et la fréquence cardiaque afin de détecter de possibles différences entre les individus. Malgré l'ignorance des mécanismes qui le sous-tendent, plusieurs chercheurs ont employé ce stimulus comme agent révélateur de réactions psychophysiologiques. Hines et Brown vinrent à la conclusion que ce test était prédictif des niveaux futurs de PA. En effet, leurs travaux montrèrent que les hypertendus avaient une pression plus labile que les normotendus lors des tests de stress, que les sujets normotendus hyperréactifs avaient plus souvent une histoire familiale positive d'hypertension et qu'ils pourraient ainsi être prédisposés à développer l'hypertension au cours de leur vie. En 1984, 45 ans plus tard, 142 patients de Hines et Brown furent de nouveaux évalués dans une étude rétrospective. Les résultats démontrèrent la véracité de leur hypothèse (Wood *et al.* 1984). Parmi ces patients, 71% des hyperréactifs et seulement 19% des normoréactifs développèrent une

hypertension soutenue, démontrant ainsi l'utilité du *cold pressor test* comme outil de pronostic. Une analyse prospective de 910 étudiants en médecine suivis pendant 20 à 36 ans confirma aussi cette relation (Menkes *et al.* 1989). Ainsi, les sujets du quartile supérieur montrant la plus grande réactivité vasculaire en début d'étude lors du test de stress (mesurée par l'amplitude des changements de pression et de rythme cardiaque) présentèrent une incidence cumulative d'hypertension significativement plus grande que les autres participants lorsque réévalués à l'âge de 44 ans. De plus, la relation entre l'hyperréactivité et l'hypertension persista après ajustement de variables confondantes telles que le tabagisme, l'âge au début de l'étude et l'indice Quetelet.

7.3 Stress psychogénique en remplacement du *Cold pressor test*

L'emploi de la stimulation par le froid pour étudier la réponse au stress ne fait cependant pas l'unanimité. Certains auteurs soulignent que cette méthode ne stimule pas le système β -adrénergique cardiaque que l'on croit essentiel pour l'apparition de l'hypertension neurogénique (Koepke et DiBona 1985). De plus, le *cold pressor test* ne semble pas approprié pour la recherche d'une possible réponse différentielle au stress entre normotendus et hypertendus, la majorité des études ne montrant pas de différence entre sujets normaux et sujets présentant une hypertension labile (*borderline*) (Fredrikson et Matthews 1990). On sait depuis longtemps que des situations de stress psychologique telles que la guerre, les catastrophes naturelles ou simplement les conditions de vie difficiles sont associées à une augmentation de PA chez les victimes. Un test permettant de reproduire cette stimulation psychologique était donc nécessaire afin de tester la possible relation de cause à effet entre le stress psychogénique (i.e. d'origine psychologique) et le développement de l'hypertension.

Morales-Ballejo et coll. (1988) montrèrent une corrélation très forte (0.8) entre la pression artérielle au travail et la PA en réponse à 2 stress psychogéniques, soient un test standardisé de calcul mental, et lors de la participation chronométrée à un jeu vidéo

compétitif où les sujets devaient améliorer leur score malgré l'augmentation du niveau de difficulté du jeu à chaque étape réussie. La forte corrélation observée permet de croire que les 2 tests sont des marqueurs représentatifs du type de stress rencontré dans la vie courante. Ces 2 tests sont considérés comme des stimulations β -adrénergiques, alors que le *cold-pressor test* est une stimulation α -adrénergique (Morales-Ballejo *et al.* 1988).

Des paramètres autres que la PA et le rythme cardiaque furent mesurés afin de mieux caractériser cette réponse. Anderson et coll. (1987) trouvèrent une augmentation significative du flot sanguin dans l'avant-bras d'enfants de parents hypertendus en réponse à un test de calcul mental, suggérant des changements de résistance vasculaire dus au stress. Ditto et Miller (1989) observèrent le même phénomène, et notèrent en plus une corrélation significative entre le flot sanguin à l'avant-bras et le rythme cardiaque lors du stress. Finalement, le niveau d'anxiété rapporté était plus grand chez les enfants d'hypertendus. Notons que ces auteurs inclurent une séance préalable dépourvue de stress afin de contrer l'anticipation de l'expérience qui aurait pu venir fausser les résultats. Ainsi, les valeurs basales étaient identiques entre les enfants de parents hypertendus et ceux de parents normotendus. Une étude comparant un exercice physique (contraction isométrique de la main) et le test de calcul mental chez des hypertendus montra que les 2 stress provoquaient une hausse des catécholamines et de la vasopressine plasmatiques. Cependant, seul le test d'arithmétique induisit une hausse de la rénine plasmatique et du taux d'aldostérone (Sakamoto *et al.* 1992). Les auteurs conclurent que l'activation du système rénine-aldostérone-angiotensine par le stress psychogénique fait du rein un organe cible sensible au stress chez les hypertendus susceptibles. Dans un autre travail comparant les enfants de parents hypertendus à ceux de parents normotendus, l'hypoxie induisit une hausse comparable de l'activité musculaire sympathique, du rythme cardiaque, de la norépinéphrine et des niveaux d'endothéline circulant dans les 2 groupes (Noll *et al.* 1996). Cependant, le test de calcul mental n'entraîna une augmentation de l'activité musculaire sympathique, de norépinéphrine plasmatique et du taux d'endothéline que chez

les enfants d'hypertendus. L'emploi de stress psychogéniques en conjonction avec le raffinement des mesures phénotypiques a donc permis de mieux étudier la réponse au stress et de faire ressortir des différences entre individus selon leur état (hypertension) ou en fonction de l'histoire familiale positive d'hypertension.

7.4 Réponse au stress accrue comme outil prédicteur d'hypertension

Déjà en 1979, Falkner et coll. notèrent une réponse accrue des paramètres hémodynamiques chez les adolescents normotendus de parents hypertendus en réponse à un stress de nature psychologique (*mental stress*). Falkner et son groupe montrèrent que cette réponse accrue au stress psychologique permettait de prévoir quels enfants deviendront hypertendus (Falkner *et al.* 1981a). De même, Widgren et coll. (1992) ont montré une augmentation de pression diastolique significative en réponse à la contraction isométrique de la main chez des hommes normotendus avec histoire familiale positive d'hypertension (père hypertendu) par rapport à des témoins sans histoire familiale positive. La réponse était accrue par rapport aux mesures prises 5 ans auparavant, et significativement corrélée à l'augmentation de pression diastolique basale ($r=0.7$, $p<0.01$). Miller et Ditto (1991) ont montré le rôle du système sympathique dans la réponse exacerbée à un test de stress psychogénique chez de jeunes hommes avec histoire familiale positive d'hypertension. Finalement, Matthews et coll. (1993) ont suivi une cohorte d'adultes ainsi que leurs enfants sur une période de 6 ans. Après correction pour des variables confondantes comme l'âge, la PA basale, la longueur du suivie etc, ils ont trouvé que les adultes ayant présentés une réponse accrue aux tests de stress sont ceux qui ont les pressions diastoliques et systoliques les plus élevées six ans et demi plus tard. Chez les enfants, ils firent la même observation chez les garçons, mais pas les filles de la cohorte. L'âge moyen des enfants à la fin de l'étude (20 ans) explique peut-être ce dimorphisme sexuel que l'on ne retrouve pas chez les adultes. En effet, les *jeunes* filles seraient protégées, alors que leur mères ne le sont plus (âge moyen à la fin de l'étude 48

ans) à cause de l'apparition graduelle de la ménopause, et deviennent alors plus sensibles au stress quotidien. Cette approche de la mesure du stress psychogénique et de son impact sur la PA n'est donc pas qu'académique et peut être employée comme outil diagnostique prédictif de l'hypertension future chez les enfants normotendus ayant une histoire familiale positive.

Stephoe et Cropley (2000) ont combiné un test de stress et une mesure subjective du stress professionnel quotidien. Deux fois en un an, les sujets de leur étude répondirent à un questionnaire standardisé leur demandant d'évaluer leur niveau de stress professionnel. Ils ont ensuite été regroupés en 2 groupes selon qu'ils aient répondu de façon répétée qu'ils estimaient subir soit un grand stress ou un faible stress professionnel. Ainsi, Steptoe et Cropley trouvèrent que la pression artérielle d'un jour de travail (mesuré par un système ambulatoire de 9:00 à 22:30) était plus élevée chez les sujets considérant être soumis à un fort stress professionnel et montrant une réponse accrue au test de stress. Les auteurs concluent qu'une réactivité vasculaire accrue et un stress psychosocial constant peuvent agir de concert pour augmenter le risque cardiovasculaire chez les individus susceptibles. Les auteurs considèrent le stress psychosocial comme une influence extérieure (purement additive) pouvant interagir avec l'anomalie primaire (l'hyperréactivité vasculaire) pour en amplifier son effet. Ensemble, ces deux facteurs expliqueraient l'hypertension future. Un travail similaire a trouvé que l'effet prédictif de l'hyperréactivité vasculaire sur la pression se manifeste seulement chez les individus soumis à un stress psychosocial élevé *et* ayant une histoire familiale positive d'hypertension (Light *et al.* 1999). Sans minimiser l'impact du stress perçu en soi (effet additif d'une influence environnementale sur le phénotype), nous pouvons cependant affirmer que la perception d'un stress psychosocial est subjective. On pourrait donc se demander si les anomalies responsables de la réactivité vasculaire accrue pourraient aussi être responsables d'une *perception* altérée du stress? Existe-t-il une susceptibilité "globale" au stress sous-tendant ces observations? De plus, comment distinguer des

gènes de susceptibilité environnementale de gènes d'hypertension? Faut-il réellement un futur hypertendu pour que l'hyperactivité vasculaire (mesure du stress) ait un rôle à jouer (selon Light *et al.* 1999)? Il y a donc un besoin de bien définir et distinguer de l'hypertension le phénotype d'hyper-réponse au stress à l'étude ainsi que la population sur laquelle on effectue la recherche.

Notons finalement que l'hypertension de la blouse blanche (*white-coat effect*) pourrait peut-être être employée comme test de stress. On mesure cet effet de "la blouse blanche" par la différence de pression artérielle entre les mesures au cabinet du médecin et les mesures ambulatoires (Mancia *et al.* 1983). Les patients sensibles à "la blouse blanche" présenteront ainsi une pression plus élevée en présence du médecin. Cette caractéristique est particulièrement importante pour le diagnostic et le traitement chez les patients ayant une hypertension labile, n'étant hypertendus qu'en présence du médecin. En effet, si certains auteurs pensent que cette condition est bénigne (Julius *et al.* 1990, Gosse *et al.* 1993, Verdecchia *et al.* 1994 et 1997), d'autres la considèrent comme un facteur de risque cardiovasculaire (Kuwajima *et al.* 1993, Weber *et al.* 1994). Ceci est particulièrement vrai si l'on considère la corrélation observée entre une réponse au stress accrue et l'effet de la blouse blanche (Lantelme *et al.* 1998). Dans ce travail, seuls les hypertendus présentèrent une corrélation significative ($r=0.51$, $p<0.0001$) entre un stress psychogénique (jeu vidéo) et l'effet "blouse blanche". Le parallèle avec l'effet du test de stress ainsi que le fait que seuls les hypertendus démontrèrent la corrélation suggère que l'amplitude de l'effet "blouse blanche" pourrait aussi être employée comme mesure prédictive de l'hypertension.

7.5 Hyperréactivité vasculaire et maladies cardiovasculaires

La réponse accrue au stress peut donc être employée comme prédicteur d'hypertension. Cependant, on retrouve une réponse au stress exacerbée dans d'autres

pathologies. Ferrara et coll. (1991) ont montré que l'augmentation de pression due à un test de contraction isométrique ou au *cold pressor stress* est en corrélation avec la résistance à l'insuline chez des sujets obèses, alors qu'il n'y a pas de relation avec la PA au repos. De même, on a trouvé une association entre l'ischémie myocardique induite par l'exercice et l'hyperréactivité à un test de stress psychogénique chez des patients présentant des symptômes de maladie coronarienne (Kral *et al.* 1997). Middlekauff et coll. (1997) proposèrent que l'hyperréactivité du système sympathique pourrait servir de déclencheur et serait responsable de la détérioration future de la condition cardiaque. On savait que les catécholamines endogènes participent à l'hypertrophie ventriculaire gauche, une observation vérifiée sur des enfants normotendus de parents hypertendus (Trimarco *et al.* 1985). Palatini et coll. (2000) ont proposé que l'hyperactivité sympathique pouvait aussi entraîner des anomalies métaboliques pouvant affecter la taille du coeur gauche. Dans la population de Tecumseh, on a ainsi trouvé que le taux d'insuline était le déterminant principal de l'épaisseur et de la géométrie du coeur gauche chez les sujets présentant une hyperactivité sympathique (Palatini *et al.* 2000) alors que chez les sujets normaux, tel qu'anticipé, les auteurs ont trouvé que la charge hémodynamique était la principale responsable de la taille du ventricule gauche. On a aussi observé que l'augmentation de la masse ventriculaire gauche était liée à l'hyperactivité α -adrénergique lors d'un test de stress chez des enfants âgés de 8 à 17 ans susceptibles (Allen *et al.* 1997). Ces observations font ressortir le rôle prédictif possible de l'hyperactivité sympathique pour des maladies métaboliques et cardiovasculaires, et non seulement pour l'hypertension.

7.6 Modèles animaux de la réponse au stress

Chez l'animal, plusieurs stimuli peuvent induire l'hypertension. Par exemple, Kunes et coll. (1990a) ont montré que l'immobilisation chronique des avant-bras chez le singe induit une hypertension graduelle. Celle-ci se maintient même après que l'animal eut

retrouvé sa liberté de mouvement, et s'observa aussi bien chez le singe conscient que chez l'animal anesthésié. Chez le rat, un contexte expérimental conflictuel où la prise de nourriture est suivie d'un choc électrique induit une hypertension passagère (Friedman et Dahl 1977). De même, une stimulation locale de la plante des pieds par le froid obtenue en maintenant la température du fond de la cage à 0°C provoqua l'hypertension chez des rats WKY normotendus (Kanayama *et al.* 1999). Plus simplement, l'immobilisation est reconnue pour induire une hausse de pression artérielle chez le rat. On sait que les taux des enzymes responsables des étapes limitantes de la synthèse de catécholamines augmentent suite à des séances quotidiennes d'immobilisation (Kvetnansky *et al.* 1970). Chez le rat SHR, un stress psychogénique comme l'immobilisation temporaire va aussi augmenter la pression artérielle, mais cette augmentation de pression est supérieure à celle observée chez les témoins normotendus WKY (Yamori *et al.* 1969), et s'accompagne d'une modification du contenu en catécholamines du cerveau que l'on ne retrouve pas chez WKY (Nomura et Okamura 1989). McMurtry et Wexler (1981) ont observé une augmentation des taux de plusieurs paramètres biochimiques de la réponse au stress après exposition à l'éther, la chaleur et l'immobilisation, le SHR étant plus sensible que le témoin Sprague-Dawley. Dès lors, on a utilisé SHR comme modèle d'hypertension "neurogénique" telle que proposée chez l'humain (Folkow 1975 et 1982). Il faut noter que plusieurs caractéristiques anormales de cette réponse au stress accrue laissent à penser qu'elle a un rôle à jouer dans le développement de l'hypertension chez SHR. Ainsi, on a rapporté des différences localisées dans le flot sanguin en réponse au stress entre SHR et WKY (Yamamoto *et al.* 1987, Kirby *et al.* 1987). De même, on a noté une augmentation accrue de l'activité sympathique des nerfs rénaux associée à une rétention de sodium (Koepke et DiBona 1985).

Il est ainsi possible que le stress en soi provoque des changements structurels qui à leurs tours entraîneront l'hypertension et/ou l'adaptation au nouvel environnement. La réponse différentielle au stress dépendra de la nature, de la fréquence et/ou de l'intensité

du stress. Dans le cas d'un stress standardisé, une réponse différentielle entre 2 souches consanguines pourra donc traduire une *réponse* altérée. Cependant, il se pourrait aussi que la *perception* du stress conditionnant la réponse au stress puisse aussi être variable (i.e. réponse au stress normale, perception altérée). Ainsi, un gène de susceptibilité environnementale pourra être un gène de perception de l'environnement. Shechtman et coll. (1999) ont montré une augmentation de la réponse vasculaire de l'artère de la queue chez le rat suite à une exposition de 4 semaines au froid (5 ± 2 °C) en parallèle à une hausse de PA. Donc, par exemple, si des variations dans ce changement de réactivité vasculaire se répercutaient par des variations parallèle de PA, des différences entre souches de rats pourraient traduire une différence dans la perception du stimulus, et non pas nécessairement seulement dans la capacité à augmenter la pression. Ainsi, la dissociation entre le phénotype étudié (réactivité vasculaire) et la réponse finale (changement de pression) est essentielle pour différencier une *susceptibilité génétique* d'une *réponse génétique*.

À l'appui du postulat voulant que la perception du stress puisse être le reflet d'une réelle différence génétique, Shechtman et coll. (1990) ont montré que l'hypertension induite par le froid ne se produisait que sous un certain seuil de température qu'ils ont évalué entre 5 et 9°C. Ainsi, nous pouvons proposer qu'un changement altérant la perception de ce seuil de température pourrait en conséquence modifier la réponse au froid associée (hypertension). Ce serait la démonstration d'une susceptibilité environnementale.

7.7 Concept de susceptibilité génétique au stress

Ainsi, l'hypertension induite par tous ces agents stressants pourra être passagère ou de plus longue durée. La stimulation constante du système sympathique au delà d'un certain seuil pourra provoquer une augmentation graduelle de la PA, et possiblement des modifications permanentes du système cardiovasculaire expliquant une hypertension irréversible (Kunes *et al.* 1990a, Markel' 1985). Ces caractéristiques définissent

l'hypertension neurogénique. Cet état serait donc le reflet de diverses influences environnementales sur le système cardiovasculaires. Donc, nous postulons que la réponse *différentielle* à un *même* agent stressant pourra traduire une susceptibilité différentielle d'origine génétique entre individus. Ainsi, dans cette thèse, nous nous proposons de rechercher les déterminants génétiques de la susceptibilité au stress dans l'hypertension.

8. TEMPÉRATURE AMBIANTE ET MODULATION DE LA TEMPÉRATURE CORPORELLE. EFFETS SUR L'INCIDENCE DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES, ET RÔLE DANS LA RÉPONSE AU STRESS

La température ambiante est sans doute une des plus importantes influences environnementales auxquelles nous faisons face quotidiennement. Chez les mammifères, le maintien de la température corporelle à une valeur précise est essentielle à la survie, et la déviation minime de la cible de température a des conséquences dramatiques sur l'homéostasie de l'organisme. C'est ainsi que l'organisme dispose de moyens divers et variés pour atteindre et maintenir cette cible. Pensons aux cycles dits "futiles" présents même chez l'insecte, au frissonnement (contraction musculaire) augmentant la chaleur produite, ou encore à la sudation qui inversement permet de refroidir le corps rapidement pour éviter "la surchauffe". On comprendra dès lors l'importance du bon fonctionnement de ces mécanismes pour la survie de l'organisme. La température ambiante peut donc être perçue comme un stress auquel l'organisme doit s'adapter rapidement et constamment. Finalement, on peut se demander quel est l'impact à long terme de conditions extrêmes de température sur l'organisme. En effet, les individus les moins bien adaptés aux variations de température vont-ils voir leur condition se détériorer?

8.1 Températures saisonnières, impact sur la mortalité et sur l'incidence des maladies cardiovasculaires

On sait depuis longtemps qu'il existe une corrélation inverse entre la température extérieure moyenne et la pression artérielle (Rose 1961, Hata *et al.* 1982). Brennan et coll. (1982) en Angleterre ont trouvé que les pressions artérielle systolique et diastolique de patients faiblement hypertendus sont significativement plus élevées pendant les mois d'hiver. Ces observations furent effectuées chez les patients non-traités ou recevant une médication, et n'étaient pas affectées par le type de médication. De plus, ces variations saisonnières étaient plus grandes chez les sujets âgés. À Montréal, où la température extérieure moyenne annuelle varie de -24°C à 27°C , on a compilé et analysé les valeurs de pressions artérielles diastoliques et systoliques de 2000 patients hypertendus mesurées sur une période de 3 ans, pour un total de 42,813 lectures de PA (Kunes *et al.* 1991)! Les résultats indiquèrent une corrélation négative significative entre la pression artérielle et la température extérieure moyenne. Ainsi, en hiver, les pressions artérielles systolique et diastolique furent respectivement de 7 et 3 mm Hg plus élevées en moyenne. Les auteurs conclurent à un impact significatif de la thermosensibilité sur la pression artérielle.

Dans une étude randomisée contrôlée, 2 groupes de patients ont participé à un protocole où la PA était mesurée pendant la saison froide et la saison chaude, la séquence de mesures étant inversée pour chaque groupe (Giacconi *et al.* 1989). Ici encore, la PA moyenne était plus élevée de 5 à 10 mm Hg pendant la saison froide, suggérant un effet de la température extérieure sur la pression sanguine. On a aussi noté une relation inverse entre la température extérieure et l'incidence de diabète de type I (DERI group 1988). Dans ce travail, on rapporte une plus grande incidence de diabète dans les pays nordiques, l'influence de la température restant significative après correction pour, et indépendamment de l'ethnicité.

Finalement, il est important de souligner que dans beaucoup de pays, la mortalité hivernale est 10-25% supérieure à celle du reste de l'année (Curwen 1991). De multiples

paramètres pourraient expliquer ce phénomène, mais seule la température montra une association constante qui plaide pour un lien de causalité (Rogot et Padgett 1976, Wyndham et Fellingham 1978, Curwen et Devis 1988, Curwen 1991, Kunst *et al.* 1993). De plus, il semblerait que la pente de cette association soit d'autant plus forte chez les populations habitant des régions où le chauffage central est moins répandu, et ce malgré le fait que les hivers y soient généralement plus doux (Wyndham et Fellingham 1978). La rapidité des changements de température et la capacité à maintenir la température constante semblent donc jouer un rôle important. Finalement, mentionons que la température ambiante intérieure a aussi été inversement associée à la santé cardiovasculaire, une baisse de 4°C étant associée à une hausse de pression systolique de 5 mm Hg se traduisant par une augmentation du risque cardiovasculaire de 5% (Woodhouse *et al.* 1993). Par exemple, au Pays-Bas, la mort cardiovasculaire semble associée à la température froide alors que les décès de maladies respiratoires sont liés à la chaleur (Kunst *et al.* 1993, Khaw 1995). Si la capacité d'adaptation rapide à un nouvel environnement est donc une condition essentielle à la santé, sinon à la survie, la démonstration d'un lien de causalité entre la température extérieure et l'incidence de certaines pathologies soulignerait l'importance de la température comme le paramètre environnemental principal auquel l'organisme doit s'adapter. Malgré nos vêtements, le chauffage central et nos habitations modernes, la température ambiante resterait encore un modulateur puissant de notre physiologie.

8.2 Thermosensibilité dans l'hypertension

Schlager (1974) nota que les souris spontanément hypertendues (*SHM*, *spontaneously hypertensive mouse*) étaient plus sensibles à la chaleur que les souris témoins. Le rat SHR présente aussi cette thermosensibilité accrue (Wilson *et al.* 1977, Wright *et al.* 1978, McMurtry et Wexler 1983). La thermosensibilité persiste dans les cellules de muscle lisse en culture et s'observe aussi chez les cardiomyocytes néonataux,

indiquant un défaut primaire non consécutif à la haute pression artérielle, et suggérant un rôle possible dans la pathologie (Hamet *et al.* 1985). Malo et coll. (1989) ont montré l'existence d'un locus de thermosensibilité (*tms*) associé à l'hypertension chez SHM. Lorsque plongés dans un bain à 44°C, les souris SHM montrèrent une augmentation de température corporelle significativement plus rapide que les animaux témoins ($1.74 \pm 0.04^\circ\text{C}$ vs $1.13 \pm 0.03^\circ\text{C}$ d'augmentation par minute, $p < 0.001$), et leur survie fut réduite, suggérant un défaut du contrôle de la température corporelle chez ces animaux. Soulignons le parallèle avec les observations chez l'humain où les changements de température sont aussi associés à l'hypertension et à la mortalité cardiovasculaires. De façon intéressante, l'exposition chronique des souris SHM à une température non létale de 40°C pour 5 minutes pendant 20 jours a pour effet de réduire la pression artérielle de 20 mm Hg chez les animaux traités, indépendamment de l'habituación aux conditions expérimentales (Malo *et al.* 1990). De plus, lors de l'arrêt du traitement, la pression artérielle est remontée au niveau de celle des animaux manipulés mais non chauffés. Cette expérience démontre bien l'impact réversible de la température sur la pression artérielle et possiblement sur d'autres paramètres cardiovasculaires.

8.3 Stress psychogénique et température corporelle

Plusieurs travaux ont rapporté une élévation de la température corporelle lors de stress psychogéniques, aussi bien chez le rat (Gollnick et Iannuzzo 1968, Briese et Quijada 1970, Stewart et Eikelboom 1979, Singer *et al.* 1986), la souris que chez le lapin (Snow et Horita 1982). De même, chez l'Homme, un stress psychologique, en plus de provoquer une hausse de PA et de fréquence cardiaque produit aussi une augmentation significative de température corporelle (Marazziti *et al.* 1992).

Rappelons que l'immobilisation, considérée comme un stress psychogénique, produit des hausses de pression et de rythme cardiaque chez le rat, et que celles-ci sont supérieures chez SHR que chez les témoins normotendus (Yamori *et al.* 1969).

L'immobilisation chez SHR s'accompagne aussi d'une hausse de température supérieure à celle observée chez WKY (Berkey *et al.* 1990, Morley *et al.* 1990). Berkey et coll. (1990) ont noté qu'à température ambiante (25°C), la température corporelle mesurée par télémétrie n'est pas différente entre SHR et WKY, alors que d'autres ont mesuré une température basale plus élevée chez SHR (Price et Wilmoth 1990). Cependant, après une exposition d'une heure à 40°C, les SHR montrèrent une température corporelle significativement plus élevée que les témoins WKY (Berkey *et al.* 1990). Wilson et coll. (1977) suggèrent que le seuil de température est altéré chez SHR, expliquant ainsi sa réponse anormale. Price et Wilmoth (1990) notèrent une plus grande sensibilité vasculaire à la norépinéphrine chez SHR alors que O'Leary et Wang (1994) montrèrent que le réflexe de vasodilatation cutané au niveau de la queue (organe de thermorégulation chez le rat) est diminué chez SHR. Ces 2 mécanismes pourraient expliquer une augmentation de température supérieure lors d'un stress psychogénique, en parallèle à l'incapacité à diminuer la température rapidement à la suite du stress chez SHR. La réponse thermique accrue au stress d'immobilisation de SHR n'est donc peut-être pas seulement due à un seuil de température basale plus élevé. Cette réponse accrue de la température corporelle lors du stress d'immobilisation pourrait donc servir de marqueur de la susceptibilité au stress chez SHR.

9. GÈNES DE STRESS ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES

La réponse cellulaire au stress se caractérise par l'expression spécifique de gènes de stress. D'abord observée suite à un choc thermique chez la drosophile, ces protéines, que l'on croyait alors spécifique au choc thermique, furent appelées protéines du choc thermique ou HSP (*Heat Shock Protein*) (Pour revue, voir Schlesinger 1990 et Welch 1993). Depuis, on sait qu'une variété d'agents stressants activent la synthèse des HSP qui sont maintenant plus justement dénommées protéines de stress. Les HSP sont des

protéines ubiquitaires. On les retrouve chez les bactéries aussi bien que chez l'homme et les végétaux. La réponse cellulaire au stress semble donc très ancienne et essentielle à la survie des organismes, les HSP étant parmi les protéines dont la séquence est la plus conservée dans l'évolution. En plus de leur fonction dans la réponse cellulaire au stress, les HSP jouent aussi un rôle en conditions physiologiques normales, étant essentielles au bon déroulement du cycle cellulaire, du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire. Les HSP sont regroupées en 4 familles de protéines selon leur poids moléculaire, protéines de 27, 70, 90 et 110 kilodaltons. Suite à un stress, la transcription des gènes de stress est activée. Un déterminant majeur de cette activation est le facteur de transcription HSF (*Heat Shock Factor*) qui va se lier spécifiquement à une région du promoteur des gènes de stress, le HSE (*heat shock element*). HSF serait le "thermomètre" cellulaire reconnaissant les chocs thermiques et les états de stress (Zhong *et al.* 1998).

9.1 Expression tissu-spécifique des gènes de stress *in vivo*, interaction et coopération entre la réponse au stress cellulaire et "générale" de l'organisme

La coordination de la réponse au stress est essentielle à la survie afin de permettre l'adaptation rapide et les réactions quasi-réflexes de lutte ou de fuite (*fight or flight*) face à une situation nouvelle. Chez les mammifères, cette adaptation rapide requiert l'intervention séquentielle de l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien (HPS) en parallèle à l'activation du système sympathique. Ainsi, face à un stress, la corticolibérine (CRH) est sécrétée par l'hypothalamus dans le système porte hypophysaire et stimule la libération d'adrénocorticotropine (ACTH) par l'hypophyse antérieure. L'ACTH ainsi libérée va ensuite se lier à son récepteur surrénalien pour stimuler la sécrétion de glucocorticoïdes.

Les expériences *in vivo* de Malo et coll. (1988 et 1989) chez la souris hypertendue SHM ont montré une synthèse et une disparition plus rapide de l'ARNm et de la protéine de *hsp70* chez cette souche. De plus, cette expression anormale s'observa dans des organes important pour la réponse cardiovasculaire comme le coeur et le rein (Hamet *et al.* 1990 et 1991). Ils proposèrent donc que l'expression anormale de *hsp70* pouvait expliquer en partie la réponse au stress altérée chez cette souche, faisant un lien entre la réponse au stress de l'organisme et la réponse cellulaire.

Udelsman et coll. (1991) ont aussi étudié l'interaction possible entre cette réponse au stress "systémique" et la réponse au stress cellulaire. Les auteurs ont ainsi regardé l'expression de l'ARNm de *hsp70* suite à un stress chirurgical (laparotomie) chez des rats Wistar. Seules l'aorte, la surrénale et la veine cave montrèrent un niveau d'expression de *hsp70* significativement supérieur (20 fois) à celui des organes des animaux témoins. L'expression de *hsp70* fut rapide (30 minutes), et maintenue jusqu'à 3 heures après la chirurgie. La réponse surrénalienne fut parallèle à la réponse de l'axe HPS et se manifesta seulement dans le cortex. La surrénale étant un organe impliqué dans la réponse au stress systémique, il n'était sans doute pas surprenant d'y constater l'activation de la réponse au stress cellulaire. Cependant, l'expression de *hsp70* dans l'aorte et la veine cave suggéra un rôle des vaisseaux dans l'adaptation du système cardiovasculaire au stress. L'emploi du stress d'immobilisation chez le rat, considéré comme un stress psychogénique stimulant l'axe HPS a ensuite permis d'évaluer *in vivo* l'effet d'un stress systémique chez l'animal éveillé (Blake *et al.* 1991 et 1995). Dans ce travail, l'expression de *hsp70* fut observée dans le cortex surrénalien. De plus, son abolition par hypophysectomie et sa restauration par supplémentation d'ACTH montra l'importance de l'axe HPS dans l'expression surrénalienne de *hsp70* suite au stress d'immobilisation. Ces chercheurs montrèrent ensuite que l'immobilisation chez le rat stimulait aussi l'expression spécifique de *hsp27* et *hsp70* dans les vaisseaux, cette stimulation étant sous contrôle adrénérgique, alors que l'expression surrénalienne est dépendante de l'ACTH (Udelsman *et al.* 1993,

1994 et 1994a). Cependant, il semblerait que ces 2 mécanismes soient aussi modulés par le système dopaminergique, Blake et coll. (1993) ayant montré qu'une stimulation par un agoniste dopaminergique pouvait induire *hsp70* dans la surrénale et l'aorte en l'absence de stress exogène (immobilisation). Cette expression des *hsps* n'est pas seulement parallèle à la réponse au stress mais essentielle à son bon fonctionnement. Mentionons par exemple la présence de *hsp90* comme composant facilitateur de la réponse hormonale par sa liaison au récepteur aux stéroïdes (Picard *et al.* 1990), ou plus récemment son rôle de médiateur du rapport de l'oxyde nitrique et de l'anion superoxyde synthétisés par la NO synthétase endothéliale (Pritchard *et al.* 2001). Les protéines de choc thermiques semblent donc avoir un rôle essentiel à jouer dans l'homéostasie de l'organisme et l'intégration cellulaire de la réponse au stress.

9.2 Protéines de stress et maladies

On a noté une abondance accrue des HSP dans plusieurs pathologies de même que des anticorps anti-HSP dans certaines maladies (pour revue, voir Minowada et Welch 1995). Par exemple, Zhu et coll. (2001) ont montré la présence d'anticorps anti-HSP60 chez 75% des patients atteints d'artériosclérose qu'ils ont étudiés. De plus, la présence et la quantité d'anticorps présents étaient en corrélation avec la sévérité de l'atteinte. Les auteurs concluent à un rôle de HSP60 dans la composante autoimmune de l'artériosclérose. Pockley et coll. (2000) ont proposé que les HSP60 circulant étaient associées à la génèse des maladies cardiovasculaires, ayant observé une augmentation des HSP60 circulant chez des patients présentant une hypertension labile. De plus, dans ce travail, les taux de HSP60 étaient proportionnels à l'épaisseur de l'intima et de la média, suggérant un rôle dans les processus pré-athérosclérotiques. Une expression anormale de HSP70, observée dans l'hypertrophie cardiaque, pourrait traduire un dérèglement du cycle cellulaire responsable de la maladie (Dilman *et al.* 1986). Ce rôle de HSP70 comme modulateur du cycle cellulaire a aussi été proposé dans certains cancers, les cellules

tumorales présentant des quantités supérieures de HSP70 que les cellules saines (Morimoto *et al.* 1990).

Il est cependant difficile de proposer un rôle aux HSP suites à ces observations. En effet, leur présence accrue, particulièrement dans la circulation pour HSP60, est-elle la conséquence d'une lésion (i.e. d'un stress)? Les HSP agissent-elles comme chaperons moléculaires dans ces situations (rôle bénéfique)? Ou encore, les HSP sont-elles la cause des changements pathologiques observés? Il semble cependant que les HSP aient un rôle important à jouer dans le système cardiovasculaire, en particulier suite à la découverte de cvHSP (*cardiovascular HSP*), une petite HSP de 170 acides aminés dont l'expression est spécifique aux organes cardiovasculaires et aux tissus sensibles à l'insuline (Krief *et al.* 1999).

9.3 Protéines de stress et hypertension (Hamet *et al.* 1990a)

Nous avons vu que les modèles génétiques d'hypertension comme le rat et la souris spontanément hypertendus (SHR et SHM respectivement) sont plus sensibles au stress thermique que leur témoins respectifs. Hamet et coll. (1990) ont été les premiers à observer une accumulation accrue et plus rapide de l'ARNm de *hsp70* chez SHM *in vivo* suite à un stress thermique. Ainsi, *hsp70* devenait un candidat sérieux pour expliquer la thermosensibilité des souris SHM (voir chapitre 8.2).

Chez le rat, l'haplotype RT_{1k} du complexe majeur d'histocompatibilité de SHR est associé à l'hypertension (Pravenec *et al.* 1989). De même, Gerbase-DeLima et coll. (1989) ont montré que certains antigènes d'histocompatibilité sont hérités avec une fréquence plus élevée chez les humains hypertendus. Le gène *hsp70* est localisé à l'intérieur du complexe RT₁, et présente un polymorphisme entre SHR et les souches normotendus Wistar, SD, WKY et BN (Hamet *et al.* 1992). Les animaux congéniques SHR.BN^{1N} portant le complexe majeur d'histocompatibilité de BN ont une pression artérielle inférieure à celle des témoins SHR alors qu'à l'inverse, les animaux BN.SHR^{1K}

portant le complexe RT_{1K} de SHR ont une pression plus élevée que BN (Hamet *et al.* 1992). Dans des cellules de muscle lisse en culture soumise à un choc thermique de 7 minutes à 42°C, l'accumulation de *hsp70* est plus rapide, et la disparition du message plus lente chez SHR que chez les cellules de WKY témoins. Cette synthèse augmentée est précédée d'une activation plus rapide du facteur de transcription spécifique *hsf1* chez SHR (ou *hstf1*, *heat shock transcription factor 1*), suggérant un défaut de réponse au stress chez celui-ci (Hashimoto *et al.* 1991).

D'autre part, l'hypertension expérimentale induite par une variété de substances (phényléphrine, dopamine, vasopressine, angiotensine II et endothéline-1) va induire l'expression de *hsp70* dans l'aorte (Xu *et al.* 1995). Dans ce travail, l'induction de *hsp70* fut proportionnelle aux niveaux de PA atteints, suggérant une expression de *hsp70* secondaire à la pression artérielle. De plus, cette expression accrue fut consécutive à l'activation du facteur de transcription spécifique HSF1 (Xu *et al.* 1996). Ces résultats militent donc pour un rôle protecteur de *hsp70* sur les vaisseaux.

Finalement, Kunes et coll. (1992) ont observé une expression accrue de *hsp70* dans les lymphocytes humain de patients hypertendus suite à une stimulation *ex vivo* à 42°C par rapport aux témoins normotendus. Le gène *hsp70*, polymorphique, est donc un candidat sérieux pour ces réponses différentielles. Cependant, le gène de *TNF α* (*tumor necrosis factor alpha*), aussi localisé à l'intérieur de RT₁, est un autre candidat potentiel. Récemment, Pausova et coll. (2000) ont observé une contribution du locus de *TNF α* à l'obésité et à l'hypertension associée à l'obésité dans la population canadienne-française du Lac St-Jean. Finalement, on sait que les cellules musculaires lisses en culture de SHR ont un cycle cellulaire accéléré et croissent plus que les cellules témoins WKY, atteignant une densité cellulaire plus élevée (Hadrava *et al.* 1989). On croit que cette hyperprolifération, présente avant la hausse de pression artérielle chez le nouveau-né de plusieurs souches de rats hypertendus, est de nature génétique (Pang *et al.* 1986). Elle

pourrait expliquer en partie l'épaississement des vaisseaux responsables de l'augmentation de résistance vasculaire périphérique observée dans l'hypertension essentielle. Cette croissance accrue et accélérée s'accompagne d'une augmentation de transcription de *TGFβ1* et de *hsp70*, ces deux gènes pouvant donc être impliqués dans l'hyperprolifération observée chez SHR (Tremblay *et al.* 1991). Dans l'hypertension génétique (SHR), la réponse anormale de *hsp70* semble donc être intrinsèque et non seulement secondaire à la pression comme l'ont proposé Xu et coll. (1995 et 1996).

9.4 Importance clinique de la réponse des protéines de stress

À cause de la présence ubiquitaire des protéines de stress, de leur surexpression dans plusieurs pathologies ainsi que du rôle de chaperon moléculaire qu'on leur prête (Ellis 1990, Skowrya *et al.* 1990), plusieurs auteurs ont suggéré qu'elles pourraient être utilisées pour protéger les cellules des stress non léthaux. La prévention de dommages irréversibles lors de l'ischémie/reperfusion est une des applications thérapeutiques proposées de la surexpression des gènes de stress. Ainsi, Donnelly et coll. (1992) ont montré que l'on pouvait prévenir significativement les dommages au myocarde lors de l'ischémie/reperfusion par un pré-traitement de tout le corps à la chaleur. Un traitement similaire induisant la thermotolérance chez un modèle de rat du syndrome de détresse respiratoire de l'adulte a aboli la mortalité (27% de mortalité chez les témoins) (Villar *et al.* 1993). Mais l'expérience la plus intéressante selon nous a été réalisée par Miller et coll. (2000). En prophylaxie, les auteurs ont traité un patient souffrant d'hypertension labile par un traitement d'hyperthermie par immersion. Le patient fut suivi pendant 12 ans consécutifs, et soumis à 1576 immersions en bain chaud. Les auteurs se sont assurés que la fièvre induite durait chaque fois 15 minutes, pour des températures comprises entre 38.2 et 38.6°C, suffisantes pour induire l'expression de *hsp72* dans les lymphocytes. Sans avoir une preuve absolue du lien de causalité, les auteurs notèrent que le patient ne

présentait aucun dommage aux organes cibles tel qu'attendu à ces niveaux d'hypertension.

10. LIGNÉES RECOMBINANTES CONSANGUINES

Les lignées recombinantes consanguines (*Recombinant Inbred Strains*, RIS), sont des répliques consanguines de la génération F₂. Comme chez les animaux de génération F₂, les RIS permettent de cartographier un génome et d'étudier les relations phénotypes-génotypes. Ainsi, la ségrégation génétique d'un phénotype avec un génotype permettra la localisation chromosomique de traits quantitatif (QTLs). Cependant, parce qu'elles sont des lignées consanguines (à la différence des animaux de génération F₂ qui sont tous uniques), les RIS permettent de calculer une moyenne phénotypique, minimisant ainsi l'impact de la variance environnementale sur le phénotype à l'étude. Chez les mammifères supérieurs où cet outil a été employé, (souris et rats), les RIS s'obtiennent par croisements frères-soeurs d'animaux F₂ sur 20 à 30 générations (pour établir la consanguinité). De plus, une des 2 lignées progénitrices pourra présenter la pathologie d'intérêt. Ainsi, par croisement génétique, le génome morbide sera "disséqué et dilué" par l'autre génome, permettant ainsi de localiser les régions chromosomiques associées à la pathologie étudiée. Notons aussi qu'il n'est pas toujours nécessaire d'avoir *a priori* une différence phénotypique entre les 2 lignées progénitrices dans la mesure où le mélange des 2 génomes permettra de révéler des phénotypes "invisibles" (masqués) ou nouveaux. C'est le principe même de l'interaction génétique. Il est cependant impératif de choisir des lignées consanguines génétiquement distantes (polymorphiques), sans quoi la cartographie fine des locus morbides sera impossible.

Chez les mammifères, la recherche et le développement des outils génétiques dont les RIS se sont principalement effectués chez la souris. Ainsi, déjà en 1989, 24 séries de lignées RIS étaient disponibles chez la souris dont 5 possédant au moins 20 lignées

(Taylor 1989). L'avantage théorique des RIS pour l'approche de phénotypes polygéniques de même que pour l'étude de traits quantitatifs continus a vite été reconnu (Taylor 1976, Klein 1978). Elles ont cependant été développées pour la détection d'effets majeurs, et longtemps cantonnées dans la localisation de phénotypes monogéniques présentant une distribution bimodale (Bailey 1971). Le principe de l'utilisation des lignées RIS pour l'analyse de phénotypes quantitatifs continus est le même que chez les croisement F_2 , soit l'évaluation de la corrélation entre la variation phénotypique et la variation allélique d'un marqueur. Cependant, chez les lignées RIS, l'analyse est plus simple puisque chaque marqueur polymorphique sera homozygote pour l'allèle de l'un ou de l'autre des progéniteurs. Ainsi, si A et B sont les 2 progéniteurs, on attribuera la valeur de 0 et 1 respectivement à l'allèle AA et BB de chaque marqueur polymorphique. Pour un trait monogénique, les valeurs phénotypiques chez les RIS auront une distribution bimodale, la moitié des souches ressemblant au parent A, et l'autre moitié au parent B. Un marqueur présentant la même distribution bimodale qualitative sera donc en liaison avec le phénotype. Cependant, pour un trait quantitatif continu, il faudra calculer la corrélation entre les valeurs phénotypiques et la variation allélique pour chaque marqueur. C'est l'équivalent d'effectuer un test de Student entre 2 groupes de souches. Alternativement, la corrélation de Pearson pourra être employée. On aura alors en plus, la direction de la corrélation, c'est à dire quel progéniteur contribue positivement à l'association.

Cependant, alors que l'on peut bénéficier de 200-300 méioses informatives pour un croisement F_2 (nombre moyen d'animaux disponibles), la localisation de QTL chez les RIS est limitée par le nombre de lignées disponibles pour un même groupe de RIS. Ainsi, chez la souris, plusieurs jeux de RIS comprennent moins de 10 souches, i.e. donc moins de 10 méioses informatives. Cependant, ce désavantage est compensé comme nous l'avons dit par la fiabilité des mesures phénotypiques, mais aussi par la plus grande densité de marqueurs cartographiés. En effet, les résultats obtenus chez les RIS peuvent

toujours être réanalysés à mesure que de nouveaux marqueurs sont cartographiés, ou même répétés étant donné la disponibilité et la stabilité des souches dans le temps. À l'inverse, un croisement F_2 demandera un effort de génotypage beaucoup plus grand (N 300) dont la valeur se mesurera à la qualité des mesures phénotypiques, et dont presque toute l'utilité disparaîtra à la mort des animaux.

L'utilisation de RIS, de rétro-croisements (*backcross*) ou de croisements F_2 pour une recherche de QTL devra se baser sur des analyses coût-bénéfices, ou se fera en fonction des besoins expérimentaux. C'est ici que le choix du phénotype devient déterminant, le calcul de l'héritabilité devant être maximisé. En effet, Belknap (1998) a montré que la puissance statistique d'une recherche de QTL chez 25 RIS avec 10 animaux par souche était équivalente à l'emploi de 160 animaux F_2 pour un phénotype ayant une héritabilité de 0.2. Cependant, il ne faudra que 55 animaux F_2 si l'héritabilité est de 0.6. Il conclue donc qu'il y a peu d'avantage à augmenter le nombre d'animaux par souche si l'héritabilité est grande (même si N tend vers l'infini). Il montre que 4 à 6 animaux RIS par souche (pour un jeu de 25 souches) suffisent, et équivalent respectivement à 150-200 animaux F_2 , pour une héritabilité théorique de 0.1. Finalement, il convient de nuancer l'affirmation voulant que l'utilisation des RIS souffre du petit nombre de méioses "informatives" correspondant au nombre de souches. En effet, avant l'établissement de la consanguinité, chaque génération permet d'accumuler des "événements de recombinaison", étendant ainsi la carte génétique 4 fois par rapport aux croisements habituels, et permettant une localisation plus fine des QTL (Bailey 1981). Le nombre de méioses informatives sera donc fonction du nombre de souches disponibles et du nombre de générations. Cette augmentation de la chance de recombinaison entre locus voisins fera en sorte que seuls les locus fortement liés resteront associés, diminuant ainsi la chance d'une erreur de type I, que ce soit pour la cartographie de nouveaux locus ou la recherche de QTL (PE Neumann 1992). En conclusion, afin de maximiser les résultats attendus, l'emploi de lignées RIS pour la recherche de QTL doit s'effectuer sur des phénotypes

ayant une grande héritabilité, porter sur le maximum de RIS disponibles (membres d'un même jeu), et ne requiert que 4 à 6 animaux par souche.

Plusieurs groupes ont utilisé avec succès des RIS de souris pour l'étude de phénotypes quantitatifs. Ces travaux ont cherché à caractériser divers comportements par la découverte de QTL associés: activité en milieu découvert i.e. *open-field activity*, (Plomin *et al.* 1991, Tarricone *et al.* 1995, Flint *et al.* 1995), psychopharmacologie de l'abus de substances illicites (amphétamine, morphine) ou d'alcool (Crabbe *et al.* 1983, Gora-Maslak *et al.* 1991, Belknap *et al.* 1993), pharmacogénétique de la réponse aux benzodiazépines (Mathis *et al.* 1995). D'autres travaux ont porté sur des métabolismes ou maladies plus facilement quantifiables que le comportement. Notons, les résultats de Traina-Dorge et coll. (1985) regardant le contrôle de l'expression de virus responsables de tumeurs de la glande mammaire, une étude de longévité (Gelman *et al.* 1988), un travail cherchant les locus responsables de la variabilité naturelle du nombre de neurones chez la souris (Williams *et al.* 1998) ou encore une recherche sur les susceptibilités à l'infection utilisant une variante des RIS, les lignées recombinantes congéniques (Fortin *et al.* 2001). Ces recherches montrent bien l'indiscutable valeur des lignées RIS pour l'analyse génétique de phénotypes quantitatifs.

10.1 Lignées recombinantes consanguines chez le rat, lignées B×H/H×B

Comme nous l'avons souligné, la recherche sur l'hypertension a longtemps utilisé le rat SHR et sont témoins normotendu WKY pour des études descriptives comparant les 2 souches afin d'en souligner les dissemblances, l'objectif ultime étant de trouver les causes de l'hypertension chez SHR et d'appliquer les découvertes à l'humain. Cependant, les 2 souches n'ayant pas été développées en parallèles, certaines des différences phénotypiques, même si elles jouent un rôle dans le contrôle de la PA, peuvent n'être dues qu'à l'absence de parenté entre les 2 souches. Plusieurs groupes ont

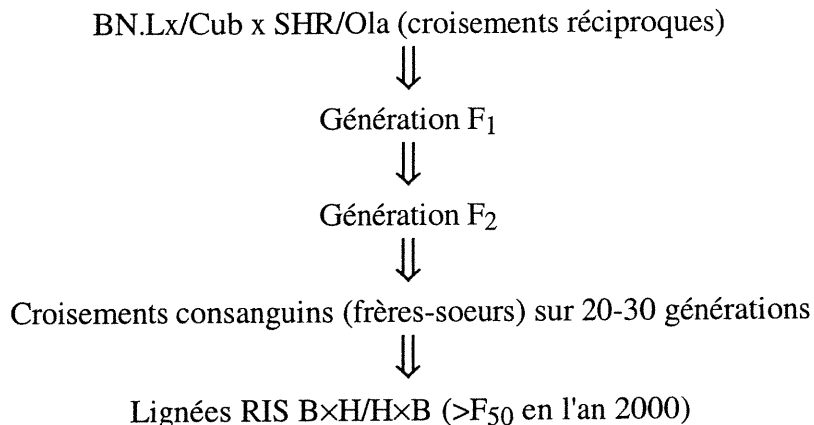
aussi utilisés les croisements entre SHR et WKY pour étudier l'étiologie de l'hypertension chez le rat SHR (on se reportera au Tableau II pour les références concernant ces travaux). Cependant, dans ce cas, c'est la trop grande parenté entre les 2 souches qui réduit considérablement leur utilité pour l'étude de la génétique de l'hypertension. En effet, Jacob et coll. (1995) ont publié une carte génétique du rat basée sur des marqueurs polymorphiques entre BN et SHR. En considérant le polymorphisme entre ces 2 souches comme étant la valeur "standard" de 100%, ils ont montré que la plupart des autres souches montraient un polymorphisme de 50% avec BN et SHR. L'analyse de séquences répétitives chez WKY ne révéla que 35% de polymorphisme avec BN ou SHR (Jacob *et al.* 1995). Ce faible polymorphisme signifie qu'il sera difficile ou impossible de localiser finement (ou simplement de localiser!) de possibles QTLs en utilisant les croisements WKY/SHR étant donné la faible quantité de marqueurs informatifs.

Les lignées RIS de rats B×H/H×B (croisements réciproques), furent développées dans les années 1970 - 80 par Kren, Pravenec et coll. à partir des souches consanguines BN.Lx et SHR (Kren 1975, Pravenec *et al.* 1989). La souche BN.Lx est une souche congénique possédant une partie du chromosome 8 du rat polydactyle (PD/Cub), alors que la souche SHR employée provient de la colonie maintenue à l'Université Charles de Prague depuis plus de 20 ans. Cette dernière souche a originellement été acquise de la compagnie Olac (Angleterre) qui l'avait elle même obtenue du *National Institute of Health* américain, et en était à la génération F₄₈ lors de son établissement à Prague. Les lignées progénitrices étaient donc consanguines au moment de la création des RIS.

Les souches RIS B×H/H×B sont les seules RIS de rats disponibles, et permettent l'étude génétique de l'hypertension et des complications associées. À l'origine, 92 méioses informatives provenant des 46 souches produites permirent la construction d'une carte de liaison génétique du génome du rat (Jacob *et al.* 1995). Aujourd'hui, seules 32 souches subsistent (Pravenec *et al.* 1995) suite à des problèmes de reproduction,

d'infection ainsi que par sélection délibérée. En effet, les lignées RIS B×H/H×B ont à l'origine été construites pour la recherche des déterminants génétiques impliqués dans la morphogénèse des membres. L'emploi d'une souche présentant le syndrome de polydactylie/luxation (BN.Lx) était donc un élément essentiel dans l'élaboration de lignées RIS *morphologiquement informatives*, la recherche sur l'hypertension ne venant qu'en second lieu. C'est ainsi que seules les lignées RIS présentant "en apparence" le plus grand intérêt pour les études morphologiques furent gardées. Faute d'espace et de moyens, une dizaine de lignées furent donc perdues (V. Kren, communication personnelle). Le Tableau III résume la nomenclature des souches B×H/H×B, et la Figure III illustre schématiquement les principes qui sous-tendent la création des lignées RIS, soient la production de lignées ségrégantes ainsi que la consanguinité obtenue par croisement frères-soeurs des rats de génération F₂.

TABLEAU III**Construction des lignées $B \times H / H \times B$**



• **Lignées B×H**, croisement d'une femelle BN.Lx/Cub avec un mâle SHR/Ola, anciennement souches "C" pour Université Charles.

• **Lignées H×B**, croisement d'une femelle SHR/Ola avec un mâle BN.Lx/Cub, anciennement souches "A" pour Académie des Sciences.

Nomenclature des lignées disponibles (génotypes et/ou phénotypes).

Lignées B×H

B×H02
B×H03
B×H05
B×H06
B×H08
B×H09
B×H10
B×H11
B×H12
B×H13

Lignées H×B

H×B01	H×B15	H×B25
H×B02	H×B16	H×B26
H×B03	H×B17	H×B27
H×B04	H×B18	H×B29
H×B05	H×B19	H×B30
H×B07	(H×B20)	H×B31
(H×B09)	H×B21	
H×B10	(H×B22)	
H×B13	H×B23	
(H×B14)	H×B24	

Les lignées entre parenthèses ne peuvent pas être phénotypées facilement à cause de la petite taille des portées (disponibilité). Les lignées rayées ont disparu récemment.

• **Seules lignées RIS de rat; permettent l'étude de l'hypertension et de ses complications. Aucune sélection pour la pression.**

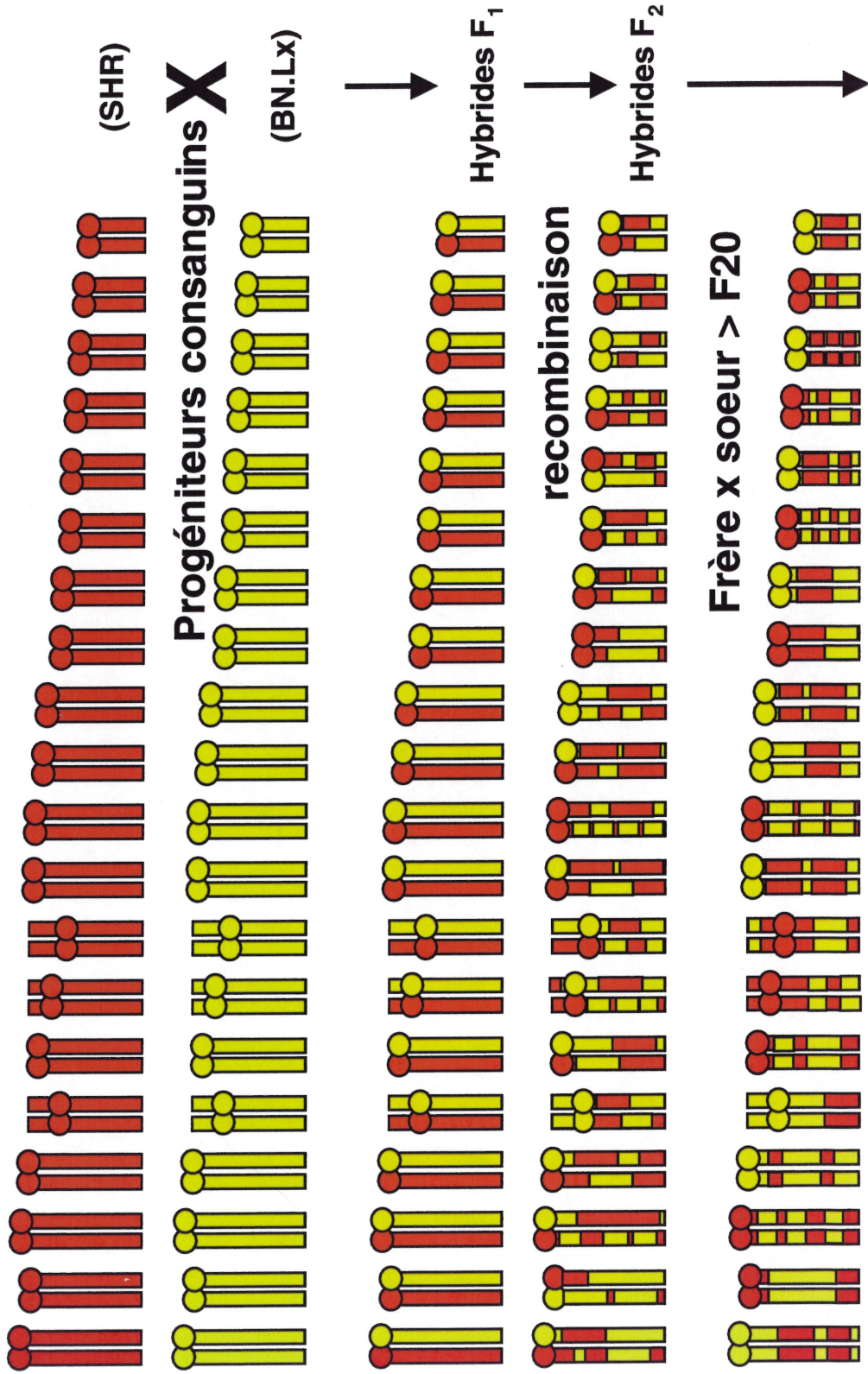
• **Plus de 475 marqueurs génétiques cartographiés couvrant 1139 cM du génome du rat, pour une moyenne de 20 marqueurs par chromosome à un intervalle d'environ 5 cM (Site Internet: ratmap.gen.gu.se).**

FIGURE III

Construction schématique de lignées recombinantes consanguines.

Les 20 paires (chez le rat) de chromosomes homologues sont représentées par des bâtonnets.

On obtient la génération F_1 par croisement de 2 souches consanguines, ici représentées en vert et en rouge. 100% du génome est hétérozygote. Les hybrides F_1 sont croisés ensemble pour obtenir les hybrides F_2 . 50% des loci sont hétérozygotes et 50% homozygotes "rouge" ou "vert". Les hybrides F_2 sont ensuite croisés entre frères et soeurs pour 10-20 générations. À chaque génération, 50% des loci hétérozygotes sont fixés (deviennent homozygotes). À la fin du processus, on obtient de nouvelles lignées consanguines. Elles partagent toutes les 2 mêmes génomes ancestraux dans une proportion de 50/50, mais en combinaisons variables entre souches. (i.e. chaque locus sera soit homozygote BB ou HH, 50% du génome provenant de l'un et l'autre progéniteurs ancestraux, les haplotypes étant variables entre RIS).



Cet outil unique permet donc de cartographier et de localiser des gènes et marqueurs polymorphiques, contribuant ainsi à l'effort de cartographie du génome du rat qui est en cours. Les RIS, comme tous les croisements F_2 ségrégant, permettent aussi la recherche de QTL associés à d'autres métabolismes que ceux de la physiologie cardiovasculaire pour lesquels elles n'ont pas *a priori* été "construites". Le Tableau IV résume les travaux accomplis grâce aux lignées RIS B×H/H×B jusqu'à présent.

TABLEAU IV

**Progrès scientifiques accomplis grâce aux lignées
recombinantes consanguines (RIS) B×H/H×B**

A. CARTOGRAPHIE DU GÉNOME DU RAT

1. Localisation du locus *Es-6* (Pravenec M *et al.* 1987)
2. Profil de distribution et localisation de plusieurs marqueurs (Pravenec M *et al.* 1990)
3. Localisation du gène de la rénine sur le chromosome 13 (Pravenec M *et al.* 1991b)
4. Localisation du LG V (*Linkage Group V*) contenant le gène de l'angiotensinogène sur le chromosome 19 (Pravenec M *et al.* 1992b)
5. localisation de la sous-unité β du transporteur de sodium épithélial sur le chromosome 1 lié au gène *Sa* (Huang H *et al.* 1995)
6. Carte de liaison du génome du rat utilisant les données obtenues chez les RIS (Pravenec M *et al.* 1996a et 1996b)
7. Cartographie par amplification de AFLP (Otsen M *et al.* 1996)
8. Cartographie des gènes de l'enzyme de conversion de l'interleukine 1 β et de la sous-unité KA1 du récepteur au glutamate (*grik4*) sur le chromosome 8 (Pravenec M *et al.* 1998b)
9. Profil de distribution de 632 marqueurs chez les lignées RIS (Pravenec M *et al.* 1999)

B. PHYSIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT

10. QTL pour le syndrome PLS (polydactylie-luxation, i.e. malformation des membres) (Kren V *et al.* 1996)
11. Utilisation des lignées RIS dans une étude longitudinale, impact de la taille du rein néonatal sur la taille du rein adulte; QTL communs et différents (Hamet *et al.* 1998a)
12. Cartographie des locus inhibant l'apoptose chez le nouveau-né dans l'hypertension (Hamet P *et al.* 2001)

C. HYPERTENSION ET PHYSIOLOGIE RÉNALE

13. Liaison du complexe majeur d'histocompatibilité RT1 à l'hypertension (Pravenec M *et al.* 1989)
14. Mesure de l'hypertrophie cardiaque et rénale, relation avec la PA (Kunes J *et al.* 1990)
15. Polymorphisme des gènes de kallikréine lié à l'hypertension (Pravenec M *et al.* 1991a)
16. Liaison du gène de la rénine à la PA (Pravenec M *et al.* 1991)

17. Corrélation entre l'agrégation plaquettaire et la PA chez les RIS (Pravenec M *et al.* 1992a)
18. Transport érythrocytaire de sodium chez les RIS, association avec la PA (Talib HK *et al.* 1992)
19. Polymorphisme de *hsp70* associé à l'hypertension chez SHR (Hamet P *et al.* 1992)
20. Polymorphisme du gène de la rénine associé à l'activité du gène. Absence de corrélation entre l'activité de la rénine et la pression artérielle chez les RIS (Pohlova I *et al.* 1993)
21. QTL associés à la PA (chromosomes 2, 4 et 19) et à l'hypertrophie ventriculaire (Chromosome 17) chez les RIS (Pravenec M *et al.* 1995)
22. Coségrégation de la PA selon le génotype de la sous-unité β du transporteur de sodium épithélial (*Scnn1b*) (Huang H *et al.* 1995)
23. Liaison de marqueurs AFLP pour la recherche de QTL des gènes de l'hypertension (Pravenec M *et al.* 1996)
24. Coségrégation du locus contenant *hsp27* avec l'hypertrophie ventriculaire gauche (Hamet P *et al.* 1996)
25. QTL liés à l'hématocrite chez SHR (Pravenec M *et al.* 1997)
26. Association de l'oncogène *c-fos* avec l'hypertrophie rénale compensatoire (Pravenec M *et al.* 1998a)
27. La résistance à l'insuline est en relation inverse des taux d'hémoglobine et de l'hématocrite chez SHR (Zidek V *et al.* 1999a)
28. Étude du locus de *Cd36* comme facteur de risque cardiovasculaire dans l'hypertension (Pravenec M *et al.* 1999a)
29. Dissection des QTLs de la PA trouvés sur le chromosome 1 chez le SHR (St Lezin E *et al.* 2000)
30. Localisation des locus déterminants la réponse thermique au stress chez SHR. Contribution du chromosome Y de SHR (Dumas *et al.* 2000)
31. QTLs déterminants l'expression des gènes de stress chez SHR (Dumas *et al.* 2000a)
32. Localisation de QTLs déterminants l'excrétion d'électrolytes (Dumas *et al.* 2001)

D. MÉTABOLISME DES LIPIDES ET DES GLUCIDES

33. QTL associés au niveau basal de cholestérol (chromosome 19) et des phospholipides (chromosomes 8, 19 et 20), (Bottger A *et al.* 1996)

34. QTL sur le chromosome 4 liés à l'utilisation du glucose et à la sécrétion d'acides gras non-estérifiés (Aitman T *et al.* 1997)
35. Un locus sur le chromosome 10 associé au taux de cholestérol hépatique (Bottger A *et al.* 1998)
36. Influence du chromosome Y de SHR sur la PA et les lipides sanguins (Kren V *et al.* 2001)
37. Amélioration de la résistance à l'insuline chez le rat SHR transgénique pour Cd36 (Pravenec *et al.* 2001)
38. Localisation du facteur de transcription ADD1/SREBP-1 sur le chromosome 10 et découverte d'une mutation chez SHR (Pravenec M *et al.* 2001a)

E. IMMUNOLOGIE ET TRANSPLANTATION

39. Lignées RIS pour l'étude du rejet du greffon (Panczak A *et al.* 1999)
40. Réponse à l'endotoxine chez le SHR (Pausova Z *et al.* 1999)

F. PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

41. Mesures de paramètres de la reproduction chez les RIS, QTL sur le chromosome 8 associé à la taille des portées et au poids de la vésicule séminale (Zidek V *et al.* 1999b)

10.2 Lignées congéniques construites entre BN.Lx et SHR

D'autre part, la création des lignées RIS B×H/H×B a permis de mieux caractériser les QTLs trouvés. Ainsi, il est très facile de créer des lignées congéniques à partir des progéniteurs BN et SHR, soit en se basant sur les résultats de recherches de QTL obtenus chez les RIS, soit pour confirmer des locus trouvés chez d'autres croisements. Une lignée est dite congénique (co-isogénique) lorsque une partie de son génome (i.e. moins d'un chromosome) provient d'une autre souche alors que le reste du génome est identique à celui de la lignée parentale témoin. La connaissance des polymorphismes entre souches facilite ainsi la création de ces lignées congéniques grâce au typage génétique permettant la sélection et la reproduction exclusive des individus présentant les caractéristiques génétiques désirées.

Par exemple, Hamet *et al.* (1992) ont découvert un polymorphisme de *hsp70* entre BN et SHR associé à une augmentation de PA de 15 mm Hg chez les RIS. Ces études ont été effectuées sur des souches congéniques pour le complexe RT1 portant *hsp70*, soient les souches BN.^{1K} portant le complexe RT1^K de SHR et SHR.^{1N} portant le RT1^N de BN.Lx. Aussi, Brown et coll (1996) ont révélé l'existence de locus de susceptibilité à la défaillance rénale sur le chromosome 1 dans un croisement utilisant le rat FHH hypertendu (*Fawn-Hooded hypertensive*). Un de ces locus, *Rf-1* (*Renal failure-1*), est lié aux dommages rénaux (protéinurie et glomérulosclérose) indépendamment de la PA, alors que *Rf-2* semble affecter le risque de maladie rénale en relation avec la PA. D'autre part, le rein du rat SHR est moins susceptible à la maladie rénale que le rein des rats FHH malgré des niveaux de PA supérieurs à ceux rencontrés chez FHH. Une expérience de transplantations croisées entre BN et SHR a aussi montré que le rein de SHR était moins susceptible aux dommages rénaux découlant de l'hypertension que le rein BN, indiquant une possible dissociation entre la susceptibilité à la maladie rénale et la PA (Churchill *et al.* 1997). Il devenait donc intéressant d'évaluer si cette différence de susceptibilité entre BN et SHR pouvait s'expliquer par les locus *Rf-1* et *Rf-2*. Pour ce faire, St-Lezin et coll.

(1999) ont produit une lignée SHR congénique identique à SHR sauf pour une région définie du chromosome 1q. Le chromosome 1q de cette lignée possède un segment de 22 cM provenant du rat BN allant du marqueur *DIMit3* au marqueur *Igf2* et comprenant le locus *Rf-1* et *Rf-2*. À des niveaux de PA induit par la méthode DOCA-sel équivalant à ceux de SHR, les animaux congéniques présentèrent une plus grande protéinurie associée à des dommages rénaux vasculaire et glomérulaire et démontrant l'importance du chromosome 1 dans la susceptibilité à la maladie rénale chez BN. Cette lignée congénique est donc un outil important pour l'étude des atteintes rénales associées à l'hypertension, et sa construction a bénéficié des connaissances acquises lors de la cartographie des lignées RIS B×H/H×B.

De même, d'autres lignées congéniques ont été produites à partir des souches RIS B×H/H×B afin de mieux caractériser l'hypertension génétique ou les métabolismes altérés associés à l'hypertension chez le SHR. Kren et coll. (1997) ont montré une baisse significative de la PA systolique et diastolique ainsi que du poids relatif du coeur chez SHR.Lx, une lignée de rat SHR congénique où l'on a transféré un segment du chromosome 8 de la souche BN.Lx. D'autre part, les lignées congéniques SHR.Lx et SHR.1N (transfert du locus du complexe majeur d'histocompatibilité RT^{1N} du chromosome 20 provenant de BN.Lx sur le génome SHR), montrèrent une réduction du contenu en cholestérol des IDL ainsi que du rapport du cholestérol LDL/HDL en parallèle à une augmentation du contenu en cholestérol et phospholipides des HDL (Bottger *et al.* 1996). Finalement, une lignée congénique pour le chromosome 4 (SHR.4) a permis de confirmer l'effet sur l'utilisation du glucose et la sécrétion d'acides gras non-estérifiés du locus trouvé sur le chromosome 4 (Aitman *et al.* 1997, point 34 du Tableau IV). Cette lignée possédant une partie du chromosome 4 transférée de la souche BN.Lx montre une correction partielle de la résistance à l'insuline observée chez SHR, et une sécrétion d'acides gras non-estérifiés égale à celle des rats BN (Aitman *et al.* 1999).

Finalemment, dans le cas particulier de la recherche des déterminants responsables de susceptibilités à l'environnement, les RIS peuvent s'avérer très utiles. En effet, étant constituées de lignées consanguines, les RIS permettent la sélection préalable des meilleurs phénotypes sensibles à l'environnement et différenciellement exprimés entre souches. De plus, plusieurs phénotypes peuvent être testés à différents âges, et, comme nous l'avons déjà souligné, il est aussi possible de mesurer des phénotypes léthaux, les animaux étant toujours disponibles. La recherche du phénotype idéal et non simplement adéquat est donc d'autant plus simple chez les RIS.

10.3 Considérations statistiques

Dans ce travail, la recherche des locus de traits quantitatifs chez les lignées RIS B×H/H×B s'est effectuée en utilisant les données de cartographie génétique disponibles en 1996 sur le site internet <http://ratmap.gen.gu.se> (Pravenec *et al.* 1996a). À ce moment, 475 marqueurs polymorphiques (minisatellites) couvrant également le génome du rat étaient disponibles, soit l'équivalent d'un marqueur chaque 3 cM. Nous avons employé le programme MapManagerQT développé par Manly et Elliott (1991) qui permet d'obtenir la carte de liaison génétique et de faire la recherche des QTLs.

Afin de contrôler pour les comparaisons multiples pouvant produire des faux-positifs lors d'analyses multiples simultanées (i.e. plusieurs phénotypes * 475 marqueurs), nous avons effectué le test de permutation incorporé au programme et développé par Doerge et Churchill (1996) pour chaque phénotype. Pour ce test, nous avons choisi de faire 500 permutations chaque 5 cM, ce qui correspondait à nos conditions expérimentales de comparaisons multiples et de densité de marqueurs, respectivement. Le test fournit les seuils de significations qu'il faut dépasser pour avoir une liaison suggestive ($P < 0.5$), significative ($p < 0.05$) ou très significative ($p < 0.001$) (Krugliak *et al.* 1996).

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

INTRODUCTION ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Les approches par gènes candidats ou par le génome total ont révélé une multitude de QTLs associés ou liés à l'hypertension essentielle sur presque tous les chromosomes, chez les modèles animaux aussi bien que chez l'humain. Tous ces QTLs existent-ils vraiment? Y a-t-il d'autres QTLs non détectés? Il semble intuitivement évident que tous ces QTLs, s'ils s'avèrent vrais, ne seront pas tous impliqués chez un sujet hypertendu ou chez tous les modèles animaux. D'autre part, certains QTLs ne sont sans doute que des artéfacts ne représentant pas de vrais locus. Finalement, la présence de plusieurs QTLs sur un même chromosome peut n'être que la réflexion de la multitude de modèles et de variables étudiés, de multiples QTLs pouvant masquer la présence d'un seul vrai QTL. Il convient donc de raffiner notre approche de la maladie afin de mieux tirer parti des résultats disponibles et de mieux cibler les prochains travaux.

Ainsi, on pourrait par exemple se concentrer sur les QTLs communs à tous les modèles animaux et retrouvés par synténie sur les chromosomes humains homologues. Une autre approche consisterait à disséquer la pathologie en phénotypes intermédiaires qui, étant plus spécifiques, pourraient résulter de la modulation d'un seul gène. Nous avons choisi cette voie en cherchant à caractériser une partie de la susceptibilité environnementale retrouvée dans l'hypertension, l'environnement expliquant en moyenne 70% de la variance de la pression artérielle.

Nous avons vu que l'effet de l'environnement sur une pathologie peut être additif ou en interaction avec l'effet des gènes. Cependant, cette distinction est purement académique puisque l'effet ultime de l'environnement sur l'organisme, qu'il soit "normal" ou extrême, s'exercera par la modulation de certains gènes. Pensons à l'augmentation/diminution du nombre de récepteurs hormonaux suite à un stimulus ou, comme nous l'avons vu, à l'expression des gènes de stress suite à des changements

d'homéostasie. (Excluant évidemment les effets létaux purement physiques ne laissant aucune place à la modulation, par exemples: brûlures, changements de températures rapides de plusieurs degrés, empoisonnements...)

Ainsi, il existe des gènes répondant aux changements environnementaux, et ceux-ci pourraient être impliqués dans le développement de pathologies comme l'hypertension. Suite à un stimulus *identique*, 2 sujets peuvent ne pas répondre de façon identique. Une réponse différente suggérera l'existence de gènes responsables de cette *susceptibilité différentielle*, illustrant le concept de *susceptibilité génétique à l'environnement*. Nous tenterons dans cette thèse de montrer l'existence de susceptibilités *génétiques* à l'environnement et d'en trouver les déterminants grâce à l'emploi des lignées RIS H×B/B×H ségrégantes. Nous emploierons aussi des lignées congéniques et consomiques afin de tester l'impact de certains des QTLs trouvés. Ces lignées permettront de contrôler le bruit de fond génétique (*background*) et de cartographier les possibles déterminants des susceptibilités environnementales que nous nous proposons d'étudier. Nous avons choisi la susceptibilité au stress, le stress ayant une influence majeure sur la pression artérielle et sur le développement des maladies cardiovasculaires.

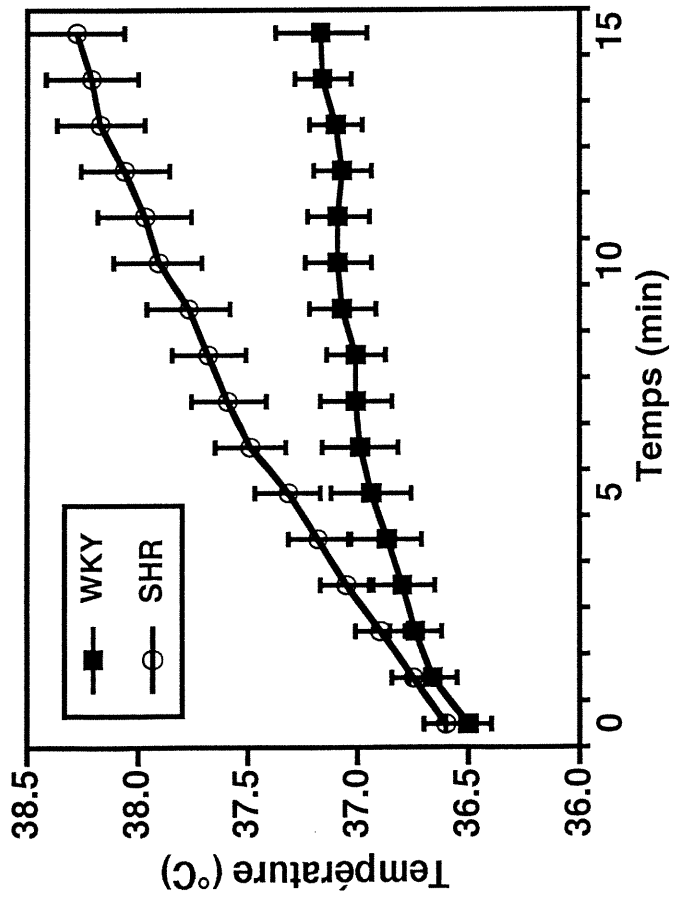
Nos résultats préliminaires ont montré la validité de notre approche. Ainsi, nous avons observé une réponse thermique au stress d'immobilisation plus grande chez les rats SHR que les rats témoins normotendus WKY. La Figure IVa montre que cette réponse est plus rapide, et que la température finale atteinte est significativement plus haute chez SHR que chez WKY. De plus, cette réponse accrue ne semble pas secondaire à la pression artérielle puisque la réponse thermique au stress d'immobilisation est inchangée chez des rats Sprague-Dawley (SD) rendus hypertendus par 2 semaines de traitement au L-NAME (N ω -nitro-L-arginine méthyl ester, 60 mg.kg⁻¹) par rapport aux rats témoins non-traités (Figure IVb).

FIGURE IV**Réponse thermique au stress d'immobilisation**

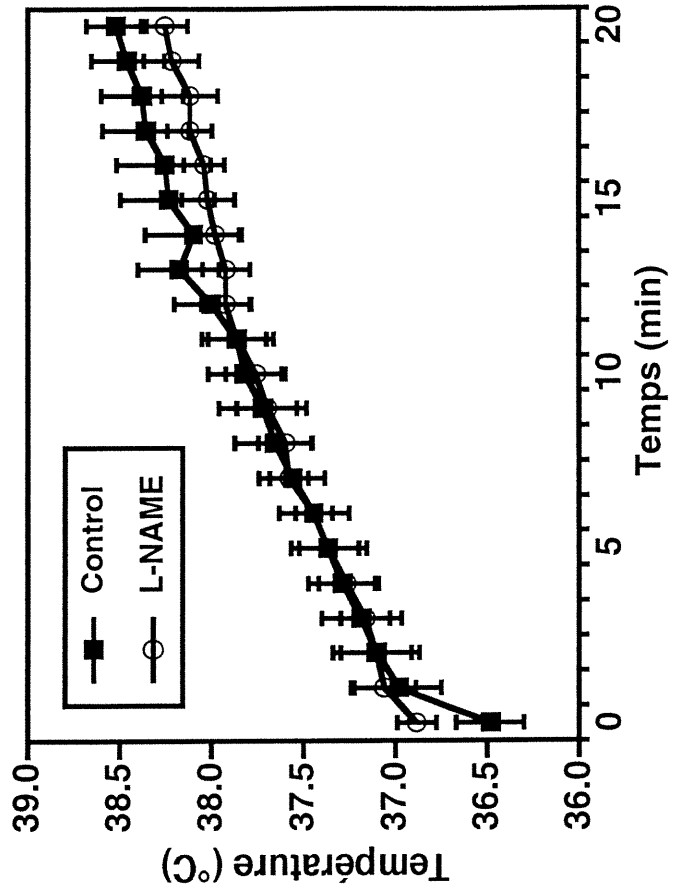
a. Stress d'immobilisation chez WKY et SHR (n=6 pour chaque souche, $p < 0.05$ par ANOVA en fonction du temps entre les souches).

b. Stress d'immobilisation chez le rat SD et le rat SD traité au L-NAME (N ω -nitro-L-arginine méthyl ester, 60 mg.kg⁻¹) n=6 pour chaque groupe, p=NS.

a



b



D'autre part, nous avons montré la plus grande expression des gènes de stress *hsp27* et *hsp70* suite à l'immobilisation chez le rat SHR (Hamet 1995). Après un stress d'immobilisation d'une heure suivi d'une heure de repos pour permettre l'expression des ARN messagers, l'expression de *hsp27* et *hsp70* dans l'aorte est significativement plus grande chez SHR que chez WKY. Cependant, il est aussi possible de dissocier l'hypertension de la réponse au stress. En effet, la souche de rats hypertendus de Nouvelle-Zélande (*Genetically Hypertensive*, GH) développées par Smirk et Hall (1958) est un autre modèle d'hypertension génétique. À l'inverse du rat SHR cependant, les animaux GH présentent une réponse au stress identique à celle des animaux témoins NZN (*New Zealand Normotensive*) pour tous les paramètres mesurés. Ainsi, chez les rats mâles étudiés, une stimulation électrique des pattes provoque une augmentation des catécholamines plasmatiques chez GH et NZN, les taux étant identiques chez les 2 souches. De même, l'augmentation du rythme cardiaque et le changement de PA lors au stress sont similaires pour les 2 souches. On peut donc conclure que, malgré une pression artérielle significativement plus élevée chez GH (McCarty 1982 et 1983), les paramètres de la réponse au stress évalués chez les 2 souches sont identiques.

Il est donc possible d'étudier une susceptibilité environnementale ayant un impact sur la pression artérielle sans toutefois que les phénotypes mesurés soient nécessairement liés à la pression artérielle.

Nos résultats sont exposés dans 3 manuscrits publiés et un manuscrit accepté pour publication. Le premier cherche à déterminer l'existence de locus responsables de l'excrétion des électrolytes urinaires ayant un impact sur la PA. Nous montrons l'importance de trouver les conditions expérimentales permettant la recherche de loci de susceptibilités environnementales. Les 2 suivants présentent l'étude de la susceptibilité génétique au stress d'immobilisation chez les RIS. La température corporelle et l'expression des gènes de stress (*hsp*) suite à un stress d'immobilisation standardisé sont

les 2 phénotypes caractérisés. Finalement, le dernier article démontre l'emploi des souches RIS dans une étude longitudinale. Ce manuscrit montre l'unique avantage de *lignées* ségrégantes dans l'étude d'un phénotype dans le temps. Le Tableau V illustre notre stratégie.

TABLEAU V

Stratégie employée pour la recherche des déterminants génétiques de la susceptibilité au stress. Utilisation de phénotypes intermédiaires modulés par l'environnement.

Stimulus externe**Phénotype****Jeûne**

Na urinaire

K urinaire

Rapport Na/K

Ca urinaire

Stress d'immobilisation

Température corporelle

Expression des *hsp***Âge****Nouveau-né**

Poids relatif du rein

Adulte

Poids relatif du rein

 Δ poids rein adulte - nouveau-né

Chapitre 11

IDENTIFICATION ET LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DES DÉTERMINANTS ÉCOGÉNÉTIQUES DE L'EXCRÉTION DES ÉLECTROLYTES URINAIRES

*Identification and chromosomal localization of ecogenetic
components of electrolyte excretion*

Pierre Dumas, Vladimír Kren, Drahomíra Krenová, Michal Pravenec,
Pavel Hamet and Johanne Tremblay

Manuscrit publié dans la revue *J Hypertens* 2002;20:209-217

ABSTRACT

Objective: To determine to which extent urinary excretion of blood pressure-modulating electrolytes is genetically determined, and to identify their chromosomal localization.

Design and Methods: Twenty-six rat recombinant inbred strains (RIS) originating from reciprocal crosses of normotensive Brown Norway (BN.Lx) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were used. A pilot experiment on a subset of strains determined that fasting decreases the impact of environmental noise and increases that of heritability. Twenty-four-hour urinary collections were obtained from fasting rats aged 6-12 weeks (3-8 rats per strain). Sodium (Na), potassium (K) and calcium (Ca) excretions were measured, and the Na/K ratio calculated. These phenotypes served as quantitative traits for the search of quantitative trait loci (QTLs) by scanning the RIS genome that was mapped with 475 polymorphic markers.

Results: Constant Na intake resulted in a low heritability for Na excretion reflecting the environmental impact (intake=excretion), whereas fasting revealed a gradient among RIS indicative of the genetic component of the traits. In the fasting state, a locus on chromosome 14 was found to be significantly associated with K excretion (*Alb*, $p=0.00002$, $r=-0.69$, logarithm of the odds score (LOD) 3.9), whereas another locus on chromosome 10 (*D10Cebrp97s5*, $p=0.0003$, $r=-0.69$, LOD 3.0) and one on chromosome 6 (*D6Cebrp97s14*, $p=0.0007$, $r=-0.65$, LOD 1.9) were more significantly associated with Na excretion and the Na/K ratio respectively. The observed correlations were all negative for Na, K and Na/K, indicating a higher excretion of Na and K and a greater Na/K ratio in rats bearing BN.Lx alleles at these loci, i.e. salt retention in fasting SHR. These 3 loci accounted for 47 to 55% of variance of their associated trait, suggesting that they are the main genetic determinants for these phenotypes in basal fasting conditions. Rats bearing the Y chromosome of SHR origin had significantly higher K excretion that, in turn, led to a significantly lower Na/K ratio. Finally, a locus

on chromosome 7 was linked to Ca excretion, explaining 46% of the trait variance (*D7Mit10*, LOD score 3.0).

Conclusion: RIS enabled us to determine QTLs for environment-modulable traits such as Na, K and Ca excretions. We demonstrated that whereas urinary electrolytes are determined mainly by intake (environment) in a steady state, their excretion in an adaptive state (fasting) is predominantly genetically determined by distinct QTL on autosomes as well as the Y chromosome. Furthermore, the loci responsible for Na and K excretions act independently of the locus governing the relative excretion of Na/K. Thus, the salt-retaining aspects of some hypertensives may be, in large part, determined by genes responsible for renal excretion, whose impact is predominant over the environment under acute challenge.

Key words: Quantitative trait loci; Ecogenetics; Hypertension; Recombinant inbred strains; Electrolytes; Sodium

INTRODUCTION

Numerous studies have addressed the potential association of dietary ions with hypertension, particularly dietary sodium (Na), potassium (K) and calcium (Ca). Original observations relating average sodium intake to the prevalence of hypertension have been reported by Dahl [1]. The Intersalt study also established a slight but significant positive correlation between Na intake and blood pressure (BP) in 52 groups of men and women drawn from populations in 32 countries for a total of 10,079 individuals [2,3]. In both the Intersalt and Dahl findings, the data relied on remote populations with extremely low Na intake. In addition to low Na intake, these remote populations were most likely to live in areas unaffected by western culture. Therefore, ecological confoundings such as stress, highly prevalent in the western world, tended to influence the conclusions. Hence, in the Intersalt study, when the 4 remote populations with low Na intake were removed from the analysis, no correlation could be found between Na intake and BP.

It is noteworthy that most of the data pertaining to dietary Na intake is based on the assumption that urinary Na excretion reflects intake, and, thus, is usually based on a single 24-hour urine collection, a method that has been shown to be highly susceptible to intra-individual variation [4]. However, in controlled experimental conditions under steady state, sodium excretion equals sodium intake [5]. This also applies to potassium but not to calcium. Nevertheless, intervention studies in animals and humans definitely indicated a strong role of dietary ions in the prevention and treatment of hypertension, at least in susceptible individuals [6-9]. A genetic basis for salt-sensitivity has been shown in rats [10] and humans [11], which led to the concept of modulators and non-modulators according to the renin response upon salt loading [12]. As only a minority of hypertensives appear to be salt-sensitive [13], the determination of quantitative trait loci

(QTLs) for salt-sensitivity could greatly help in the individualization of treatment. Noticeably, genes or even QTL for abnormal ionic excretion are still unknown.

Finally, interactions between ions in the modulation of BP have been reported [14]. For instance, we have previously observed BP alteration by nutritional calcium parallels changes of Na and K excretion in salt-sensitive rats [15]. In humans, the hypertensive effect of Na is particularly seen in subjects consuming a low-calcium diet [16], and strong results from the DASH study indicate interactions of several ions with BP [17]. In a steady state or “habitual intake” the impact of electrolyte intake is observed particularly in subjects with no family history of hypertension [16]. The present study underlines that the ecogenetic impact of ion intake is observed under conditions of acute challenge, such as fasting. The early phase of fasting (acute) is characterized by diuresis, natriuresis and BP reduction [18, 19]. Furthermore, because of the absence of exogenous ion intake, acute fasting should reflect adaptation of the organism to its new state.

In this work, we first attempted to demonstrate the genetic contribution of fasting electrolyte excretion by evaluating the interstrain genetic gradients (i.e. the strain distribution pattern, SDP) in a panel of recombinant inbred rat strains (RIS). Then, we sought to determine QTLs responsible for the fasting urinary excretions of Na, K, Ca and the Na/K ratio. Significant logarithm of the odds (LOD) scores were found at markers associated with fasting urinary Na, K and Ca excretions. Thus, we demonstrated that the control of urinary electrolyte excretion is genetically determined in these experimental conditions.

METHODS

Animals. The study of a complex trait such as hypertension is hindered by the polygenic nature of the disease, the influence of the environment, and its heterogeneity [20]. To unveil the genetic components of such diseases, a panel of recombinant inbred strains (RIS) represents a very valuable tool [21]. RIS are inbred replica of F_2 animals that allow a disease to be dissected into its monogenic components. The B×H and H×B RIS studied were derived from reciprocal crosses of spontaneously hypertensive (SHR/Ola) × Brown-Norway normotensive (BN.Lx/Cub) rats. It is the largest set of rat RIS, and the only one available for the investigation of genetic hypertension and its related traits [21]. Being a set of inbred strains, RIS provide more reliable results by the calculation of a mean phenotypic value from several animals for each strain, thus reducing the impact of experimental variance in contrast to studies in the F_2 generation. Male rats weighing 150-300 g were studied. Animals from 26 RIS were phenotyped for urinary electrolytes. They were maintained since weaning on a standard diet (containing, by weight, 0.5% Na, 0.4% K and 0.6% Ca), with water *ad libitum* and a 12-hour day/night cycle prior to the experimental protocols. Room temperature was maintained between 22 and 25°C. The experimental protocols were performed according to regulations of the local animal care committee.

Determination of the heritability (h^2) of Na excretion. In the first experiment, a random subset of 10 RIS was studied on both a normal Na diet (0.6% Na by weight) and fasting. Food was initially removed for a wash-out period of 10-12 hours prior to a 24-hour urinary collection in metabolic cages under fasting. At the end of collection, normal chow was reinstated, and the rats were left undisturbed for 24 hours before the second urinary collection on a normal diet. Water was available *ad libitum* for the entire protocol duration. Urinary Na excretion was determined under both conditions. Mean values of 4

to 6 rats per strain were calculated. h^2 was calculated according to the formula: $h^2 = V_a / (V_a + V_e)$ where V_a is the interstrain variance, and V_e , the intrastrain variance (environmental variance including shared environment).

Urinary electrolytes in 26 fasting RIS. In a second experiment, urinary electrolytes (Na, K, and Ca) were measured in the available set of 26 RIS. To normalize the intraindividual variation in ion excretion due to intake, food was removed 10-12 hours prior and for the entire duration of the 24-hour urine collection (see results from experiment 1). The rats (3-6 per strain) were housed individually in metabolic cages to obtain urine samples, and urinary Na, K and Ca were measured [22, 23]. Water was available to all rats *ad libitum*. Na, K and Ca were expressed in mmol per day and corrected by body weight. The SDP (strain distribution pattern, i.e. ranking of strains for each phenotype) in RIS was obtained for daily Na, K and Ca excretions and for the Na/K ratio. The data are presented for each strain as mean \pm SEM obtained from a single measurement in several animals (refer to figures for the exact number of rats per strain).

Genetic analyses. Over 475 polymorphic informative genetic markers have been mapped for each RIS [24] covering 1,139 centimorgan (cM) of the rat genome, with a mean of 20 markers per chromosome (Chr) [24]. The SDPs of these markers are available on the web at the Ratmap server (<http://ratmap.gen.gu.se>). Linkage maps were obtained by computing the SDPs of available markers in the MapManager computer program (MapManager QT v3.0b21) [25].

Mapping of QTLs determining electrolyte excretion. The SDPs of urinary excretion of Na, K, Ca and of Na/K were then correlated with the SDPs of the genetic markers using the MapManagerQT program and Pearson's correlation analysis (to obtain the sign of the association and an estimation of the explained variance given by r^2). The

thresholds of significance were 0.5, 0.05 and 0.001, corresponding respectively to suggestive, significant and highly significant linkages [26]. A nonparametric permutation test implemented on MapManager allowed us to estimate the linkage thresholds of finding specified linkage statistics with a total genome scan. The permutation test was performed for each trait with settings simulating the experimental conditions of marker number (500 permutations) and density (every 5 cM). This was the equivalent of Bonferroni correction for multiple comparisons. For a set of 30 RIS, a significant linkage ($p < 0.05$) corresponds to a Bonferroni-adjusted p value of < 0.0006 [27].

RESULTS

Sodium and potassium excretion in steady state and early fasting

Urinary Na excretion is usually accepted as a marker of intake. Figure 1a shows the SDP of urinary Na in 10 RIS on normal Na intake (left panel) and during fasting (right panel). Intrastrain variance represents experimental and environmental variance, while interstrain variance represents the genetic component of total trait variance. As we are going to demonstrate however, the search for genetic determinants of environment-sensitive traits requires challenge of the environment to expand the putative interstrain genetic difference. We selected fasting as a challenge. It can be seen from the histograms that very little intrastrain variation in Na excretion was present in both conditions. All strains on normal diet (left panel) exhibited similar levels of excretion typical of the steady state and attributable to Na intake. However, the same strains under fasting exhibited a strong gradient of Na excretion. Furthermore, fasting-induced natriuresis was observed, all strains tested demonstrating equal or higher natriuresis despite no dietary Na intake. Figure 1b illustrates the relative h^2 of urinary Na excretion in both cases. On normal diet with steady Na intake, most of the variance was intrastrain, i.e. environmental in an inbred strain (29% interstrain genetic variance and 71% environmental variance for a variance ratio of 0.41; Fig.1b, left panel). After adaptation to a high Na intake, another model of steady state, most of the variance was also environmental (62%, data not shown), confirming the need to challenge the environment to increase h^2 . Inversely, under acute fasting, the strains demonstrated a strong gradient of excretion despite no Na intake (70% interstrain variance and 30% environmental variance for a variance ratio of 2.33; Fig.1b, right panel). Similarly, urinary K excretion also demonstrated greater heritability under fasting (84%), with a 6-fold gradient of urinary K excretion between strains (data not presented). As expected, the strains exhibited low urinary K values

during fasting, consistent with the absence of exogenous dietary K intake. This suggests that the increased fasting-induced excretion is specific to Na.

SDPs of electrolyte excretion in the fasting state

A search for the genetic determinants of urinary electrolyte excretion was thus performed in fasting rats. Figure 2 shows the SDPs for Na excretion (Fig. 2a), K excretion (Fig. 2b), Ca excretion (Fig. 2c) and the Na/K ratio (Fig. 2d). In addition to the RIS, data on the 2 progenitor strains BN.Lx and SHR are displayed. A strong gradient and continuous distribution typical of polygenic traits are illustrated by the 4 histograms. There were 2-fold, 4-fold and 6-fold gradients between strains for Na, K and Ca excretions, respectively, indicating a strong genetic component associated with these traits. As can be seen from these results, the 2 progenitor strains did not stand at the extremities of distributions, suggesting that alleles increasing and decreasing electrolyte excretion were present in both strains. Noticeably, Na excretion was the lowest in SHR, which indicates that this strain retains Na. For Na excretion, 59% h^2 was calculated with the set of 26 RIS studied. Genetic h^2 was 70% for K excretion, 69% for the Na/K ratio and only 49% for Ca excretion, indicating a greater influence of the environment on the measure of Ca excretion.

Table 1 summarizes the results of total genome scan for each trait. Significant QTLs were found for Na, K and Ca excretions. The most significant result was for K excretion where the *Alb* marker on Chr 14 was linked with a LOD score of 3.9, explaining 55% of variance of the trait. A marker on Chr 10 was responsible for 48% of Na excretion (*D10Cebrp97s5*, LOD score 3.0). The most significant marker for the Na/K ratio was *D6Cebrp97s14* on Chr 6 (LOD score of 1.9). Although the distribution of the Na/K ratio correlates with both the Na excretion and the K excretion distributions (correlation between Na/K and Na, $r=0.57$, $p=0.024$; correlation between Na/K and K,

$r=-0.53$, $p=0.043$), the QTL for the Na/K ratio was different from the QTLs unveiled for Na and K excretions, indicating different genetic determinants for the relative excretion of Na to K. Finally, the *D7Mit10* marker was associated with Ca excretion in RIS with a significant LOD score of 3.0 and explained 46% of the trait variance. Figure 3 shows the LOD plot of K excretion for Chr 14. Correlations for Na excretion, K excretion and the Na/K ratio with their respective locus were all negative, indicating a higher excretion of Na and K, and a higher loss of Na relative to K in rats bearing the BN.Lx alleles at these loci. Inversely, strains with SHR alleles at the *D7Mit10* locus of Ca excretion exhibited higher Ca excretion similar to what is observed in SHR. Of note, no significant correlation was found between the available published BP data for the RIS and the fasting Na, K, or Ca excretions or the Na/K ratio explaining why none of the QTLs we are reporting here are common to the BP QTLs found in the RIS [28].

Since reciprocal crosses of BN.Lx \times SHR RIS were developed [21], we could evaluate the impact of SHR Y Chr on traits by comparing B \times H strains, where Y Chr originates from SHR, to H \times B strains bearing BN.Lx Y Chr. A significant increase in K excretion was found in B \times H rats compared to H \times B (5.4 ± 0.2 and 4.4 ± 0.2 mmol/d/g; $p=0.0006$; $n=143$; for B \times H and H \times B strains, respectively). This difference translates into a significant decrease in the Na/K ratio for B \times H rats (0.6 ± 0.03 and 0.7 ± 0.02 ; $p=0.0005$; $n=167$ for B \times H and H \times B strains, respectively).

In previous work from our laboratory, we pointed to the usefulness of RIS for longitudinal studies where data from newborn and young animals could be used to predict future target organ damage in adults [29]. We reported a correlation between newborn and adult kidney weights, as well as suggestive QTLs for relative kidney weight. In the present study, we found a significant negative correlation between relative newborn heart weight and adult urinary Na excretion ($r=-0.59$, $p=0.007$), and the adult Na/K ratio ($r=-$

0.64, $p=0.002$) which translates into a positive correlation between relative newborn heart weight and *D6Cebrp97s14*.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, the present study is the first systematic search for QTL of urinary BP-modulating electrolyte excretion. We have demonstrated that RIS can be used as a tool for finding nutritional ecogenetic components [30] of environmentally-modulated phenotypes such as electrolyte excretion. The environmental steady state must, however, be challenged to reveal the impact of the genetic component of variance of the phenotypes to be tested, which we have accomplished by fasting the animals for urinary collection. We have shown that, in the steady state, the intake of Na equals its excretion, whereas fasting reveals a gradient among the strains, indicative of the genetic component of the trait. Because the gradient is created by the combination of positively and negatively-contributing alleles from both progenitor genomes, one can find the progenitors at the extremes of the distribution (Figure 2a, Na excretion), or in the middle of the distribution (Figure 2c, Ca excretion; no significant difference between BN and SHR).

Acute fasting in rats (up to 50 hours) leads to the suppression of atrial natriuretic peptide (ANP) clearance receptor found in adipose tissue. This downregulation of the clearance receptor is accompanied by increased biological activity of ANP, i.e. natriuresis, diuresis and lowering of BP [31]. Human subjects demonstrate similar ANP-induced natriuresis and diuresis consecutive to fasting [32]. However, in obese hypertensives, plasma ANP levels are significantly lower than in normotensives [32]. Furthermore, a higher number on ANP clearance receptors in adipose tissue reported in obese hypertensives could explain the salt and water retention characteristic of obesity-associated hypertension [31]. Therefore, fasting, through its effect on ANP clearance receptors in adipose tissue and the differential effect observed between normotensives and obese hypertensives could help link the metabolic component of hypertension to renal

handling of ions and water. The knock-out of ANP gene or of its biological receptor, GC-A, demonstrated the relevance of this pathway in sodium handling and blood pressure control [33, 34]. In light of these results, it is noteworthy that our data indicated that enhanced urinary excretion due to fasting is only seen for Na, and not for K, confirming the proposed role of Na in fluid balance during fasting.

Numerous lines of evidence indicate a genetic component influencing natriuresis, kaliuresis and calciuresis and their relationship to BP modulation. Genes involved in renal ion transport and responsible for Mendelian forms of hypertension could be relevant to essential hypertension. Of note are the β and γ (*Scnn1 β* and *Scnn1 γ*) subunits of the epithelial sodium channel that are involved in Liddle's syndrome in humans [35, 36]. These have been mapped to rat Chr 1 and shown to be in linkage with salt-sensitive systolic BP in human [37, 38]. Similarly, Gordon's syndrome (pseudohypoaldosteronism type II) is an autosomal dominant disease characterized by hyperkalemia despite normal glomerular filtration [39]. Linkage analysis of Gordon's syndrome families unveiled loci on Chr 1 and 17 (1q31-q42 and 17p11-q21) linked to the disease [40]. Finally, familial idiopathic hypercalciuria linked to Chr 19 in humans is a Mendelian form of abnormal renal Ca handling [41, 42].

We found significant QTLs associated with Na, K and Ca excretion. Interestingly, even if suggestive, the QTL for the Na/K ratio (*D6Cebrp97s14*) is different from the QTLs linked with Na and K excretion (*D10Cebrp97s5* and *Alb* respectively). It suggests that the major locus responsible for the relative excretion of Na/K is not the locus of Na or the locus of K excretions. Many BP and salt-sensitive BP QTLs have been mapped on rat Chr 10 [43-45]. However, no basal BP QTLs were found on Chr 10 in RIS [28]. Nevertheless, in light of the role of fasting in Na metabolism, the Chr 10 QTL

found for urinary Na excretion may also represent a salt-sensitive BP QTL. This hypothesis needs further testing.

A significant correlation between kallikrein genotypes and urinary K excretion has been reported previously [46]. In this work performed in members of 58 Utah pedigrees, increased urinary K with a 0.8 standard deviation above the mean would predict high kallikrein levels in heterozygotes and high-kallikrein homozygotes. Here, we are reporting a QTL for the urinary Na/K ratio on rat Chr 6. Interestingly, a kallikrein-binding protein (KBP) has been mapped on rat Chr 6 [47]. Thus, KBP could be an attractive candidate linking genetically-determined kallikrein levels with potassium excretion.

A relationship between Na and dopamine was proposed a long time ago [48]. Aberrant dopaminergic regulation of aldosterone secretion via D2-like receptors has been reported in some forms of hypertension [49]. In addition, D1-like dopamine receptors located in renal proximal tubules are known to be essential to mediate Na excretion during acute volume loading [50, 51]. Increased BP has also been noted after blockade of D1-like receptors, or in mice lacking one or both alleles of the D1A dopamine receptor [52]. Finally, it is noteworthy that dopamine receptors D1-like-2 and D5 were mapped on rat Chr 14 [53]. Therefore, it is conceivable that the genetic variation of urinary K excretion observed in RIS could be explained by abnormal dopaminergic regulation of aldosterone secretion and the ionic transport system such as Na/K ATPase, the D1-like-2 and D5 dopamine receptors on Chr 14 being good positional candidates.

A sexual dimorphism in Na intake has been reported in many species. Ely *et al.* [54] have found that in Wistar-Kyoto normotensive rats as well as in SHR, females have higher Na intake than males of the same strains [54]. However, they have observed that

consomic male rats bearing the SHR Y Chr demonstrate a significant increase in Na intake compared to reciprocal consomic males (SHR with a WKY Y Chr). In our study, we found significant modulation of K excretion as well as of the Na/K ratio in males of B×H strains (bearing the SHR Y Chr). Together, these results strongly suggest a significant role of the hypertensive Y Chr in the modulation of Na sensitivity via altered Na intake and its excretion relative to K.

Finally, it is noteworthy that in RIS, the *D6Cebrp97s14* locus correlates with the Na/K excretion ratio in adults and with newborn heart weight, indicating that an identical locus or closely-linked loci modulate relative heart weight in newborns as well as relative Na excretion. This would be in accordance with previous work that has shown a relationship between heart remodeling and sodium excretion [55, 56].

This work demonstrated that variation in fasting urinary excretion of electrolytes is genetically determined. We have found 3 different loci associated with urinary excretion of Na, K and the Na/K ratio as well as a locus for urinary Ca excretion. Identification of the underlying genes should help understand the abnormalities in renal handling of BP-modulating ions observed in hypertension and their interplay. Finally, studies relying on electrolyte excretion as an account of intake should take into consideration variance introduced by the genetic impact modulating electrolyte excretion.

REFERENCES

1. Dahl LK: Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. In: Cottier P, Bock KD, eds. *Essential Hypertension: an international symposium*. Berlin: Springer-Verlag; 1960: pp 61-75
2. Intersalt Cooperative Research Group: Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ* 1988; 297:664-328
3. Intersalt Cooperative Research Group: The Intersalt Study. An international co-operative study of electrolyte excretion and blood pressure: further results. *J Hum Hypertens* 1989; 3:5279-320
4. Liu K, Cooper R, McKeever J, McKeever P, Byington R, Soltero I, Stamler R, Gosch F, Stevens E, Stamler J: Assessment of the association between habitual salt intake and high blood pressure methodological problems. *Am J Epidemiol* 1979; 110:2219-226
5. Simpson FO: Blood pressure and sodium intake. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management - Vol I*. New York: Raven Press; 1995: pp 273-282
6. Sullivan JM, Prewitt RL, Ratts TE. Sodium sensitivity in normotensive and borderline hypertensive humans. *Am J Med Sci* 1988; 295:370-377
7. Luft FC, Weinberger MH: Heterogenous responses to changes in dietary salt intake: the salt-sensitivity paradigm. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:suppl612S-617S

8. Whelton PK, He J, Cutler JA, Brancati FL, Appel LJ, Follmann D, Klag MJ: Effects of oral potassium on blood pressure. Meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *JAMA* 1997; 277:1624-1632
9. Bucher HC, Cook RJ, Guyatt GH, Lang JD, Cook DJ, Hatala R, Hunt DL: Effects of dietary calcium supplementation on blood pressure. A meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1996; 275:1016-1022
10. Rapp JP: Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats. A review. *Hypertension* 1982; 4:6753-763
11. Luft FC, Miller JZ, Weinberger MH, Christian JC, Skrabal F: Genetic influences on the response to dietary salt reduction, acute salt loading or salt depletion in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12:suppl 3S49-S55
12. Williams GH, Hollenberg NK: Functional derangements in the regulation of aldosterone secretion in hypertension. *Hypertension* 1991; 18:suppl III43-49
13. Rabinowe SL, Redgrave JE, Shoback DM, Podolsky S, Hollenberg NK, Williams GH: Renin suppression by saline is blunted in nonmodulating essential hypertension. *Hypertension* 1987; 10:4404-408
14. McCarron DA, Lucas PA, Shneidman RJ, LaCour B, Drueke T: Blood pressure development of the spontaneously hypertensive rat after concurrent manipulations of dietary Ca^{2+} and Na^+ . *J Clin Invest* 1985; 76:1147-1154
15. Dumas P, Tremblay J, Hamet P: Stress modulation by electrolytes in salt-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Am J Med Sci* 1994; 307(Suppl. 1):130-137

16. Hamet P, Dagnault-Gelinas M, Lambert J, Ledoux M, Whissell-Cambiotti L, Bellavance F, Mongeau E: Epidemiological evidence of an interaction between calcium and sodium intake impacting on blood pressure: a Montreal study. *Am J Hypertens* 1992; 5:378-385
17. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N: A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *DASH Collaborative Research Group. N Engl J Med* 1997; 336:1611-1124
18. Weinsier RL: Fasting - A review with emphasis on the electrolytes. *Am J Med* 1971; 50:233-240
19. Kolanowski J: On the mechanisms of fasting natriuresis and of carbohydrate-induced sodium retention. *Diabete Metab* 1977; 3:131-143
20. Lander ES, Schork NJ: Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265:2037-2048
21. Pravenec M, Klir P, Kren V, Zicha J, Kunes J: An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J Hypertens* 1989; 7:217-222
22. Tietz NW, Pruden EL, Siggaard-Anderson O: Electrolytes, blood gases, and acid-base balance. In: Tietz NW (editor): *Fundamentals of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders, W.B.; 1987, pp. 616-620
23. Pybus J, Feldman FJ, Bowers GN, Jr: Measurement of total calcium in serum by atomic absorption spectrophotometry, with use of a strontium internal reference. *Clin Chem* 1970; 16:998-1007

24. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szpirer C, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: A genetic linkage map of the rat derived from recombinant inbred strains. *Mammalian Genome* 7:117-127, 1996
25. Manly KF, Elliott RW: RI Manager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. *Mammalian Genome* 1:123-126, 1991
26. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES: Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1348-1363
27. Neumann PE: Inference in linkage analysis of multifactorial traits using recombinant inbred strains of mice. *Behav Genet* 1992; 22:665-676
28. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szpirer C, Szpirer J, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J Clin Invest* 1995; 96:1973-1978
29. Hamet P, Pausova Z, Dumas P, Sun YL, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: Newborn and adult recombinant inbred strains: a tool for the search of genetic determinants of target organ damage in hypertension. *Kidney Int* 1998; 53:1488-1492
30. Motulsky AG: Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid [editorial; comment] [see

- comments] [published erratum appears in *Am J Hum Genet* 1996 Mar;58(3):648]. *Am J Hum Genet* 1996; 58:117-20
31. Sarzani R, Paci VM, Zingaretti CM, Pierleoni C, Cinti S, Cola G, Rappelli A, Dessì-Fulgheri P: Fasting inhibits natriuretic peptides clearance receptor expression in rat adipose tissue. *J Hypertens* 2000; 13:111241-1246
 32. Dessì-Fulgheri P, Sarzani R, Serenelli M, Tamburrini P, Spagnolo D, Giantomassi L, Espinosa E, Rappelli A: Low calorie diet enhances renal, hemodynamic, and humoral effects of exogenous atrial natriuretic peptide in obese hypertensives. *Hypertension* 1999; 33:2658-662
 33. Honrath U, Chong CK, Melo LG, Sonnenberg H: Effect of saline infusion on kidney and collecting duct function in atrial natriuretic peptide (ANP) gene "knockout" mice. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77:6454-457
 34. Dubois SK, Kishimoto I, Lillis TO, Garbers DL: A genetic model defines the importance of the atrial natriuretic peptide receptor (guanylyl cyclase-A) in the regulation of kidney function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:84369-4373
 35. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill Jr JR, Ulick S, Milora RV, Findling JW, Canessa CM, Rossier BC, Lifton RP: Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994; 79(3):407-414
 36. Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP: Hypertension caused by a

- truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 1995; 11:76-82
37. Baker EH, Dong YB, Sagnella GA, Roghwell M, Onnipinla AK, Markandu ND, Cappuccio FP, Cook DG, Persu A, Corvol P, Jeunemaître X, Carter ND, MacGregor GA: Association of hypertension with T594M mutation in β subunit of epithelial sodium channels in black people resident in London. *Lancet* 1998; 351:1388-1392
38. Wong YF, Stebbing M, Ellis JA, Lamantia A, Harrap SB: Genetic linkage of β and γ subunits of epithelial sodium channel to systolic blood pressure. *Lancet* 1999; 353:1222-1225
39. Brautbar N, Levi J, Rosler A, Leitersdorf E, Djaldetti M, Epstein M, Kleman CR: Familial hyperkalemia, hypertension, and hyporeninemia with normal aldosterone levels: a tubular defect in potassium handling. *Arch Intern Med* 1978; 138:607-610
40. Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N, Lifton RP: Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet* 1997; 16:202-205
41. Heath H 3rd, Jackson CE, Otterud B, Lepert MF: Genetic linkage analysis in familial benign (hypocalciuric) hypercalcemia: evidence for locus heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1993; 53:1193-200

42. Lloyd SE, Pannett AA, Dixon PH, Whyte MP, Thakker RV: Localization of familial benign hypercalcemia, Oklahoma variant (FBHOk), to chromosome 19q13. *Am J Hum Genet* 1999; 64:189-195
43. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES: Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991; 67:213-224
44. Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahasi S, Vincent M, Ganten D, Georges M, Lathrop GM: Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991; 353:521-529
45. Kreutz R, Hubner N, James MR, Bihoreau MT, Gauguier DK, Lathrop GM, Ganten D, Lindpaintner K: Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8778-8782
46. Hunt SC, Hasstedt SJ, Wu LL, Williams RR: A gene-environment interaction between inferred kallikrein genotype and potassium. *Hypertension* 1993; 22:2161-168
47. Chen A, Grigor MR, Thompson CM, Harris EL: Kallikrein binding protein (KBP) maps to rat chromosome 6 but does not cosegregate with blood pressure in a GH \times BN cross. *Mamm Genome* 1997; 8:9701-703
48. Kuchel O, Hamet P: Dopamine, extracellular cyclic AMP and sodium excretion. *Eur J Clin Invest* 1977; 7:75-76

49. Jose PA, Eisner GM, Felder RA: Role of dopamine in the pathogenesis of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26:supplS10-S13
50. Jose PA, Raymond JR, Bates MD, Aperia A, Felder RA, Carey RM: The renal dopamine receptors. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2:81265-1278
51. Wang Z-Q, Felder RA, Carey RM: Selective inhibition of the renal dopamine subtype D_{1A} receptor induces antinatriuresis in conscious rats. *Hypertension* 1999;33:504-510.
52. Albrecht FE, Drago J, Felder RA, Printz MP, Eisner GM, Robillard JE, Sibley DR, Westphal HJ, Jose PA: Role of the D_{1A} dopamine receptor in the pathogenesis of genetic hypertension. *J Clin Invest* 1996; 97:2283-2288
53. Remmers EF, Goldmuntz EA, Cash JM, Zha H, Crofford LJ, Misiewicz-Poltorak B, Mathern P, Wilder RL: Map of seven polymorphic markers on rat chromosome 14: linkage conservation with human chromosome 4. *Mamm Genome* 1993; 4:290-94
54. Ely DL: Overview of dietary sodium effects on and interactions with cardiovascular and neuroendocrine functions. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:2 suppl:594S-605S
55. Antonios TF, MacGregor GA: Deleterious effects of salt intake other than effects on blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22:3180-184
56. Schmieder RE, Langenfeld MR, Friedrich A, Schobel HP, Gatzka CD, Weihprecht H: Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. *Circulation* 1996; 94:61304-1309

57. Darvasi A, Soller M: A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet* 1997; 27:2125-132

ACKNOWLEDGMENTS

This work was part of a collaborative agreement between the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) and the 1st Medical Faculty of Charles University, Prague. It was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-14374 and MT-12574) and the Czech Republic (GA CR K015/98). The authors acknowledge Mr. Ovid Da Silva for editing this manuscript, and Mrs. Ginette Dignard for her secretarial assistance.

SELECTED ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

ANP	Atrial natriuretic peptide
B×H	Strain originating from female BN.Lx × male SHR
BN.Lx	Brown Norway consomic normotensive rats
BP	Blood pressure
Ca	Calcium
Chr(s)	Chromosome(s)
cM	Centimorgan
H×B	Strain originating from female SHR × male BN.Lx
h^2	Heritability
KBP	Kallikrein-binding protein
K	Potassium
Na	Sodium
Na/K	Sodium/potassium urinary excretion ratio
QTL	Quantitative trait loci
RIS	Recombinant inbred strains
SDP	Strain distribution pattern
SHR	Spontaneously hypertensive rats

TABLE 1**Quantitative trait loci of urinary electrolytes excretion.**

Φ	Marker	Chr	p-value	LOD	r	r ²
Na	<i>Cebrp97s5</i>	10	0.0002	3.0	-0.69	0.48
K	<i>Alb</i>	14	0.00002	3.9	-0.74	0.55
Na/K	<i>Cebrp97s14</i>	6	0.0007	1.9	-0.65	0.42
Ca	<i>Mit10</i>	7	0.0002	3.0	0.68	0.46

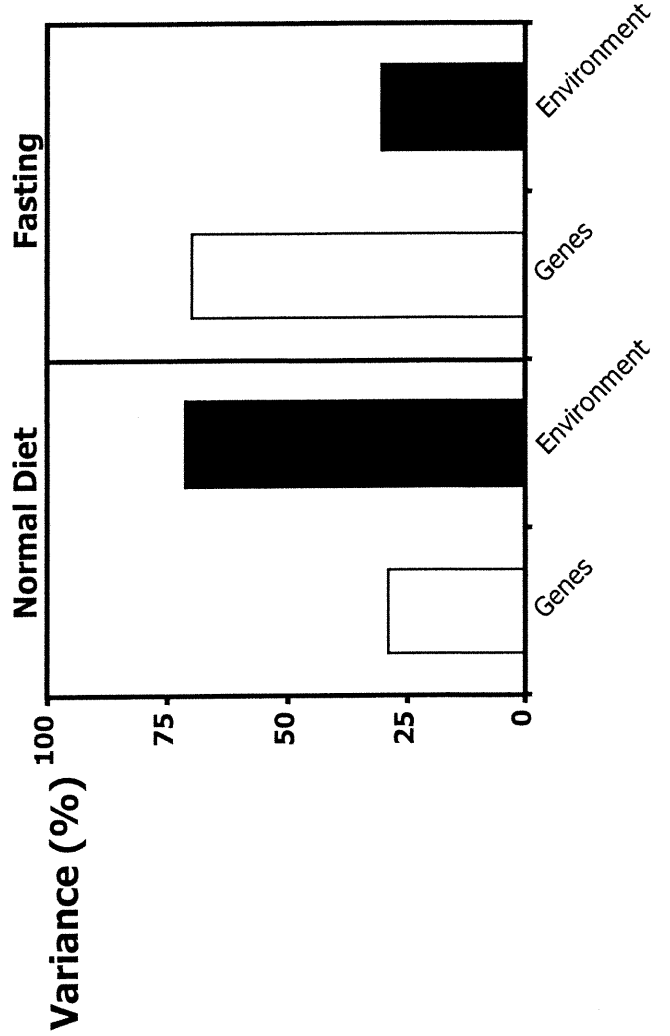
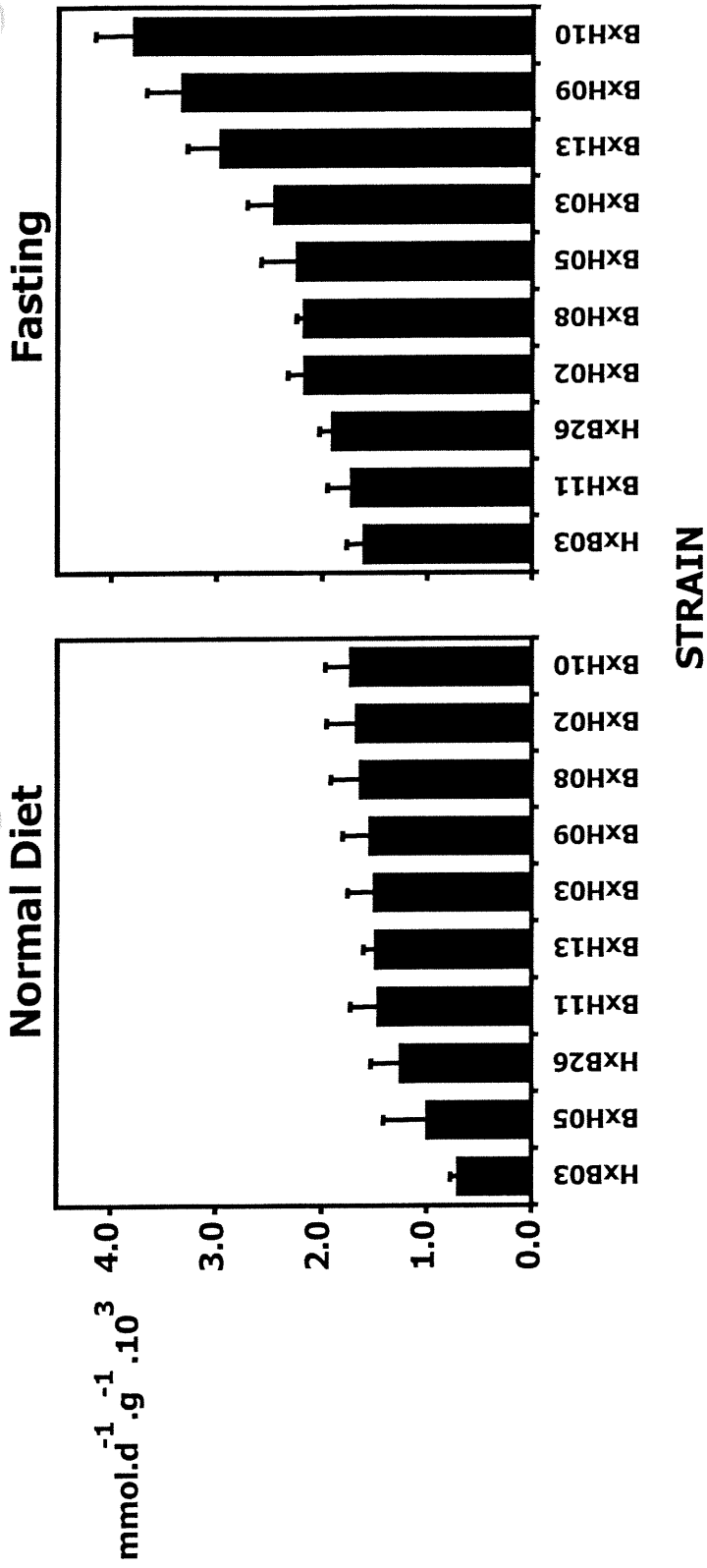
Cebrp97s5, *Cebrp97s14* and *Mit10* are anonymous markers. *Alb*, albumin gene marker. The positive correlation for Ca excretion indicates higher excretions of Ca in strains homozygous for the H (SHR) allele at the locus. Negative correlations indicate higher excretions in strains bearing the B allele at the marker locus.

FIGURE 1***a. Strain distribution pattern of Na excretion in a RIS subset of 10 strains under normal diet (left panel) and fasting (right panel) conditions.***

Four to 6 rats per strains were tested. The strains are sorted according to their increasing Na excretion. On normal diet, Na excretion denotes Na intake whereas under fasting, Na excretion represents Na wasting. Na wasting exhibits a strong gradient among the RIS tested, indicative of a genetic difference.

b. Variance of Na excretion in the subset of 10 RIS tested.

Interstrain variance denotes genetic variance whereas intrastrain variance reflects environmental variance. On normal diet (steady state), most of the variance is due to the environment (Na intake). Under fasting (adaptative state), 70% of the variance in Na excretion is due to the difference in excretion between strains, which is indicative of a strong genetic component. Shown for both cases is the ratio of genetic/environmental variances under our experimental conditions.



b

FIGURE 2

Strain distribution pattern of BP-modulating electrolyte excretion in RIS under fasting.

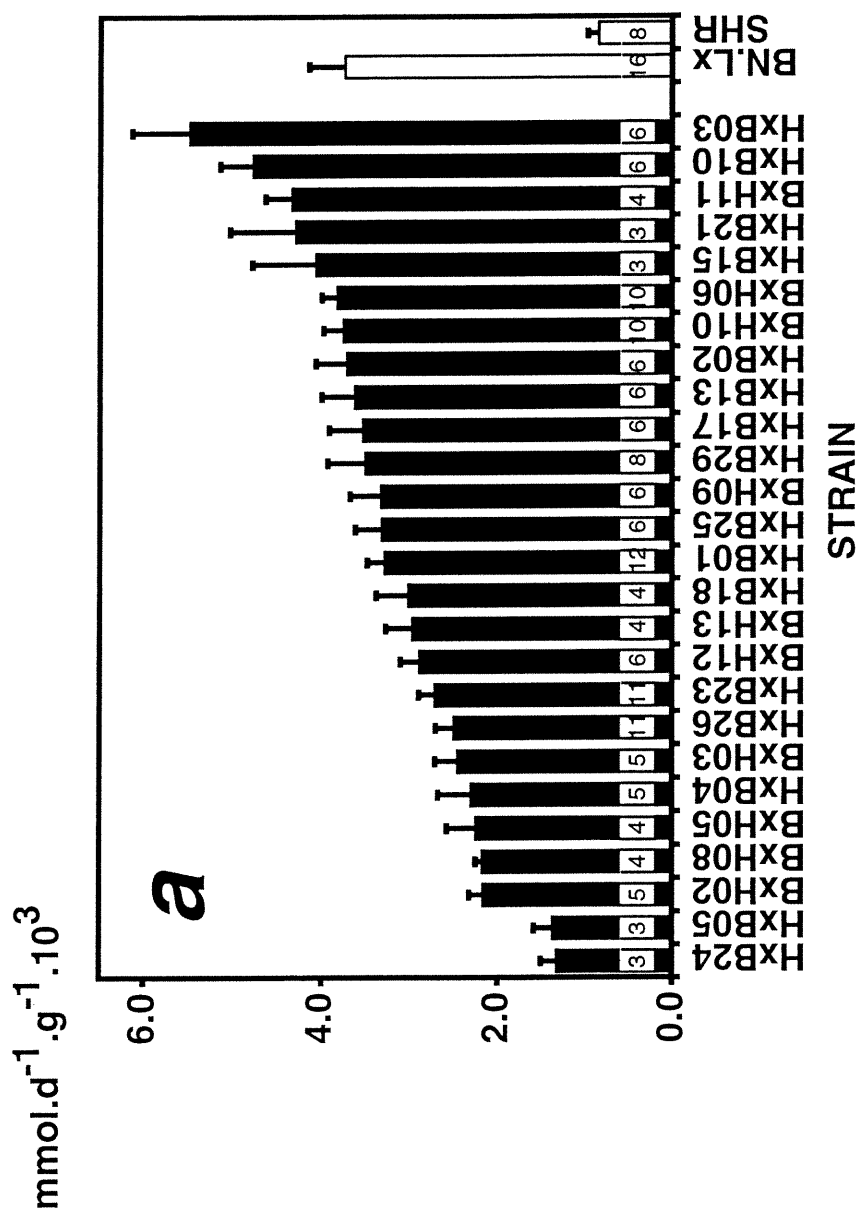
a. **Strain distribution pattern of Na excretion in 26 RIS.**

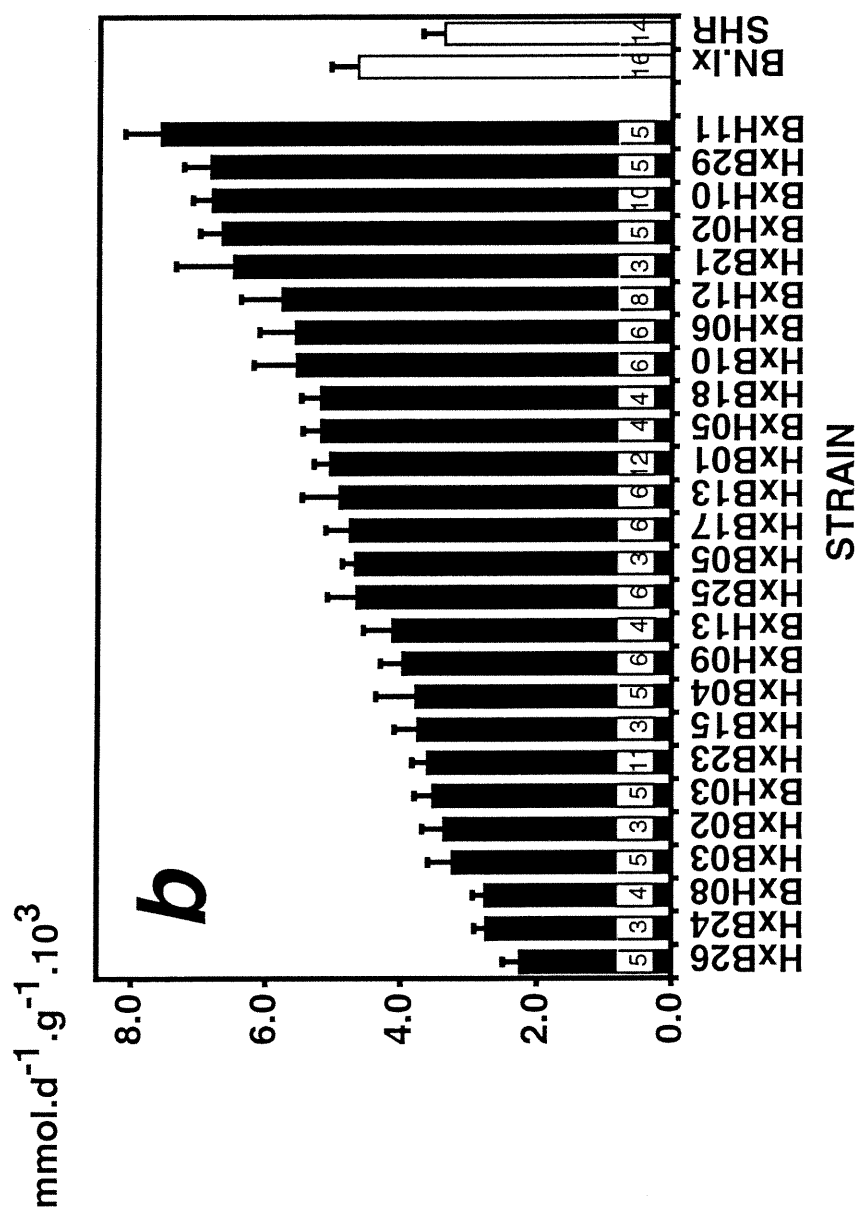
b. **Strain distribution pattern of K excretion in 26 RIS.**

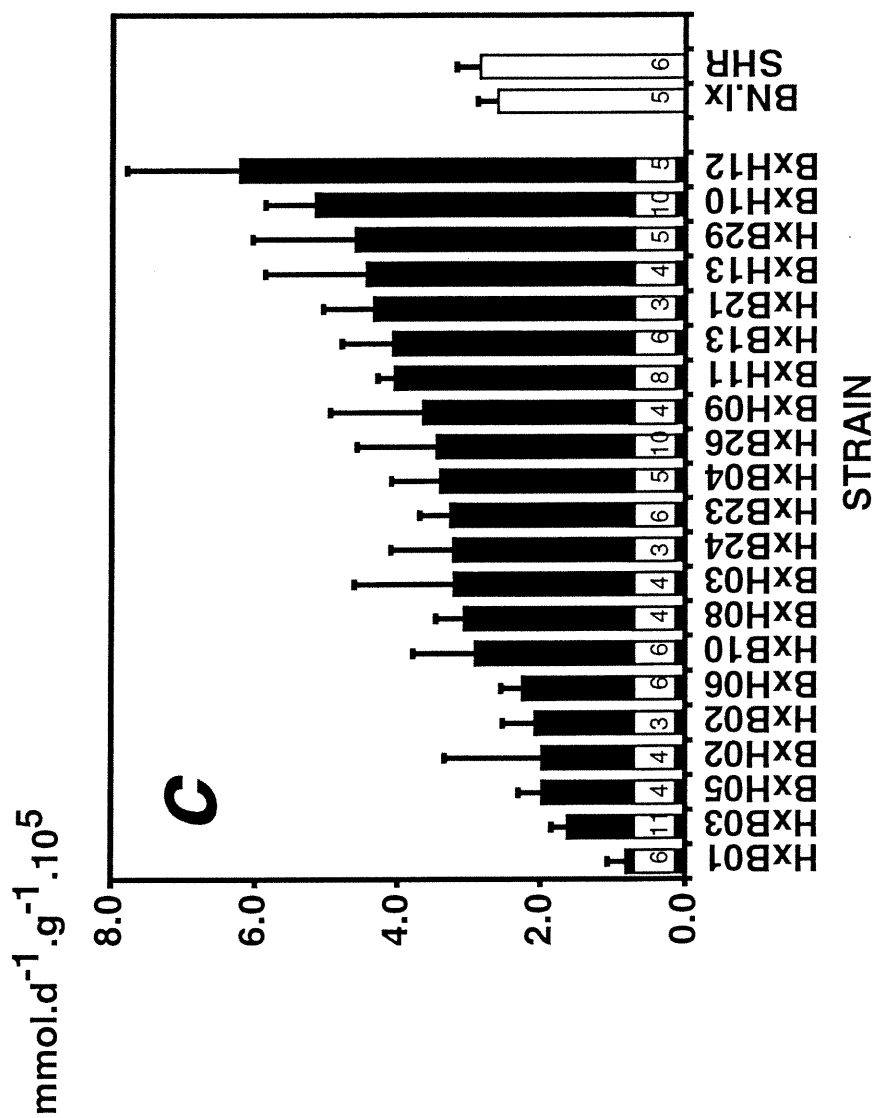
c. **Strain distribution pattern of Ca excretion in 21 RIS.**

d. **Strain distribution pattern of the Na/K excretion ratio in 26 RIS.**

Each bar represents mean 24-hour urinary excretion (or the excretion ratio) of several rats per strain. Shown within bars are the number of rats used per strain. Black bars identify the RIS tested whereas white bars denote BN.Lx and SHR progenitor strains. B×H, strains originating from female BN.Lx × male SHR crosses; H×B, strains originating from female SHR × male BN.Lx crosses.







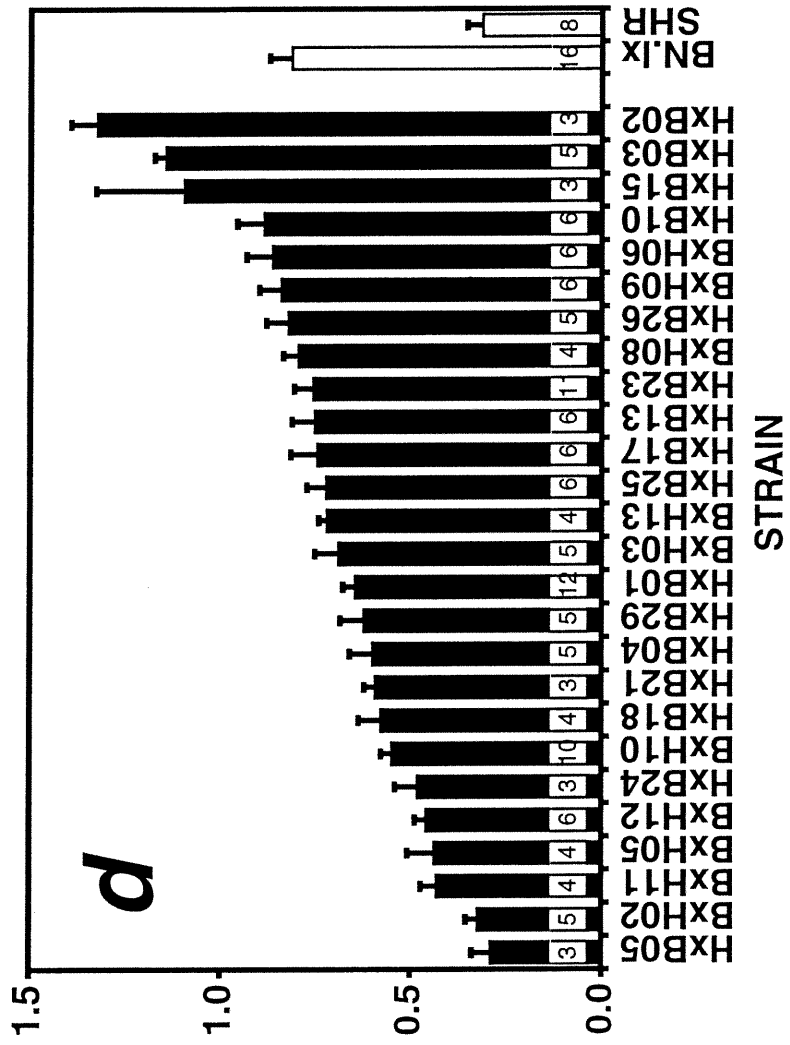
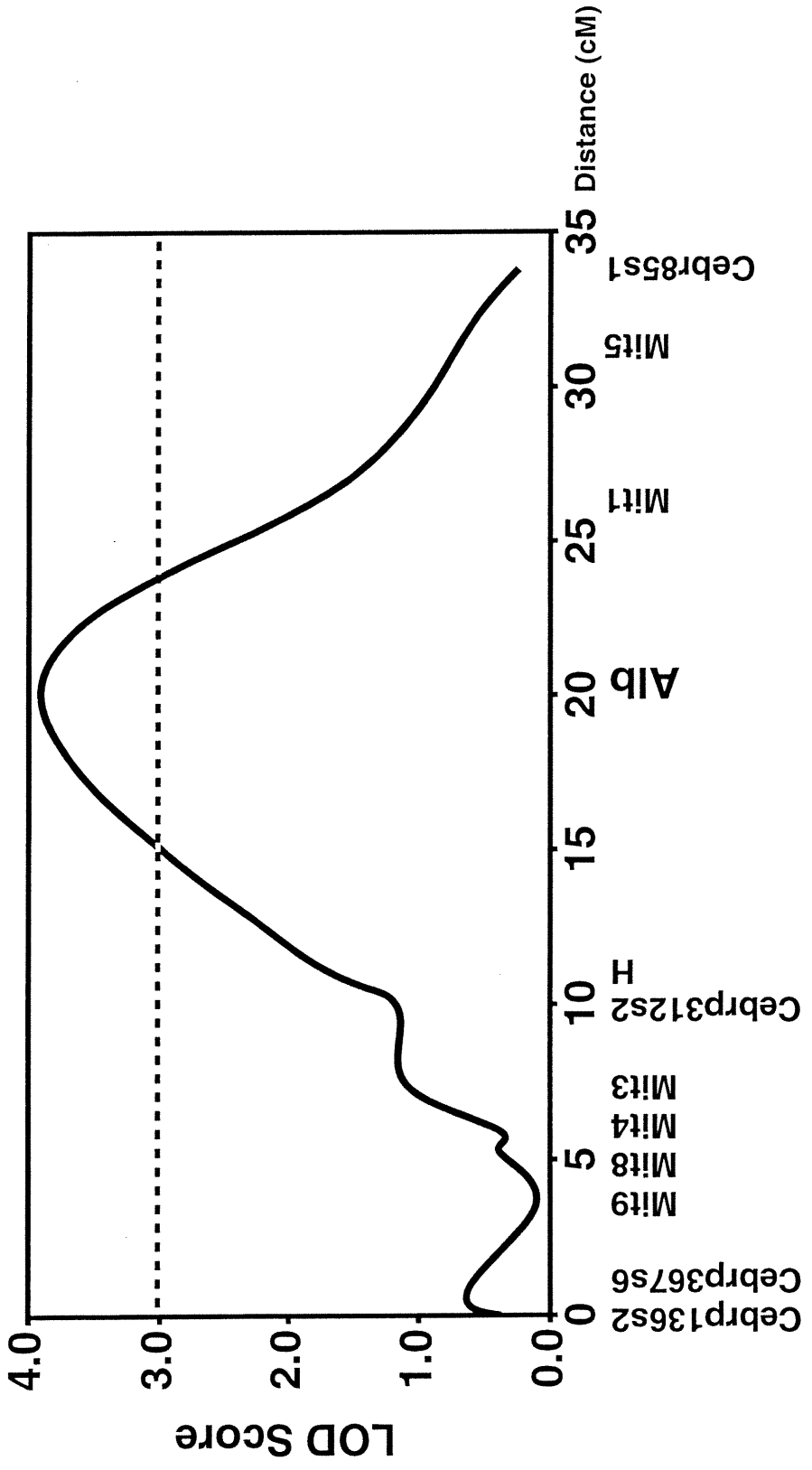


FIGURE 3**LOD plot for K excretion measured in a set of 26 RIS under fasting conditions.**

Partial linkage map of rat Chr 14 from *D14Cebrp136s2* to *D14Cebr85s1*. Chr designation (D14) is omitted; cM, centimorgan. Marker descriptions can be found in Pravenec *et al.* [24]; *Alb*: albumin gene marker. The dotted line indicates the significance threshold according to the permutation test; the 95% confidence interval (CI) was calculated according to the method of Darvasi and Soller [57] with the formula $CI=530/(N.r^2)$. N, number of strains (26), and r^2 , proportion of variance explained by the locus (55%). CI=37 cM.



Chapitre 12

PARTICIPATION DE LOCUS AUTOSOMAux ET DU CHROMOSOME Y À LA RÉPONSE AU STRESS CHEZ LE RAT

*Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the
stress response in rats*

Pierre Dumas, Zdenka Pausová, Vladimír Kren, Drahomíra Krenová, Michal Pravenec,
Marc Dumont, Daniel Ely, Monte Turner, Yulin Sun, Johanne Tremblay and
Pavel Hamet

Manuscrit publié dans la revue:

Hypertension 2000;35:568-573

ABSTRACT

Stress is a critical contributor to cardiovascular diseases through its impact on blood pressure variability and cardiac function. Familial clustering of reactivity to stress has been demonstrated in human subjects, and some rodent models of hypertension are hyperresponsive to stress. Therefore, the present study was designed to uncover the genetic determinants of the stress response. We performed a total genome linkage search to identify loci of the body temperature response to immobilization stress in a set of recombinant inbred strains (RIS) originating from reciprocal crosses of spontaneously hypertensive rats (SHR) with a normotensive Brown Norway (BN).Lx strain. Two quantitative trait loci (QTLs) were revealed on chromosomes (Chrs) 10 and 12 (logarithm of odds scores, 2.2 and 1.3, respectively). The effects of these QTLs were enhanced by a high-sodium diet (logarithm of odds scores, 4.0 and 3.3 for Chrs 10 and 12, respectively), which is suggestive of a salt-sensitive component for the phenotype. Congenics for Chr 10 confirmed both the QTL and the salt effect in RIS. Negatively associated loci were also identified on Chrs 8 and 11. Interaction between the loci of Chrs 10 and 12 was demonstrated, with the rat strains bearing SHR alleles at both loci having the highest thermal response to stress. Furthermore, the Y Chr of SHR origin enhanced the response to immobilization stress, as demonstrated in 2 independent models, RIS and Y Chr consomics. However, its full effect requires autosomes of the SHR strain. These findings provide the first evidence for the genetic determination of reactivity to stress with interactions between autosomal loci and between the Y and autosomal Chrs that contribute to the explanation of the 46% of variance in the stress response.

Key words: stress; linkage (genetic); quantitative trait; sex chromosomes

INTRODUCTION

The response to environmental stress is a predictor of cardiovascular diseases, including future high blood pressure (BP) in prehypertensive patients with a positive family history (1), and the development of left ventricular hypertrophy (2). Spontaneously hypertensive rats (SHR) and mice are more reactive to stress than their normotensive counterparts (3-6). On exposure to several psychogenic stressors, such as cage-switch, placement in an open field or immobilization, they display higher changes in heart rate, BP and body temperature (BT) (5-7). The increase in BT with immobilization stress may, thus, be proposed as an intermediate phenotype of the stress response. To identify the genetic determinants of the BT response to immobilization stress, we performed a full genome scan in a set of rat recombinant inbred strains (RIS) originating from reciprocal crosses of SHR and normotensive Brown Norway (BN).Lx strains. This is the only set of rat RIS available to study the genetics of hypertension and its related traits (8). Any quantitative phenotype that can be measured accurately and that displays a significant gradient across strains can be mapped in the RIS panel, irrespective of the difference between progenitor strains (9), in this permanent replica of the F₂ generation rendered homozygous by over 30 generations of inbreeding. Therefore we used this paradigm to identify quantitative trait loci (QTLs) of the stress response variance with increased BT after immobilization as a phenotype. Because our previous data indicated that high sodium intake heightens the response to immobilization stress (10), we measured BT in rats fed normal and high sodium diets.

METHODS

Rats. Male rats weighing 150 to 300 g were studied. RIS reciprocal crosses were derived from SHR/Ola and BN.Lx/Cub strains, as described previously (8). BN.Lx are congenic rats carrying a segment of chromosome (Chr) 8 from polydactylous PD/Cub strains (11). They are genetically distant from SHR, and were thus chosen for breeding and development of segregating strains because more polymorphic markers can be found between the 2 strains (8). Experiments were performed during 4 separate time periods, in both Prague and Montreal, which enabled us to test many of the strains twice under both dietary conditions to confirm the phenotypic values obtained. The rats were maintained on a 12-hour day/night cycle at a room temperature of 23 to 25°C. They were given access to water and food *ad libitum*, and the protocols of the study were approved by the local animal care committees. A total of 27 RIS were used for stress-response phenotyping. The high Na diet consisted of normal rat chow (0.6% Na) supplemented with NaCl to raise the Na content to 3.15% by weight (8% NaCl). Y Chr consomic strains, originally designated as SHR/y and SHR/a, were developed from Wistar-Kyoto (WKY) and SHR inbred colonies kept at the University of Akron, Ohio, as described previously (12). For uniformity of nomenclature, we designated them here as WKY.SHR-Y and SHR.WKY-Y, respectively, according to their somatic and sexual Chr origins. The SHR.BN-Y consomic strain was produced by introgressing the Y Chr from BN males into the SHR genetic background (V. Kren, DSc, *et al.*, unpublished data, 1998). The BN Y Chr is cytogenetically distinguishable from the Y Chr of SHR origin (M. Sladká, oral communication, 1998). SHR.BN-*Rattus norvegicus* Chr 10 (RNo10) congenics were obtained by introgressing a segment of BN Chr 10 onto the SHR genetic background. After 9 backcrosses, an intercross was performed, and *Myh3* BB homozygotes were selected by polymerase chain reaction genotyping. *Myh3* BB-homozygous congenic males from N9F3 with residual heterozygosity in *Myh3* flanking

markers were used. *D10Wox11*, *D10Mit4* and *D10Rat31* markers were found to be BB homozygotes. Residual heterozygosity was observed for the following *Myh3* flanking markers: *D10Wox12*, *D10Wox14*, *D10Mit2*, *D10Mgh6*, *D10Rat59* and *D10Rat102*. *D10Mit1/Ace*, *D10Mit5* and *D10Mit7* were HH homozygotes (D. Krenova, DSc, *et al.*, unpublished results, 1998). A total of 2 to 12 rats per RIS were used for phenotyping. For congenic and consomic strains, 6 to 9 rats were used (See Figures).

Thermal response to stress. BT after immobilization served as a reproducible marker of the stress response. To control the variation of the circadian rhythm of BT, all measurements were conducted between 8:00 and 12:00 AM in a calm environment. Naive animals were placed in transparent plastic restraint holders routinely used for tail-cuff determination of BP in rats, and a rectal thermal probe was introduced (3 to 5 cm) rapidly and secured around the tail. Rectal temperature was monitored continuously during the 20-minute immobilization period (T20). Two rats could be recorded simultaneously with randomization of temperature probes and strains. Temperature thermistors with a linearity between 5 and 45°C and a precision of 0.1°C were used (YSI 44202, Yellow Springs Instrument Co).

Genetic analysis. The heritability of T20 under both dietary conditions was estimated using the following formula: $heritability = V_a / (V_a + V_e)$ where V_a is the interstrain variance and V_e , the intrastrain variance. Strain distribution patterns of the thermal response to stress observed on high and normal Na diets were correlated with those of 475 biochemical, morphological, immunogenetic and molecular genetic markers available from the ratmap Internet site (13). The nomenclature and descriptions are reported in detail elsewhere (9,14). The linkage map of RIS covers 1139 centimorgans (cM) of the rat genome with a mean of 20 markers per Chr, as described previously (14).

Total genome linkage search. Linkage analysis was performed with MapManager software, which was developed and adapted by Dr. K.F. Manly for QTL analysis (MapManager QT v3.0b21) (15,16). Because of multiple simultaneous comparisons, stringent statistical criteria were used to avoid false-positive linkages (9). We ran a nonparametric permutation test, as proposed by Doerge and Churchill (17) and implemented on MapManager, which estimates thresholds of findings specified by linkage statistics on total genome scan. The thresholds used were 0.5, 0.05 and 0.001, which corresponded to suggestive, significant and highly significant linkages, respectively (18). The permutation test was run for each phenotype every 5 cM with 500 permutations to simulate the experimental conditions of marker density and multiple comparisons required, respectively. Pearson product-moment correlation analysis, which is equivalent to the Holm's t-test, was also used. It provided signs of association and an estimate of the percentage of variance of the trait explained by the locus (r^2).

Statistics. Data are presented as mean \pm SEM obtained for a single measurement in several animals, as indicated in the Results. We evaluated the relative contribution of each significant locus with a multiple linear regression model. The dependent variable was T20, and the independent predictors were the individual significant loci taken as dichotomous variables (-1 for BN.Lx genotypes, 1 for SHR genotypes). The diet effect was also studied (-1 for the normal diet, 1 for the high-salt diet). All analyses were considered significant at the 0.05 α level. Data from individual rats were computed.

RESULTS

Although the basal BT of SHR and BN.Lx strains was identical, immobilization stress for 20 minutes induced a greater thermal response in SHR compared to BN.Lx, as illustrated by higher temperature and a higher rate of BT increase (Figure 1). Rectal temperature at T20 served as the quantitative variable because it was the time of maximal response and the point where the most robust phenotypic difference between the 2 strains could be observed (Figure 1) (7). We, therefore, sought to look for specific genetic determinants of the stress response using RIS originating from reciprocal crosses of BN.Lx and SHR. In this RIS set, the strain distribution patterns of BT reached at T20 measured under both normal and high Na intake was a continuum, indicating the polygenic nature of these phenotypes, with a high correlation between the 2 diets ($r=0.83$; $p<0.0001$; Figure 2). The progenitor strains, BN.Lx and SHR, did not stand at the extremes of distribution, which indicates that alleles increasing or decreasing the stress response could be found in both progenitor strains, which is suggestive of loci interaction. Figure 2 illustrates that the degree of genetic variance (interstrain variance) largely exceeded the intrastrain variance attributable to the environment, underlying the predominance of genetic contribution to the trait. The heritability of T20 (which includes a shared environment) was estimated at 72% and 66% under normal and high Na intake, respectively. This phenotype was selected because it has a high heritability compared with phenotypes involving initial temperature such as change in temperature (ΔT), and initial rate of increase, for which heritability was 59% and 49%, respectively.

Total genome linkage search

The T20 phenotype was measured in 25 strains on a normal salt diet and in 24 strains on a high-salt diet. This analysis showed 2 QTLs on Chrs 10 and 12 (Figure 3) that were significantly associated with the T20 phenotype. The most significant

association was found on Chr 10 (*Myh3*; $r=0.58$; $p=0.0017$; logarithm of odds [LOD] score, 2.2; Figure 3a). The effect had greater significance when the stress response was measured in rats fed a high Na diet ($r=0.72$; $p=0.00002$; LOD score, 4.0). The effect of this QTL explains the 34% and 52% of the T20 variance on normal and high Na intakes, respectively.

Another QTL was found on Chr 12, with a peak at the *Lsn2* marker ($r=0.49$; $p=0.014$; LOD, 1.5 (Figure 3b). Its effect on T20 was increased by highNa intake ($r=0.69$; $p=0.000094$; LOD, 3.3). The statistical significance of these results satisfied the stringent statistical criteria proposed by Neumann (20) that are required for genome scan when using RIS.

Impact of Chr 10 QTL on the stress response: RNo10 congenic strain

Chr 10 (RNo10) congenic rats were used to further assess the impact of the locus identified in RIS. Figure 4a shows the size of the segment of BN Chr 10 transferred onto a SHR genetic background. On both normal and high Na diets, SHR.BN-RNo10 congenic rats displayed a lower T20 than SHR (Figure 4b). In accordance with the results obtained with the genome scan in RIS, the observed difference between SHR.BN-RNo10 and SHR had a greater significance with high Na intake (Figure 4b). Furthermore, the congenic paradigm narrowed down the region impacting on T20.

Negatively correlated QTLs

Negatively-correlated QTLs (i.e. where BN alleles are associated with a higher T20 value) were also found when the stress response was measured in rats under normal Na intake. The most suggestive was identified on Chr 11, with a peak at the *Mit2* marker ($p=0.0008$; LOD, 2.5; $r=-0.65$). Another negative QTL for T20 on normal diet was on Chr

8 by the *Cebr92s2* marker ($p=0.0046$; LOD, 1.9; $r=-0.55$). Interestingly, a locus for hyperactivity in the WKHA rat has been localized in the same region (21).

Consomic strains for the Y Chr: modulation of the stress response

Because the set of RIS used in this work originates from reciprocal crosses of BN.Lx and SHR (8,11), we could evaluate a putative effect of the Y Chr of SHR origin on the stress response. Strains fed a normal Na diet and bearing the Y Chr of the SHR progenitor (B×H strains) had a higher T20 than strains bearing the Y Chr from the BN.Lx progenitor (H×B strains) (Figure 5a; $p=0.02$). To further analyze this effect, we studied Y Chr consomic strains on the normal Na diet. The transfer of BN Y Chr to a SHR genetic background in SHR.BN-Y consomics significantly lowered T20 compared with SHR ($38.40\pm 0.29^{\circ}\text{C}$ versus $39.00\pm 0.16^{\circ}\text{C}$, respectively; $p<0.05$; Figure 5b). Similarly, in Y Chr consomic strains originating from WKY and SHR reciprocal crosses (22,23), T20 was significantly lower in SHR.WKY-Y, which bears the Y Chr from WKY and the autosomes of SHR, than in SHR ($38.64\pm 0.21^{\circ}\text{C}$ versus $39.15\pm 0.07^{\circ}\text{C}$; $p=0.014$; Figure 5b). It is noteworthy that the removal of SHR-Y and its replacement by either BN-Y or WKY-Y produces a similar decrease in T20. However, transfer of the Y Chr from SHR (SHR-Y) to a WKY genetic background (in WKY.SHR-Y) did not increase T20 compared with WKY ($38.34\pm 0.19^{\circ}\text{C}$ versus $38.49\pm 0.24^{\circ}\text{C}$; $p=\text{NS}$). Therefore, it seems that removing SHR-Y from the SHR background has more impact than adding it to a WKY background, which suggests that SHR-Y is needed, but not sufficient for, expression of the stress response observed in SHR. The Y Chr thus seems to have a modulating effect on autosomal QTLs of the stress response.

Relative contribution of significant QTLs on T20

We evaluated the relative contribution of significant QTLs on T20 by multiple linear regression analysis. Two significant markers were chosen as predictors of T20

(*Myh3* on Chr 10 and *Lsn2* on Chr 12) as was the Y Chr, because the impact of the latter on T20 has been confirmed in consomic strains. Data from individual rats were computed to increase the power of analysis, and the effect of the diet was evaluated. Due to multicollinearity between the primary effects and their interactions, the model cannot evaluate the impact of diet as an independent variable. We could, nevertheless, estimate the impact of the high Na diet by comparing a subset of 209 rats (21 RIS) for which stress was measured on normal and high-Na diets. We observed a significant overall diet effect (ANOVA, $p=0.022$), in accordance with the results shown in Figure 3, which are suggestive of a salt-sensitive component of T20 at these loci.

By combining the individual data under both dietary conditions ($n=242$), the following regression equation was derived:

$$T20 = \text{Int}38.694 + (0.19 * Myh3) + (0.26 * Lsn2) + (0.14 * Myh3 * Lsn2) + (0.13 * Myh3 * Y \text{ chr})$$

in which the adjusted $r^2=0.46$.

This model predicts 46% of T20 variance. The results from multiple linear regression clearly demonstrated that the effect of the significant QTLs is not only additive, but that the 3 loci also interacted: the locus on Chr 10 with the locus on Chr 12, and the locus on Chr 10 and the Y Chr. For an interaction to be present, the effect of 1 locus depends on the genotype of the other locus (24). This is clearly illustrated in Table 1: the interaction between the loci of Chrs 10 and 12 loci where the highest T20 is seen, only occurs when the SHR alleles at both loci are combined (ANOVA, $p<0.0001$ versus the 3 other genotypic combinations).

DISCUSSION

This study revealed 2 QTLs on Chrs 10 and 12 significantly associated with the BT response to immobilization stress in rats. Analysis of the syntenic regions for rat Chr 10 at the *Myh3* locus reveals a homology to the human Chr 17p13.1. An attractive candidate for the thermal response to stress is *Alox12*, a 12-lipoxygenase involved in leukotriene synthesis from arachidonic acid, which has been mapped to this region (25). Prostaglandins may play a role in the temperature response to stress in rats since antipyretics can prevent the rise in BT due to immobilization (5). Thus, abnormal arachidonic acid metabolism could alter prostaglandin synthesis. It should also be mentioned that a BP QTL was found in F2 rats from a SHR stroke prone (SHRSP) and WKY cross on Chr 10 in a segment encompassing *Myh3* (26). In RIS, no QTL for BP was detected at this locus when BP was measured via intra-arterial catheter under light gas anesthesia (9). BP during immobilization stress will have to be measured by telemetry to determine if the BP QTL found in F2 is the same as the one for T20.

Human Chr 7q21-q22 is syntenic to rat Chr 12 near the *Lsn2* locus. A malignant hyperthermia susceptibility locus (*Mhs3*) has been linked to this segment of Chr 7q. Malignant hyperthermia is a pharmacogenetic disease that susceptible individuals develop on exposure to ether and related anesthetics (27). It is noteworthy that SHR are also hypersensitive to heat and ether (3,4,28). Genes of calcium channel subunits and Na channel subunits mapped on human Chr 7q have been proposed as candidate genes for malignant hyperthermia (29-31). The *hsp27* stress gene is also a good positional candidate on Chr 12, because we have shown its modulation by the SHR-Y (32). Discussion of positional candidates must, however, be tempered by the size of the estimated confidence intervals (~30 cM) associated with these QTLs.

Finally, of great interest is the demonstration of interactions between 2 autosomal loci (Chr 10 with Chr 12 loci) and between chromosomes Y and 10. Interactions between primary QTLs should be expected with polygenic phenotypes such as the stress response. Hence, the use of different crosses may further help discriminate between confounding and primary QTLs, because different genetic backgrounds may reveal or hinder significant linkages.

This work opens the way for finding the genetic determinants of susceptibility to environmental stressors. Two major QTLs were detected, with a modulating impact of the Y Chr, as ascertained in congenic and consomic strains. These results provide the first step towards a full understanding of the genetic basis of the hyperresponse to environmental stress and its relevance to cardiovascular diseases.

REFERENCES

1. Widgren BR, Wikstrand J, Berglund G, Andersson OK: Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. *Hypertension* 1992; 20:606-611
2. Spence JD, Bass M, Cameron Robinson H, Cheung H, Melendez LJ, Malcolm O, Arnold J, Manuck SB: Prospective study of ambulatory monitoring and echocardiography in borderline hypertension. *Clin Invest Med* 1991; 14(3):241-250
3. McMurtry JP, Wexler BC: Hypersensitivity of spontaneously hypertensive rats (SHR) to heat, ether, and immobilization. *Endocrinology* 1981; 108:1730-1735
4. Malo D, Schlager G, Tremblay J, Hamet P: Thermosensitivity, a possible new locus involved in genetic hypertension. *Hypertension* 1989; 14:121-128
5. Morimoto A, Watanabe T, Morimoto K, Nakamori T, Murakami N: Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced responses in rats. *J Physiol* 1991; 443:421-429
6. Berkey DL, Meeuwssen KW, Barney CC: Measurements of core temperature in spontaneously hypertensive rats by radiotelemetry. *Am J Physiol* 1990; 258:R743-R749
7. Morley RM, Conn CA, Kluger MJ, Vander AJ: Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1990; 258:R1064-R1069

8. Pravenec M, Klir P, Kren V, Zicha J, Kunes J: An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J Hypertens* 1989; 7:217-222
9. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szirer C, Szirer J, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J Clin Invest* 1995; 96:1973-1978
10. Dumas P, Tremblay J, Hamet P: Stress modulation by electrolytes in salt-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Am J Med Sci* 1994; 307(Suppl. 1):130-137
11. Kren V: Genetics of the polydactyly luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol Med Monogr (Praha)* 1975; 58:1-104
12. Ely DL, Daneshvar H, Turner ME, Johnson ML, Salisbury RL: The hypertensive Y chromosome elevates blood pressure in F₁₁ normotensive rats. *Hypertension* 1993; 21:1071-1075
13. RATMAP. Available at: <http://ratmap.gen.gu.se>. Accessed 1998.
14. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szpirer C, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: A genetic linkage map of the rat derived from recombinant inbred stains. *Mamm Genome* 1996; 7:117-127
15. Manly KF: A Macintosh program for storage and analysis of experimental mapping data. *Mamm Genome* 1993; 4:303-313

16. Manly KF, Elliott RW: RI Manager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. *Mamm Genome* 1991; 1:123-126
17. Doerge RW, Churchill GA: Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 1996; 142:285-294
18. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES: Parametric and nonparametric linkage analysis: A unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1348-1363
19. Darvasi A, Soller M: A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet* 1997; 27:125-132
20. Neumann PE: Inference in linkage analysis of multifactorial traits using recombinant inbred strains of mice. *Behav Genet* 1992; 22:665-676
21. Moisan M-P, Courvoisier H, Bihoreau M-T, Gauguier D, Hendley ED, Lathrop M, James MR, Mormède P: A major quantitative trait locus influences hyperactivity in the WKHA rat. *Nat Genet* 1996; 14:471-473
22. Ely DL, Turner ME: Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension* 1990; 16:277-281
23. Turner ME, Johnson ML, Ely DL: Separate sex-influenced and genetic components in spontaneously hypertensive rat hypertension. *Hypertension* 1991; 17:1097-1103
24. Frankel WN, Schork NJ: Who's afraid of epistasis? *Nat Genet* 1996; 14:371-373

25. Yoshimoto T, Arakawa T, Hada T, Yamamoto S, Takahashi E: Structure and chromosomal localization of human arachidonate 12-lipoxygenase gene. *J Biol Chem* 1992; 267:24805-24809
26. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES: Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991; 67:213-224
27. Denborough MA, Forster JFA, Lovell RRH, Maplestone PA, Villiers JD: Anaesthetic death in a family. *Br J Anaesth* 1962; 34:395-396
28. Malo D, Pang SC, Schlager G, Tremblay J, Hamet P: Decrease of blood pressure in spontaneously hypertensive mice by heat treatment. *Am J Hypertens* 1990; 3:400-404
29. Powers PA, Scherer SW, Tsui L-C, Gregg RG, Hogan K: Localization of the gene encoding the alpha-2/delta subunit (CACNL2A) of the human skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel to chromosome 7q21-q22 by somatic cell hybrid analysis. *Genomics* 1994; 19:192-193
30. Iles DE, Lehmann-Horn F, Scherer SW, Tsui LC, Olde Weghuis D, Suijkerbuijk RF, Heytens L, Mikala G, Schwarts A, Ellis FR, Stewart AD, Deufel T, Wieringa B: Localization of the gene encoding the alpha 2/delta-subunits of the L-type voltage-dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families. *Hum Mol Genet* 1994; 3(6):969-975
31. MacLennan DH, Phillips MS: Malignant hyperthermia. *Science* 1992; 256:789-794

32. Ely D, Caplea A, Dunphy G, Turner M, Takiyyuddin M, Tremblay J, Hamet P: Interaction of the Y chromosome, heat shock protein and sympathetic nervous system., in McCarty R, Aguilera G, Sabban E, Kvetnansky R (eds): *Stress: Molecular Genetic and Neurobiological Advances.*, New York, Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1996, pp 281-297

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Josée Bédard-Baker for her excellent secretarial assistance, Ovid Da Silva for editing this manuscript, and Dr. Howard J. Jacob from the Medical College of Wisconsin, Dr. Nicholas J. Schork from Harvard University and Drs. Bernard Brais and Alan Y. Deng of the Research Centre-CHUM for their helpful comments. This work was supported by the Medical Research Council of Canada (MT-12574, MT-14374 and MT-11463); Pfizer Canada; the Czech Republic (GA CR K015/98) within the framework of a collaborative agreement between Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) of the University of Montreal and the 1st Medical Faculty of Charles University, Prague; and by the National Institutes of Health (NIH HL R01-48072-06 to Dr Ely).

Selected abbreviations and acronyms

B×H	Strain originating from female BN.Lx × male SHR
BP	Blood Pressure
BT	Body Temperature
Chr(s)	Chromosome(s)
cM	Centimorgan
H×B	Strain originating from female SHR × male BN.Lx
Na	Sodium
QTL	Quantitative Trait Locus
RIS	Recombinant Inbred Strains
RNo10	<i>Rattus norvegicus</i> chromosome 10
SHR	Spontaneously Hypertensive Rats
SHR.BN-RNo10	SHR congenics bearing part of chromosome 10 from BN
SHR.BN-Y	SHR consomics bearing the Y chromosome from BN
WKY.SHR-Y	WKY consomics bearing the Y chromosome from SHR
SHR.WKY-Y	SHR consomics bearing the Y chromosome from WKY
SHR-Y	Y chromosome of SHR origin
T20	Temperature at 20 minutes of immobilization

TABLE 1

T20 values resulting from the genotypic combination of *Myh3* (QTL on Chr 10) and *Lsn2* (QTL on Chr 12) loci: interaction between the 2 loci

		<i>Myh3</i> (Chr 10 QTL)	
		BB	HH
<i>Lsn2</i> (Chr 12 QTL)	BB	38.42±0.06 (72)	38.59±0.1 (14)
	HH	38.63±0.06 (75)	39.41±0.06 (81)*

Values are mean±SEM (No. of rats per genotypic combination). BB indicates homozygous for the BN.Lx allele; HH, Homozygous for the SHR allele. * p<0.0001 by ANOVA vs the other 3 combinations.

FIGURE 1

Body temperature during immobilization stress in BN.Lx and SHR strains.

Values are mean \pm SEM. $P < 0.05$ by ANOVA; $n=8$ and $n=5$ for BN.Lx and SHR, respectively.

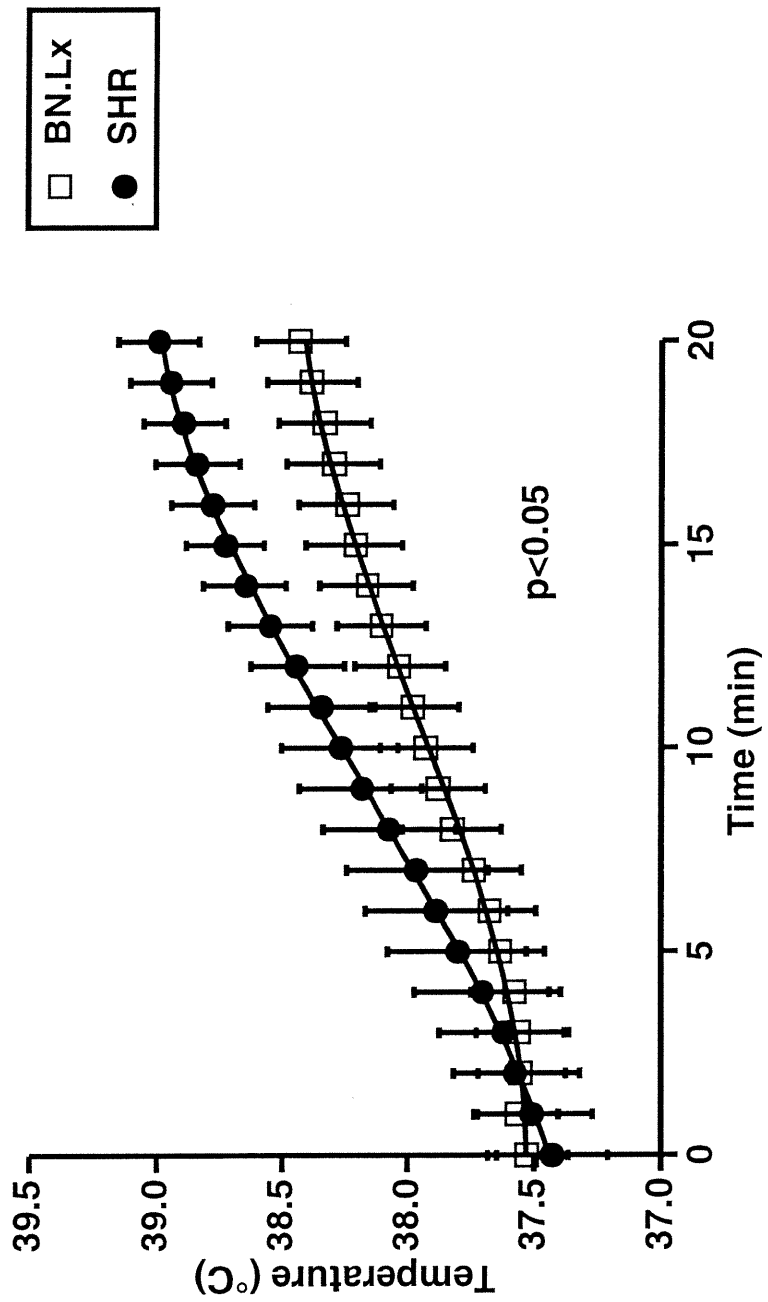


FIGURE 2

***a.* Strain distribution pattern of T20 (mean \pm SEM) measured under normal Na intake in 25 RIS.**

***b.* Strain distribution pattern of T20 measured under high-Na intake in 24 RIS.**

White bars indicate BN.Lx and SHR progenitor strains. B×H are strains originating from crosses of female BN.Lx and male SHR, while H×B are strains originating from crosses of female SHR and male BN.Lx. Shown within bars are the number of rats used per strain.

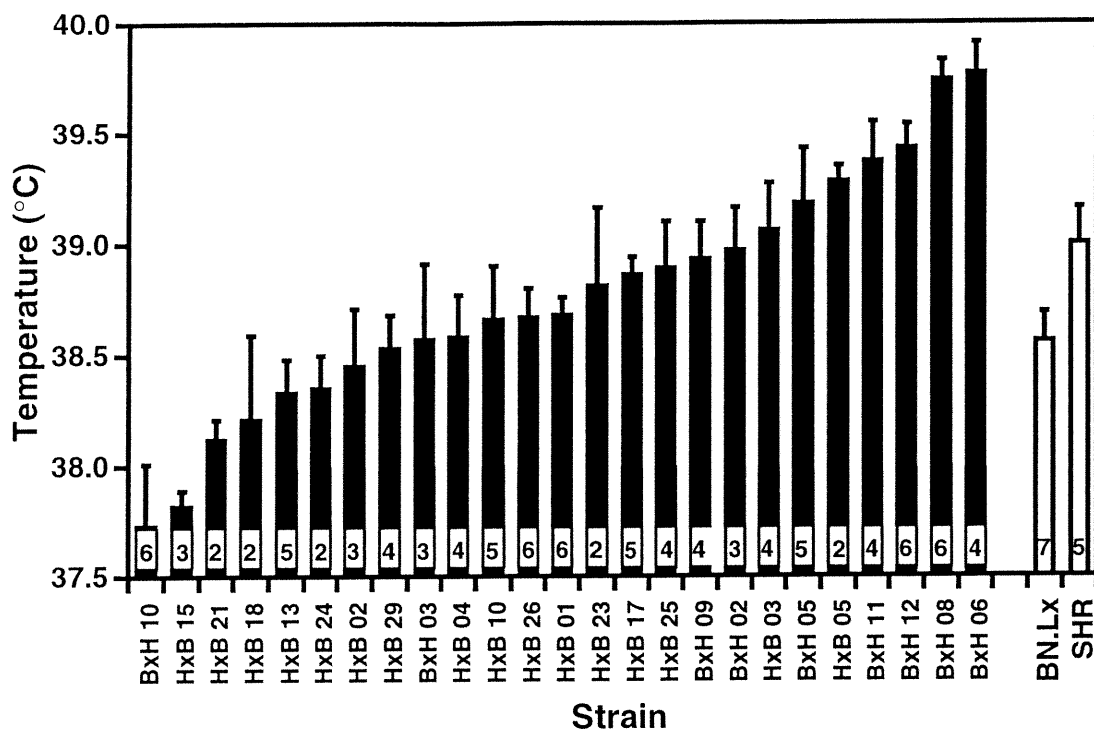
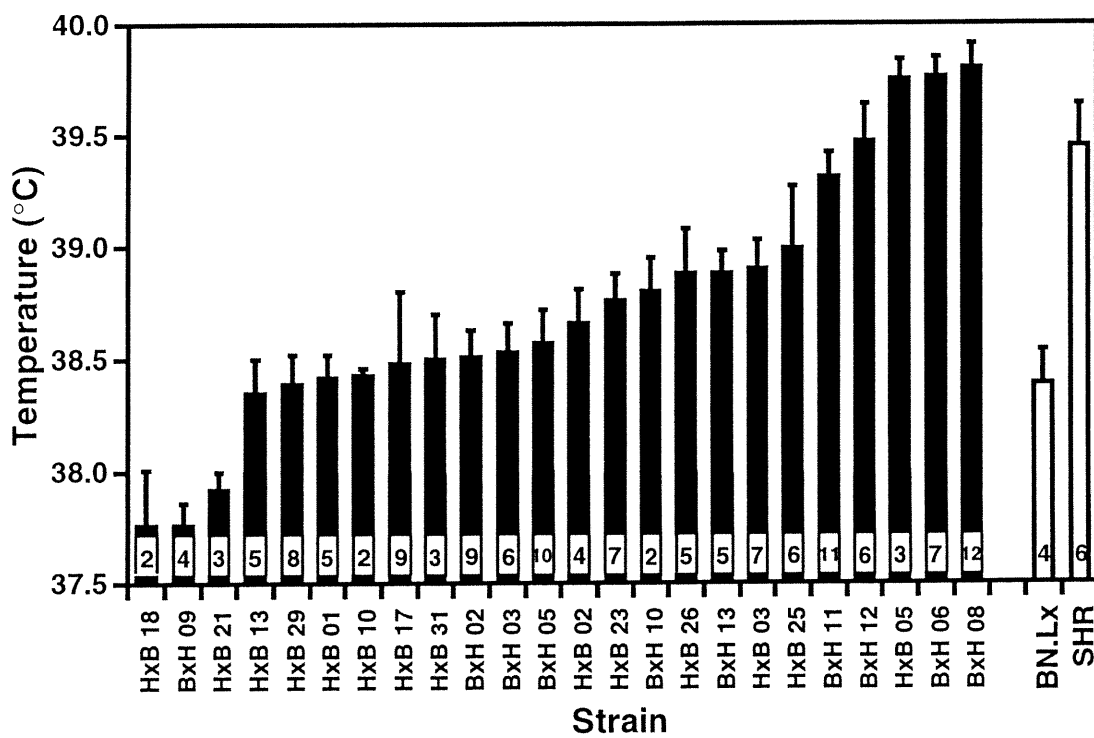
a**b**

FIGURE 3

QTL plot for T20 measured in 21 RIS under normal and high Na intake

***a.* Chr 10. Partial linkage map from Dcp1 to Mit4 from Pravenec *et al.* (14).**

Chr designation (D10) is omitted. CI=26 cM.

***b.* Chr 12. Partial linkage map from Cebr6s4 to Mit8 from Pravenec *et al.* (14).**

Chr designation (D12) is omitted. CI=33 cM.

Dotted line indicates the significance threshold according to permutation test. The 95% confidence intervals (CI) were calculated according to the method of Darvasi and Soller (19) using the formula: $CI=530/(N \cdot r^2)$, with $N=49$ strains, and r^2 =proportion of the variance explained. Data (strains) from both conditions were combined; cM, centimorgan.

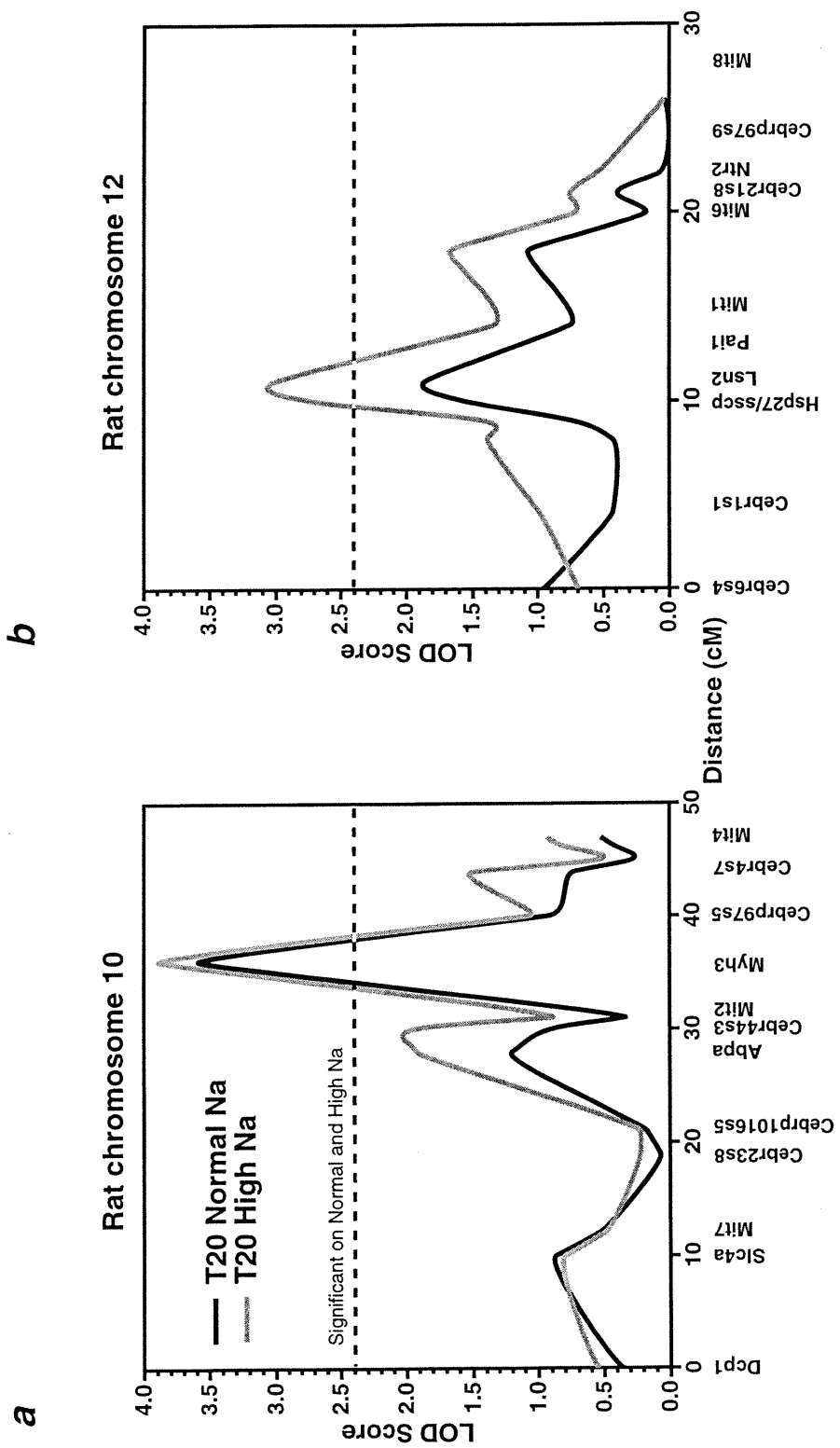


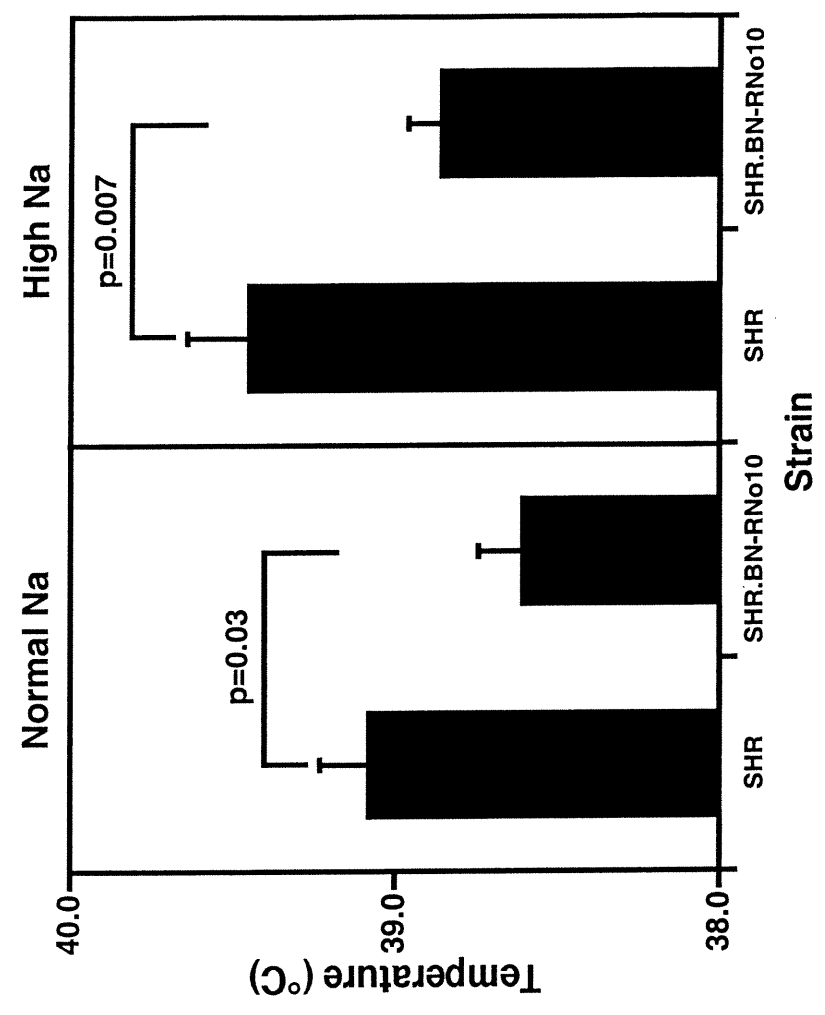
FIGURE 4**Impact of BB genotype at *Myh3* marker on stress response for SHR.BN-RNo10 congenic strain****a. Characterization of RNo10 segment of BN transferred to SHR in SHR.BN-RNo10 congenics studied.**

Markers *D10Mit4*, *D10Wox12*, *D10Rat31*, *D10Wox11* and *Myh3* were found to be homozygous BB in all rats studied. *D10Mit7*, *D10Mit5* and *D10Mit1 (Ace)* were found to be of the HH genotype, and residual heterogeneity was found for *D10Wox14 (D10Mgh22)*, *D10Mgh6*, *D10Mit2* and *D10Rat59*. White bar denotes the region of BB homozygosity, whereas black bars denote background HH homozygosity. Gray bars are regions where heterozygosity was found or cannot be excluded.

b. Impact of BB genotype at *Myh3* marker on thermal stress response.

SHR.BN-RNo10 indicates congenic rats bearing a segment of BN Chr 10 that are homozygous BB at *Myh3* marker with a SHR genetic background. $P=0.03$ and $p=0.007$ when stress is measured under normal and high Na diets, respectively, compared with SHR (t-test, $n=6$ and 8 under normal Na and $n=6$ and 9 under high Na for SHR and congenics, respectively).

b



a

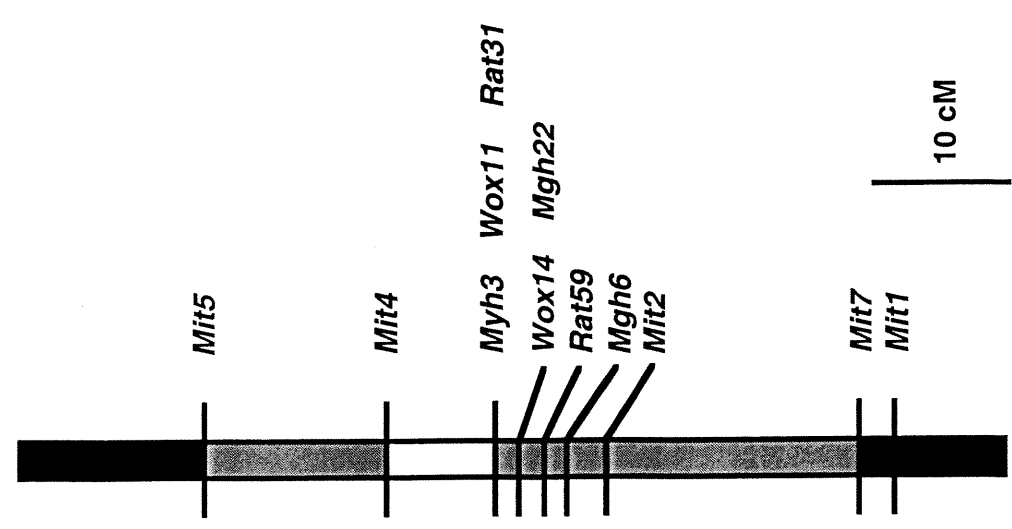
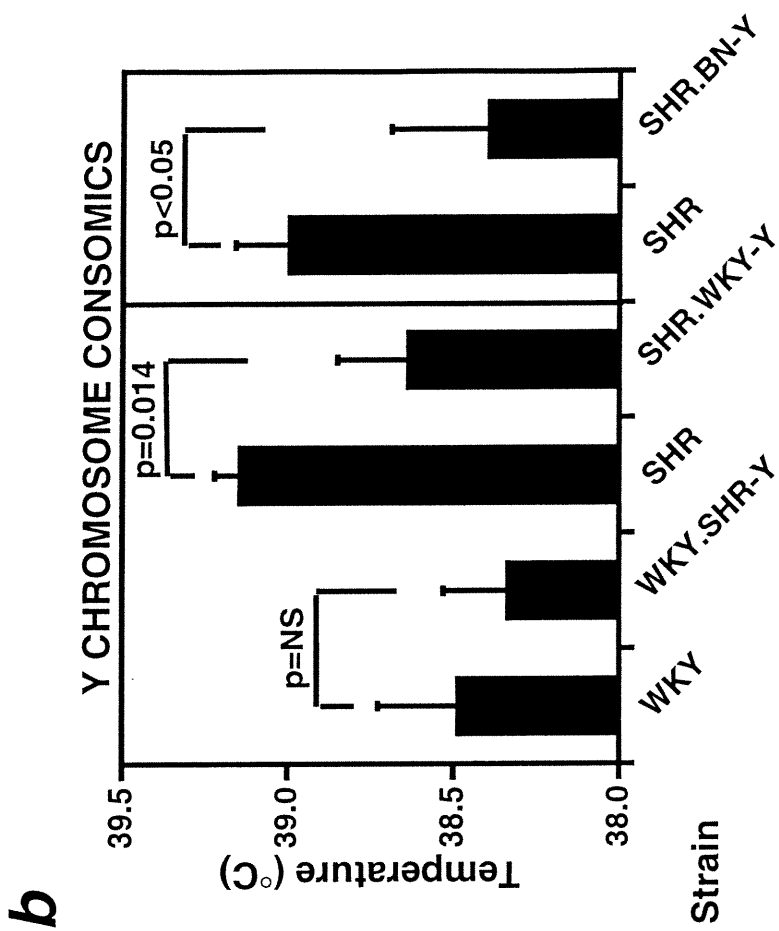
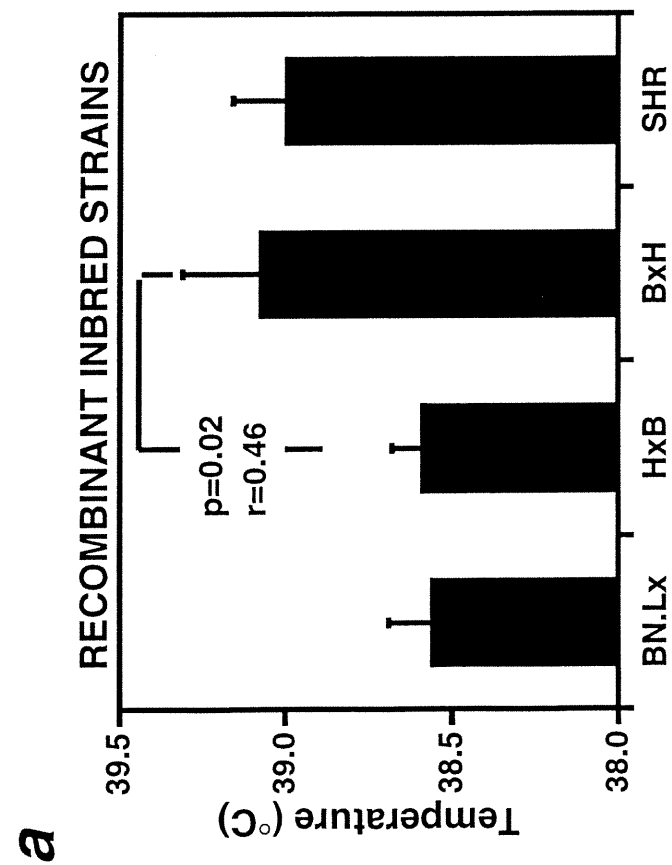


FIGURE 5***a. Impact of the Y Chr on the stress response in RIS.***

H×B indicates strains bearing the Y Chr from normotensive BN.Lx progenitor (n=16 RIS). B×H indicates strains bearing the Y Chr from hypertensive SHR progenitor (n=9 RIS). BN.Lx (n=7 rats) and SHR (n=5 rats) strains are included for comparison.

b. Impact of the Y Chr on the stress response in WKY.SHR-Y and SHR.WKY-Y consomic strains.

F=5.57 and p=0.0082 by ANOVA.



Chapitre 13

LOCALISATION DE LOCUS RESPONSABLES DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES GÈNES DE STRESS CHEZ DES LIGNÉES DE RATS RECOMBINANTES CONSANGUINES

*Mapping of quantitative trait loci (QTL) of differential stress
gene expression in rat recombinant inbred strains*

Pierre Dumas, Yulin Sun, Gilles Corbeil, Sandra Tremblay, Zdenka Pausova, Vladimir
Kren, Drahomira Krenova, Michal Pravenec, Pavel Hamet and Johanne Tremblay

Manuscrit publié dans la revue:

J Hypertens 2000;18:545-551

ABSTRACT

Objective: Stress has been shown to be a major environmental contributor of cardiovascular diseases through its effects on blood pressure variability and cardiac function. The cellular stress response is characterized by the expression of specific heat stress genes (*hsp*), under the transcriptional control of heat shock transcription factors (HSTFs). The levels of *hsp* mRNA depend on the severity of the stress with *hstf1* acting as a stress sensor. The aim of this work was to evaluate the genetic contribution of the variability in *hsp* expression, and to identify its putative quantitative trait loci (QTL).

Methods: Twenty recombinant inbred rats strains (RIS) were studied. The animals underwent a standardized, identical 1 h immobilization stress in restraint cages, followed by 1 h of rest before sacrifice. Total RNA was extracted from the heart, kidneys and adrenals, and the mRNA levels of *hsp27*, *hsp70*, *hsp84*, *hsp86* and *hsp105* were measured. The strain distribution pattern (SDP) of *hsp* expression was correlated with that of 475 polymorphic markers distributed throughout the RIS genome. A polymorphism of rat *hstf1* in RIS was used for its mapping in RIS.

Results: Despite an identical stress being applied to all strains, *hsp* expression showed up to a 12-fold gradient with little intra-strain variability indicative of a strong genetic contribution to the trait. Heritability ranged from 50 to 77% for most *hsps* in the three target organs. The continuous SDP of the stress gene expression indicated the polygenic nature of the trait. A common locus on chromosome 7 (at *D7Cebrp187s3* marker) was consistently associated with all *hsp* expression in most of the organs (with a likelihood of odds [LOD] score of 3.0 for *hsp27* expression). We have mapped the rat *hstf1* on chromosome 7 at the same locus. Finally, *D4Mit19* marker was significantly associated with *hsp84* expression in the heart (LOD score of 3.1).

Conclusion: Two loci were linked with the differential expression of *hsps* in response to immobilization stress in target organs of RIS. The chromosome 7 locus unveiled for

all *hsps* could explain up to 42% of the observed inter-strain variability of *hsp* levels in response to stress. We propose *hstf1* as a positional candidate at this locus.

Keywords: genetic linkage; *hsp*; *hstf*; recombinant inbred strains; stress

INTRODUCTION

Originally named heat shock proteins, heat stress proteins (HSPs) are a specific set of highly conserved proteins that are induced by several stressors, such as heat, metal ions, nutrient deprivation and other cell insults [1]. Four major families of stress proteins can be distinguished according to the molecular mass of their members: 110, 90, 70 and 27 kilodaltons [2]. They are believed to be involved in the adaptative response of the cell to stress, and protect other proteins from denaturation, by acting as molecular chaperones [3]. Stress proteins have been studied extensively in cells *in vitro* [4], where they have been shown to be essential for the induction of thermotolerance and protection against cell death [5, 6], as well as *in vivo* where their protective role is seen in pre-conditioning [7, 8].

Upon stimulation by stressors, specific heat shock transcription factors (*HSTF1* and 2) bind to heat shock element (HSE), a *cis*-acting sequence in the promoter of stress-responsive genes, to turn on their expression [9]. *HSTFs* are thought to be the sensor of the stress response [10-12]. Previous studies have shown that 1 h of heat or immobilization stress in rats and mice induces *hsp* mRNA synthesis in several organs via the activation of *HSTF* [4, 13-15].

Stress is among the main environmental modifiers of blood pressure. It has been demonstrated that normotensive subjects with a positive family history of hypertension present a higher blood pressure response to mental and physical stressors than matched normotensive controls [16]. Furthermore, this higher stress susceptibility is predictive of their future high blood pressure status [17, 18]. We have proposed that stress genes could play a role in the abnormal stress sensitivity observed in hypertensives [19]. We have reported an increased expression of *hsp27* and *hsp70* in hypertensive mice, rats and

humans in response to several stressors [20-22]. The onset of transcription was faster, and the peak of accumulation higher in hypertensive strains, followed by a more rapid decline to baseline for both mRNA and protein [4, 20, 21]. This increased accumulation appears to be due to enhanced activation of HSTFs in spontaneously hypertensive rats (SHR) [21]. Two loci containing *hsp* were found to co-segregate with blood pressure and left ventricular mass: the first, within the major rat histocompatibility complex (RT1) on rat chromosome 20, contains *hsp70*, and the second, on rat chromosome 12, bears *hsp27* [23, 24].

The present study attempts to identify the genetic determinants of *hsp* expression upon *in vivo* stimulation. Recombinant inbred strains (RIS) of rats were used as a genetic tool for segregation studies, and *in vivo* immobilization of conscious animals in restraint cages was applied as the stressor.

METHODS

RIS of BN.Lx × SHR

Seven- to 9-week-old male rats were used. RIS were obtained from reciprocal crosses of Brown Norway/cub (BN.Lx) × SHR, as described previously [25]. The animals were maintained in a 12 h day/night cycle with food and water *ad libitum*, and the protocols were conducted after approval by the local animal care committee. Twenty RIS available at the time of the study were used for the determination of *hsp* mRNA levels, and *hstf1* genotyping was performed with DNA from 33 original strains.

hsp expression in RIS

The animals were submitted to standardized 1 h immobilization stress, followed by 1 h of rest to allow for mRNA accumulation [13]. They were then sacrificed by cardiac puncture under light isoflurane anaesthesia (Abbott, Montreal, Canada). The target organs (heart, adrenal and kidney) were removed, frozen rapidly in liquid nitrogen, and kept at -80°C until used. Total RNA was extracted from 100-200 mg of tissue by the acid guanidium-isothiocyanate-phenol-chloroform method [26]. One μg of each sample of total RNA was blotted on a nylon membrane (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) with a vacuum Dot-Blot apparatus (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The RNA were fixed under ultraviolet light, and the membranes probed with cDNAs of five *hsps*: *hsp27*, *hsp70*, *hsp84*, *hsp86* and *hsp105*. Quantification was undertaken with a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA), and the data corrected for poly(A) RNA. Samples from four rats per strain were used for each organ and each *hsp* tested.

Mapping of quantitative trait loci (QTL) determining hsp expression

The strain distribution patterns (SDP) of *hsp* expression in the RIS were correlated with those of 475 polymorphic markers mapped previously [27, 28], and distributed evenly on the RIS genome, covering 1,139 cM of the rat genome with a mean of 20 markers per chromosome. The SDP of these markers are available from the Ratmap web site (<http://ratmap.gen.gu.se>). Linkage analysis was performed by MapManager software (MapManager QT v3.0b21) to estimate likelihood ratio statistics [29, 30], and by Pearson's product-moment correlation. A *P-value* threshold of 0.0003 for the entire genome search was set to claim significant linkage [31].

Statistics

The data are presented as mean \pm SEM of four animals per strain. Heritability (h^2) (including shared environment) was calculated according to the formula $h^2 = V_a / (V_a + V_e)$ where V_a is the trait (inter-strain) variance and V_e the residual intra-strain variance.

Single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis and chromosomal localization of hstf1 in RIS

The *hstf1* rat cDNA sequence was obtained from Genbank (Accession No. X83094, NID g758270). *hstf1* polymorphisms between BN.*Lx* and SHR progenitors were sought by using pairs of primers designed to amplify regions covering the entire cDNA. A polymorphism between BN.*Lx* and SHR was found in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the sequence. Primers delimiting this region were then employed to amplify genomic DNA from 33 RIS. The sense primer was HSF1-1419 (GACAAGACAGTTGGGTAGTC), and the antisense primer was HSF1-1624 (ATGAACAACCTGCAGGGTCA), for an expected polymerase chain reaction (PCR) product of 205 bp. Amplification was performed on 100 ng of DNA in the presence of

^{32}P -dCTP to label the molecules in a Perkin Elmer-Cetus DNA thermal cycler (Norwalk, Connecticut, USA), using forty pmol of each primer. Three minutes of heating at 95°C were followed by 35 cycles of amplification, each consisting of 40 s at 95°C, 40 s at 62°C, and 90 s at 72°C. A period of elongation of 7 minutes was completed after the last cycle.

SSCP gels were used as described previously [24]. RIS genotyping was established by direct observation of the electrophoretic pattern of the denatured PCR products on non-denaturing polyacrylamide gels scanned with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). The genotype results were scored, and the SDP of *hstf1* was compared to the SDP of the genomic markers described above.

Direct sequencing of hstf1

Polymorphic DNA fragments from BN.*Lx* and SHR were eluted from 1% agarose gel. They were re-amplified and then purified with Centricon-50 (Amicon Inc., Beverly, Massachusetts, USA) to eliminate the oligonucleotides. Direct sequencing was carried out according to instructions from the Cycle Sequencing kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

RESULTS

SDP of *hsp* expression in RIS

Figures 1a-c show the SDP of mRNA levels of five *hsp* genes in the rat adrenal, heart, and kidney respectively, following the immobilization of rats from 20 RIS. The most striking aspect of these SDP is that, despite identical stress being applied to all rats, *hsp* expression varied from 2- to 12-fold within strains, while the intra-strain variation ranged from negligible to a maximum of 2-fold. The pattern of expression of individual *hsps* was highly correlated between the three organs (data not shown). The strong gradient of expression between RIS combined with the low intra-strain variation indicated a strong genetic component responsible for the *hsp* expression variance. Heritability of *hsp* expression ranged from 50-77% in the adrenal, 55-75% in the heart and 34-76% in the kidney. The SDP were continuous for all the *hsp* genes tested, indicating the polygenic nature of the phenotype. Finally, the two progenitor strains BN.*Lx* and SHR demonstrated intermediate levels of expression, indicating the presence of positive and negative QTL modulating the trait.

QTL for *hsp* mRNA expression

A summary of the results from genome scanning is presented in Table 1. *D4Mit19* marker (chromosome 4) was significantly associated with *hsp84* expression in the heart ($r=0.71$, $p=0.0002$, LOD score of 3.1; Fig. 2). At present, there is no physiologically relevant positional candidate at this locus. The Y chromosome and *Myh3*, a chromosome 10 locus, were found to have suggestive linkage to *hsp* expression. These two loci were also linked to the thermal stress response [32], which suggests that at least part of the thermal and *hsp* response to stress is common. Interestingly, the *D12Cebrp97s9/s4* (D12) locus is within 4 cM of the *hsp105* locus on chromosome 12, suggesting that *hsp105* could modulate its own expression in the kidney. A locus on

chromosome 7 (*D7Cebrp187s3/D7Cebr77s1*) was found consistently, although with variable levels of significance, for all *hsp* in the organs studied. By combining the results obtained in the three organs for each *hsp*, the association reached the threshold of significance, with LOD scores of 3.0 for *hsp27* (see Table 1). The highly significant correlations (data not presented) between *hsp* gene expression (except for *hsp84*), indicated that part of the variance in expression is shared by the five different genes, with part of this common variance due to the D7 locus. The omnipresence of this locus in the expression of *hsps* prompted us to search for positional candidate genes. We found that the region encompassing *Cyp11b1* and *Myc* genes on rat chromosome 7 is syntenic to the human chromosome 8 region where *hstf1* was mapped [33].

Localization of *hstf1* on rat chromosome 7

A polymorphism was detected in the 3'-UTR of *hstf1* between BN.*Lx* and SHR with the use of HSF1-1419 and HSF1-1624 primer pairs. Genotyping of 33 RIS was performed, and the expected BB or HH homozygosity demonstrated in all strains (Fig. 3a). Rat *hstf1* gene was mapped in a 4.4 cM region between *D7Mit3* and *D7Mit4*, a region undistinguishable from the *D7Cebrp187s3/D7Cebr77s1* locus (Fig. 3b). The sequencing of polymorphic fragments indicated a single base difference, G in BN.*Lx* and A in SHR, at position 1565 in the 3'-UTR of *hstf1* gene. This mutation, located 216 bp downstream from the stop codon, was confirmed by sequencing of the complementary strand which showed the expected C in BN.*Lx* and T in SHR (data not presented).

DISCUSSION

Stress is a major experimental and clinical determinant of blood pressure [34]. This study demonstrates clearly that the response to stress depends not only on its severity but largely on the genetic make-up of individuals. Turn-on of *hsp* transcription is considered to be a marker of the severity of stress, with *hstf* acting as a stress sensor [35]. Our results reveal that accumulation of the mRNA levels of all *hsp27*, *70*, *84*, *90* and *110* families exerts up to a 12-fold gradient in the RIS panel with little intra-strain variability, showing a high heritability component (34-77% heritability) in the response to standardized immobilization stress.

The gradient of the response is independent of the degree of difference between parental strains, pointing to the polygenic character of the response (Fig. 1). The advantage of the RIS panel is the feasibility of QTL localization independently of trait value differences between the progenitor strains in this permanent inbred replica of F2. For instance, the largest gradient in *hsp70* mRNA accumulation was observed in the adrenal with no difference between *BN.Lx* and *SHR* (Fig. 1a).

Noticeably, none of the stress QTL except one (D12 marker for kidney *hsp105*, see Table 1) in the present study pointed to localization of the *hsps* themselves although they are known to regulate their own transcription. We have demonstrated previously that, in cultured vascular smooth muscle cells, increased mRNA accumulation of *hsp70* was due to its higher transcription rate and higher levels of activated *hstf* [21]. The current study demonstrates the presence of genetic components regulating the mRNA accumulation of several *hsp* genes in the heart, adrenal and kidney *in vivo*. A suggestive QTL common to all *hsps* in the three organs points to the *D7Cebrp187s3/D7Cebr77s1* locus (Table 1). When the values of the three organs are combined, this QTL reaches the

stringent level of significance for *hsp27* [31]. By synteny, we have identified *hstf1* as a positional candidate. The RIS panel then allowed us to localize the *hstf1* on chromosome 7 at the locus unveiled for mRNA accumulation of *hsp*.

Partial sequencing of BN.*Lx* and SHR *hstf1* revealed a single base mutation in the 3'-UTR of the gene. Even though functional analyses of the mutation with reporter gene remain to be performed, this region appears to be important for the metabolic fate of mRNA and is subject to increasingly recognized *trans*-regulation [36, 37].

Immobilization stress also results in increased body temperature. We have previously determined three QTL for the body temperature response on chromosomes 12, 10 and Y. Two of them constitute QTL suggestive of *hsp27*, *70*, *86* and *105* expression. Part of the *hsp* response could therefore be modulated by temperature through QTL common to both pathways. Clearly, the stress response is polygenic, and *hsp* accumulation is only part of it.

In conclusion, the present study demonstrated that the variance in mRNA accumulation of *hsp27*, *70*, *86* and *105* in the heart, kidney and adrenal is, in part, genetically determined. The differential *hsp* mRNA expression in response to immobilization stress has been mapped to loci on chromosomes 4 and 7. Finally, we propose *hstf1* as a candidate gene of environmental response susceptibility.

REFERENCES

1. Lindquist S, Craig EA: The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988, 22:631-677.
2. Schlesinger MJ: Heat shock proteins. *J Biol Chem* 1990, 265:12111-12114.
3. Craig EA, Weissman JS, Horwich AL: Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 1994, 78:365-372.
4. Hamet P, Malo D, Hashimoto T, Tremblay J: Heat stress genes in hypertension. *J Hypertens* 1990, 8 (Suppl. 7):S47-S52.
5. Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM, Landry J: Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. *J Biol Chem* 1993, 268:3420-3429.
6. Champagne MJ, Dumas P, Orlov SN, Bennett MR, Hamet P, Tremblay J: Protection against necrosis but not apoptosis by HSPs in vascular smooth muscle cells: evidence for distinct modes of cell death. *Hypertension* 1999, 33:906-913.
7. Carper SW, Duffy JJ, Gerner EW: Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. *Cancer Res* 1987, 47:5249-5255.
8. Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG, Jr.: Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 1993, 87:963-971.

9. Schlesinger MJ: The cellular response to stress. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989, 1:87-88.
10. Craig EA, Gross CA: Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci* 1991, 16:135-140.
11. Schlesinger MJ, Ryan C: An ATP- and hsc70-dependent oligomerization of nascent heat-shock factor (HSF) polypeptide suggests that HSF itself could be a "sensor" for the cellular stress response. *Protein Sci* 1993, 2(8):1356-1360.
12. Larson JS, Schuetz TJ, Kingston RE: In vitro activation of purified human heat shock factor by heat. *Biochemistry* 1995, 34:1902-1911.
13. Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, Li DG, Putney DJ, Holbrook NJ: Vascular heat shock protein expression in response to stress - Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. *J Clin Invest* 1993, 91:465-473.
14. Blake MJ, Buckley DJ, Buckley AR: Dopaminergic regulation of heat shock protein-70 expression in adrenal gland and aorta. *Endocrinology* 1993, 132(3):1063-1070.
15. Blake MJ, Udelsman R, Feulner GJ, Norton DD, Holbrook NJ: Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response. *Proc Natl Acad Sci* 1991, 88:9873-9877.
16. Widgren BR, Wikstrand J, Berglund G, Andersson OK: Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. *Hypertension* 1992, 20:606-611.

17. Wood DL, Sheps SG, Elveback LR, Schirger A: Cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension* 1984, 6:301-306.
18. Menkes MS, Matthews KA, Krants DS, Lundberg U, Mead LA, Qaqish B, Liang KY, Thomas CB, Pearson TA: Cardiovascular reactivity to the cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension* 1989, 14:524-530.
19. Hamet P, Pausova Z, Adarichev S, Adaricheva K, Tremblay J: Hypertension: Genes and environment. *J Hypertens* 1998, 16:397-418.
20. Hamet P, Malo D, Tremblay J: Increased transcription of a major stress gene in spontaneously hypertensive mice. *Hypertension* 1990, 15:904-908.
21. Hashimoto T, Mosser RD, Tremblay J, Hamet P: Increased accumulation of *hsp70* mRNA due to enhanced activation of heat shock transcription factor in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1991, 9 (Suppl. 6):S170-S171
22. Kunes J, Poirier M, Tremblay J, Hamet P: Expression of *hsp70* gene in lymphocytes from normotensive and hypertensive humans. *Acta Physiol Scand* 1992, 146:307-311.
23. Hamet P, Kong D, Pravenec M, Kunes J, Kren V, Klir P, Sun YL, Tremblay J: Restriction fragment length polymorphism of *hsp70* gene, localized in the RT1 complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992, 19:611-614.
24. Hamet P, Kaiser MA, Sun YL, Page V, Vincent M, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Tremblay J, Samani NJ: HSP27 locus cosegregates with left

- ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension* 1996, 28:1112-1117.
25. Pravenec M, Klir P, Kren V, Zicha J, Kunes J: An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J Hypertens* 1989, 7:217-222.
 26. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156-159.
 27. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szpirer C, Szpirer J, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J Clin Invest* 1995, 96:1973-1978.
 28. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szpirer C, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: A genetic linkage map of the rat derived from recombinant inbred strains. *Mamm Genome* 1996, 7:117-127.
 29. Manly KF, Elliott RW: RI Manager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. *Mamm Genome* 1991, 1:123-126.
 30. Manly KF: A Macintosh program for storage and analysis of experimental mapping data. *Mamm Genome* 1993, 4:303-313.

31. Neumann PE: Inference in linkage analysis of multifactorial traits using recombinant inbred strains of mice. *Behav Genet* 1992, 22 :665-676.
32. Dumas P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 2000, 35:568-573.
33. Koyama K, Sudo K, Nakamura Y: Isolation of 115 human chromosome 8-specific expressed-sequence tags by exon amplification. *Genomics* 1995, 26:245-253.
34. Parati G, Pomidossi G, Albini F, Malaspina D, Mancina G: Relationship of 24 hour blood pressure mean and variability to severity of end organ damage in hypertension. *J Hypertens* 1987, 5:93-98.
35. Zhong M, Orosz A, Wu C: Direct sensing of heat and oxydation by Drosophila heat shock transcription factor. *Mol Cell* 1998, 2:101-108.
36. Fraser CM, Lee NH: Regulation of muscarinic receptor expression by changes in mRNA stability. *Life Sci* 1995, 56:899-906.
37. Zhou X, Prado GN, Chai M, Yang X, Taylor L, Polgar P: Posttranscriptional destabilization of the bradykinin B1 receptor messenger RNA: cloning and functional characterization of the 3'-untranslated region. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999, 1:29-35.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-14654 and MT-14374) and the Czech Republic (GA CR K015/98) within the framework of a collaborative agreement between CHUM of the University of Montreal and the 1st Medical Faculty of Charles University, Prague. The authors thank Mr. Marc Dumont for providing statistical assistance and Mr. Ovid Da Silva for his expert editorial revision of this manuscript.

TABLE 1**Total genome scan of *hsp* expression in the adrenal, heart and kidney of RIS.**

Correlations equal to or higher than 0.3 are displayed. Suggestive ($p < 0.001$) or significant linkages ($p < 0.0003$) appear in bold type. Abbreviations: *D7*, *D7Cebrp187s3/D7Cebr77s1* marker; *D9*, *D9Cebr16C27s2* marker; *D4*, *D4Mit19* marker; *D12*, *D12Cebrp97s9/s4* marker; *Myh3*, Myosin heavy chain (embryonic) gene marker (chromosome 10); *Y Chr*, Y chromosome.

* To increase statistical power, correlations from results on the three organs were combined for analysis of individual *hsp* at the *D7* marker.

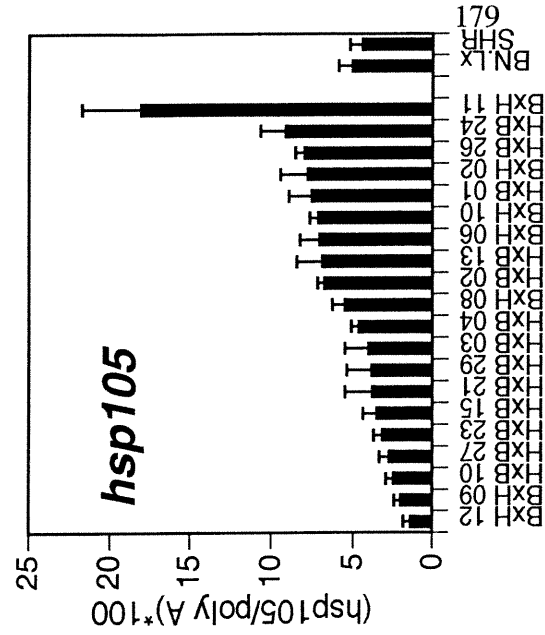
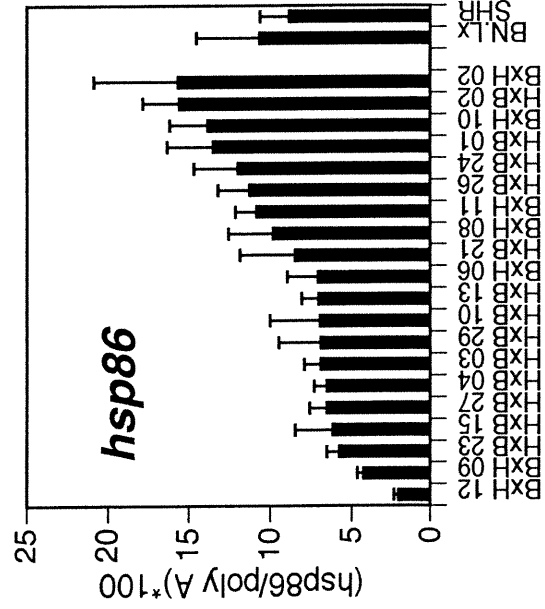
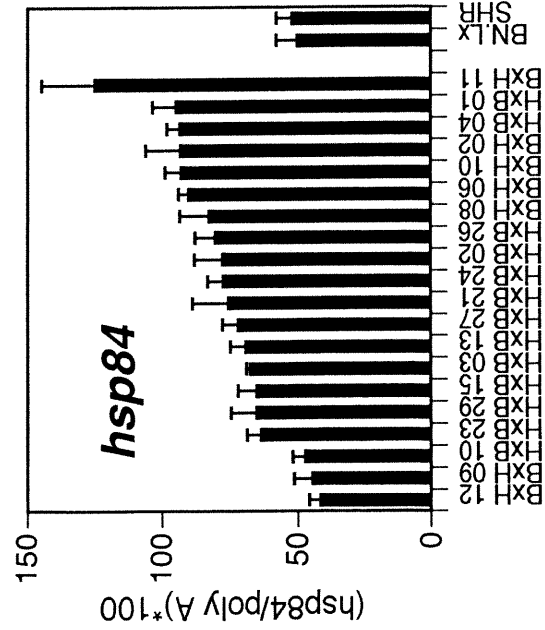
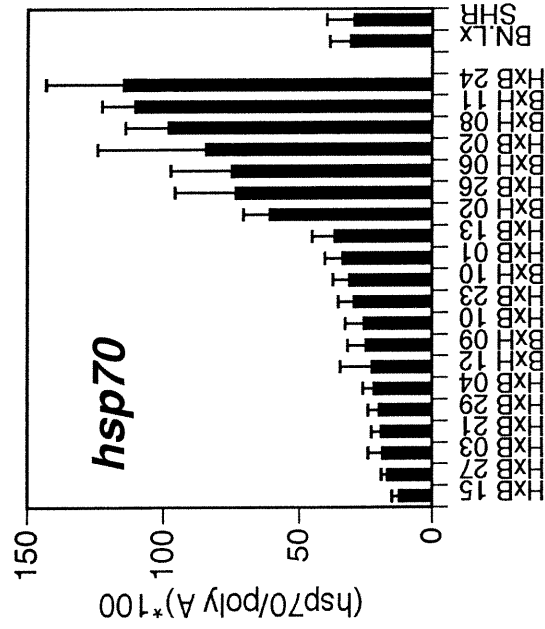
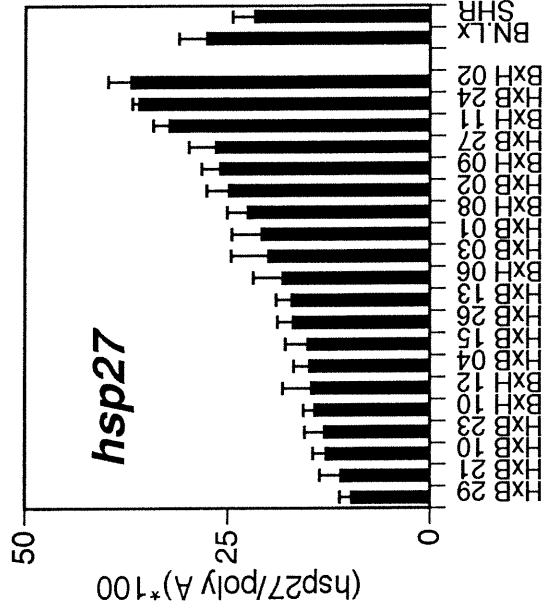
Marker	Adrenal		Heart		Kidney		D7 marker, Pooled organs*		
	r	p	r	p	r	p	r	p	
<i>hsp27</i>	D7	0.47	0.04	0.65	0.002	0.40	0.08	0.46	0.0002
	<i>Myh3</i>	--	--	0.50	0.02	--	--	(LOD score 3.0)	
<i>hsp70</i>	D7	0.63	0.003	0.51	0.02	0.48	0.03	0.42	0.0008
	<i>Y Chr</i>	--	--	0.35	0.13	0.60	0.005	(LOD score 2.4)	
	<i>Myh3</i>	--	--	--	--	0.44	0.05		
<i>hsp84</i>	D7	0.42	0.07	--	--	0.35	0.14	0.38	0.01
	D9	0.57	0.009	--	--	--	--	(Adrenal+Kidney)	
	D4	--	--	0.71	0.0002	--	--		
				(LOD score 3.1)					
<i>hsp86</i>	D7	0.58	0.007	0.44	0.06	0.53	0.02	0.35	0.007
	<i>Y Chr</i>	--	--	--	--	0.63	0.003		
	<i>Myh3</i>	--	--	0.30	0.20	0.55	0.02		
<i>hsp105</i>	D7	0.53	0.02	0.42	0.06	0.4	0.08	0.36	0.005
	<i>Y Chr</i>	--	--	--	--	0.49	0.03		
	<i>Myh3</i>	--	--	0.55	0.01	--	--		
	D12	--	--	--	--	0.52	0.02		

FIGURE 1

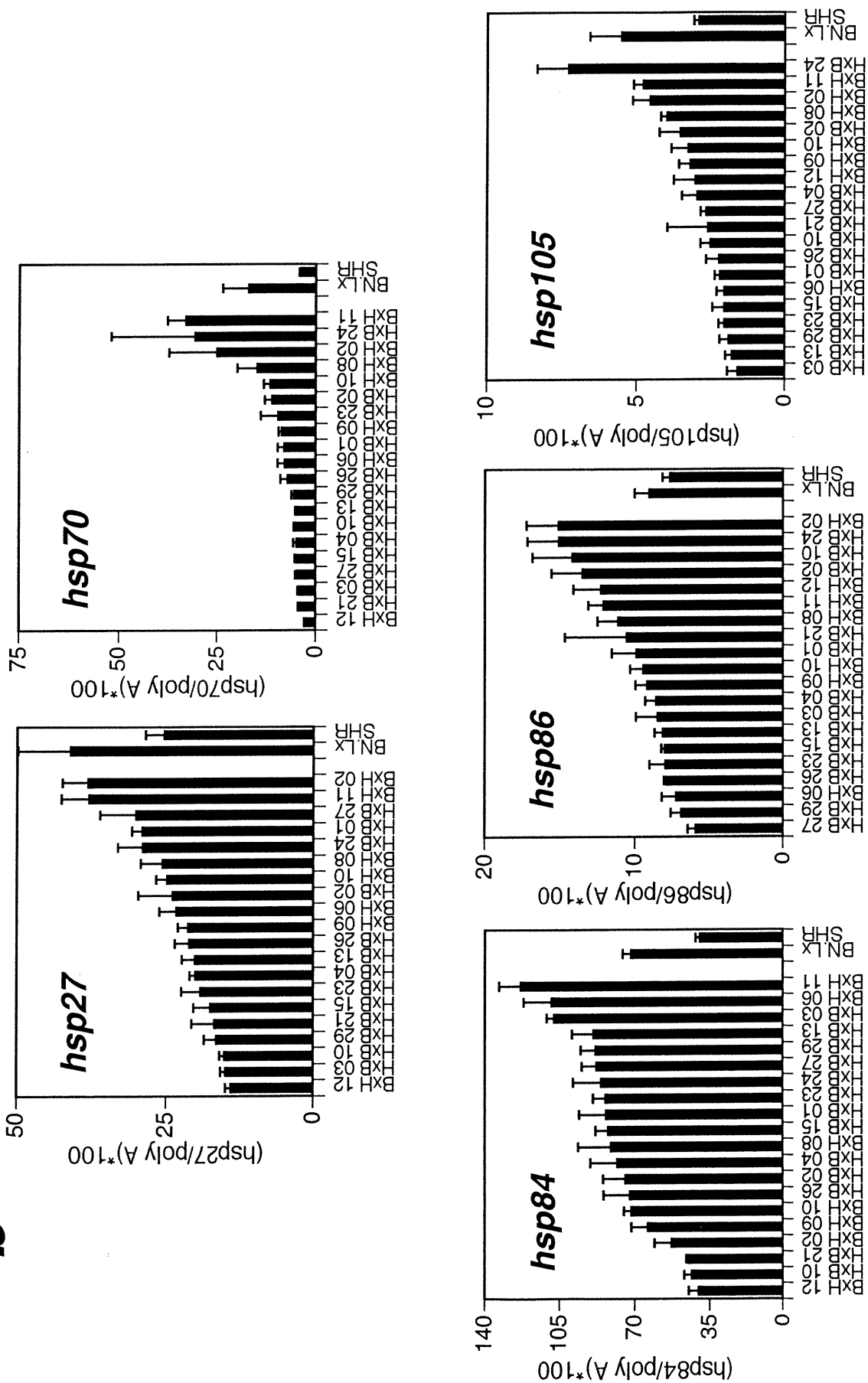
Strain distribution pattern of *hsp* expression in the RIS adrenal (a), heart (b), and kidney (c).

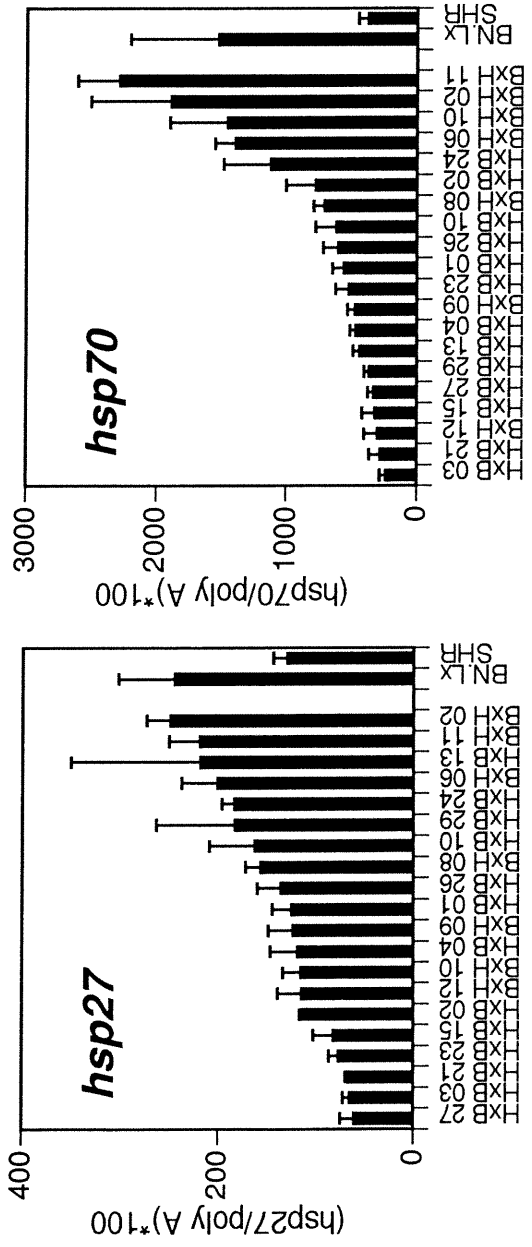
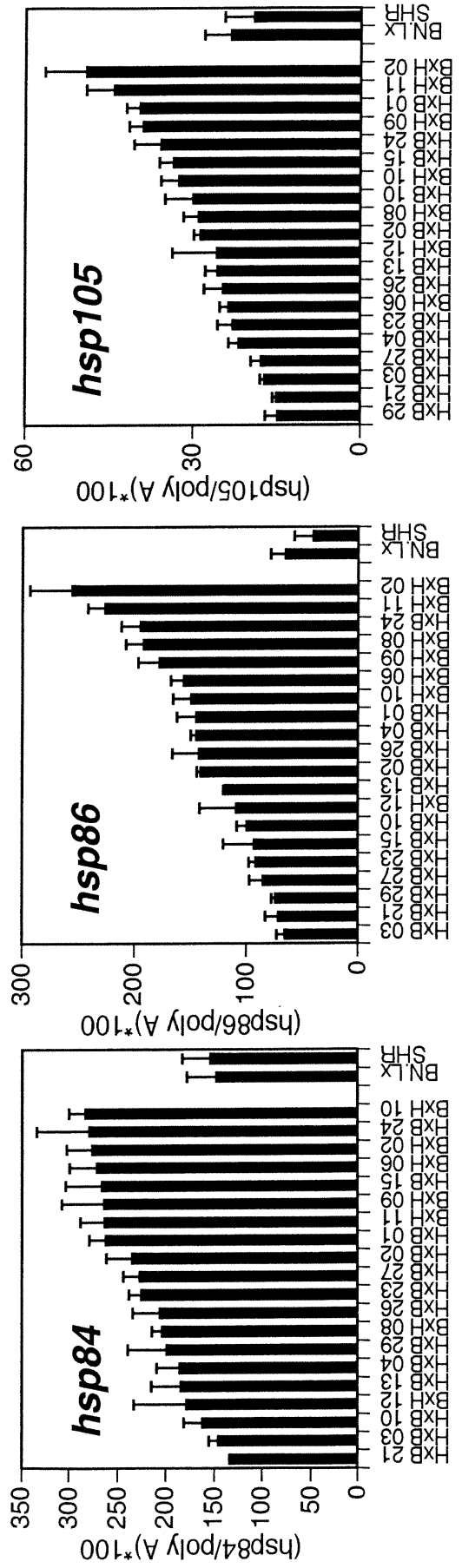
H×B, Strain originating from female SHR × male BN.*Lx* progenitors. B×H, Strain originating from female BN.*Lx* × male SHR progenitors. Each bar represents a strain. The results are the mean±SEM of four rats per strain.

a



b





C

FIGURE 2**Partial linkage map of rat chromosome 4.**

Chromosome designation (D4) is omitted. Information about the displayed markers can be obtained from the Ratmap web site (see Methods). The significance of correlation (*P* -value) is given for each marker. cM, centimorgan.

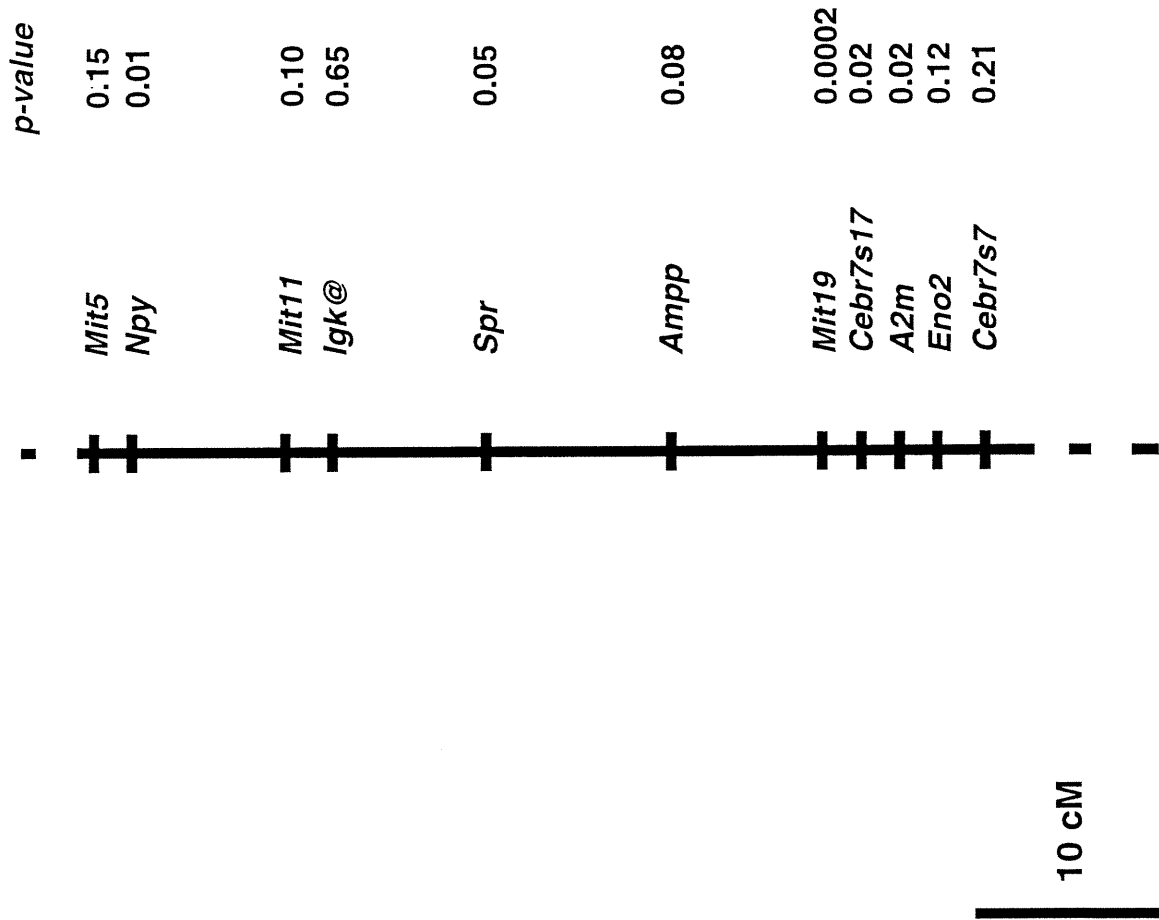


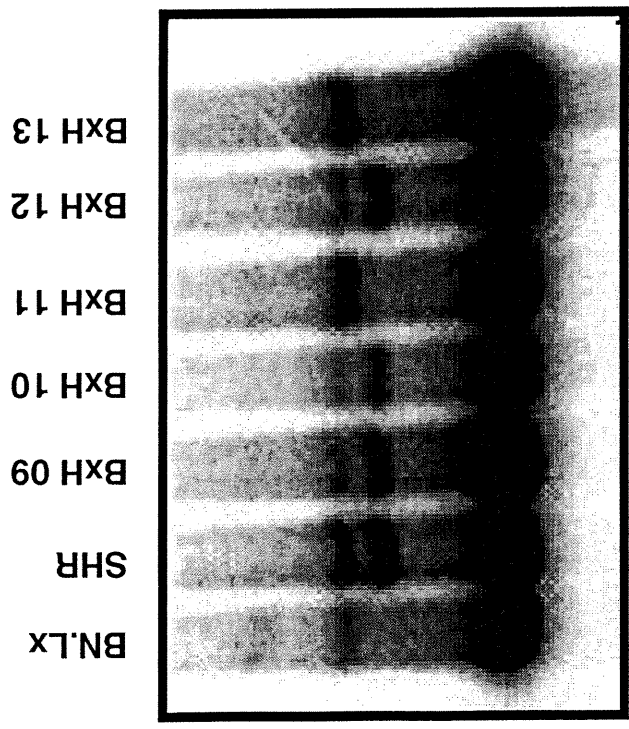
FIGURE 3***a.* Autoradiograms of SSCP obtained after PCR with the use of HSF1-1419 and HSF1-1624.**

The strains are identified at the top of the gel. B×H, Strain originating from female BN.*Lx* × male SHR progenitors. PCR and SSCP conditions are described in Methods.

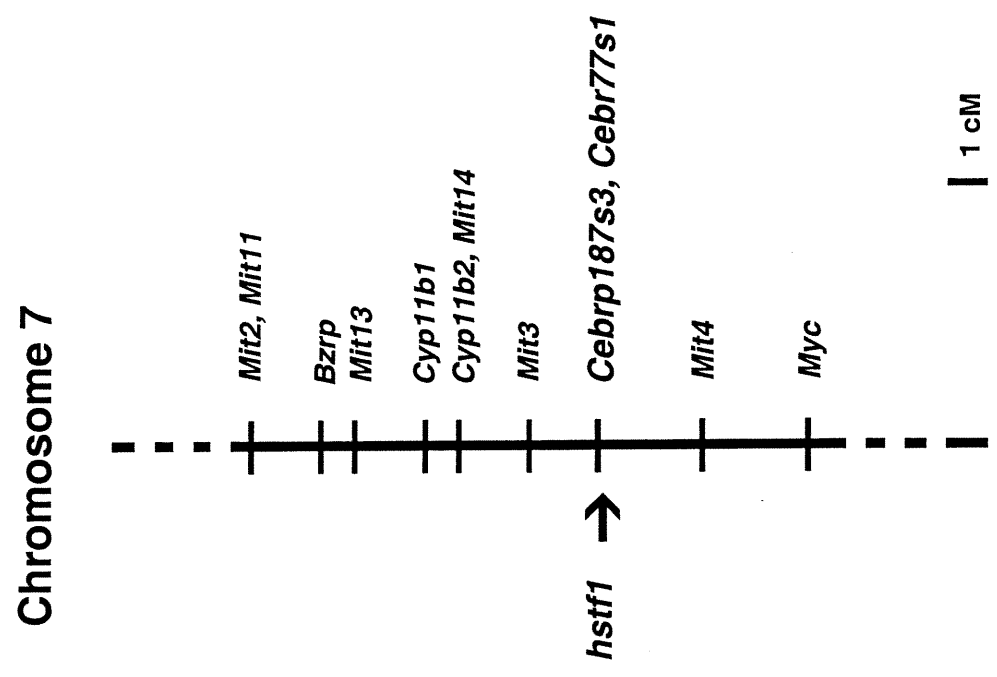
***b.* Chromosomal localization of *hstf1* on rat chromosome 7.**

Chromosome designation (D7) is omitted. Information about the displayed markers can be obtained from the Ratmap web site (see Methods). The significance of correlation (*P-value*) is given for each marker. cM, centimorgan.

a



b



Chapitre 14

ÉTUDES LONGITUDINALES CHEZ LES LIGNÉES RECOMBINANTES CONSANGUINES, UN OUTIL POUR LA RECHERCHE DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DES ATTEINTES AUX ORGANES CIBLES DE L'HYPERTENSION

*Newborn and adult recombinant inbred strains: a tool for the
search of genetic determinants of target organ damage in
hypertension*

Pavel Hamet, Zdenka Pausová, Pierre Dumas, Yu Lin Sun, Johanne Tremblay, Michal
Pravenec, Jaroslav Kunes, Drahomíra Krenová and Vladimír Kren

Manuscrit publié dans la revue:

Kidney Int 1998;53:1488-1492

CONTRIBUTION AU TRAVAIL

Conformément aux règlements de la FES, je dois préciser ma contribution à ce travail, n'étant pas le premier auteur du manuscrit. Les phénotypes ont été obtenus en partie par le Dr J. Kunes, chercheur invité dans le laboratoire du Dr P. Hamet. Les analyses génétiques qui constituaient la partie la plus importante du travail ont été faites par le Dr Z. Pausova (fellow post-doctoral du Dr P. Hamet) et moi-même sous la co-direction des Drs. J. Tremblay et P. Hamet. J'ai importé les données de génotypage des RIS produites par les Drs. M. Pravenec, V. Kren et D. Krenova (disponibles sur le web, <http://ratmap.gen.gu.se>), fabriqué la carte génétique et procédé à l'analyse des QTLs grâce au programme MapManager (Manly et Elliott 1991).

ABSTRACT

It has been proposed that one of the primary events in the development of essential hypertension is a growth-related process initiated as early as during the fetal development. Differences in kidney size have been observed between most rat models of hypertension and their respective controls. In this study, we analyzed the relative kidney size (kidney weight/body wt) in a set of rat recombinant inbred strains (RIS) ($N = 27$) and their progenitors, the spontaneously hypertensive rat strain (SHR/Ola) and Brown Norway congenic strain (BN.lx), at two different ages, at birth and at 15 weeks. In the progenitors, the relative kidney weight was higher in the hypertensive than in the normotensive strain of both the newborn ($P < 0.001$) and adult ($P < 0.001$) animals. In the RIS, a significant correlation was found between the newborn and adult relative kidney weight ($r = 0.49$, $P = 0.01$) indicating that the two phenotypes share some of their genetic determinants. A total genome search of newborn and adult relative kidney weight was performed with a total of 453 genetic markers. These analyses revealed several suggestive quantitative trait loci (QTL) some of which were, indeed, significant for both newborn and adult relative kidney weight (such as, *D3Mit9* on rat chromosome 3; $r = -0.50$, $P < 0.01$; $r = -0.47$, $P < 0.01$; respectively). Others, such as the locus on rat chromosome 1 (*Rt6*; $r = -0.43$, $P < 0.05$), were significant only for the adult relative kidney size. This QTL was found in close proximity of a region previously related to susceptibility to hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat and, similarly to that study, its effect was found to be independent of blood pressure. Furthermore, a growth pattern of the kidneys after birth, evaluated as the difference between the newborn and adult relative kidney weight, was also subjected to the total genome scan. Several suggestive QTL were identified. One of the most significant loci was found at the *D1a* marker on rat chromosome 17 ($r = -0.51$, $P < 0.01$), which was previously related to the determination of adult heart weight in the RIS. In conclusion, the current study

demonstrates the usefulness of RIS in studies of hypertension-related phenotypes, some of which are abnormal before the development of high blood pressure. To better understand their role in the pathogenesis of hypertension, studies at different ages are needed, which are uniquely feasible in RIS.

INTRODUCTION

The pathogenesis of essential hypertension has been proposed to have 2 components: a primary process, which initially raises blood pressure (BP), and an amplifying process, which progressively magnifies this difference throughout life [1]. Traditionally, distinguishing primary (cause) from secondary (consequence) events has been a difficult task, a "which came first, the egg or the chicken" question. Although several approaches to the identification of primary events exist [2,3], the most straightforward is the genetic one.

To study the genetic basis of complex traits such as hypertension, co-segregation of BP and other hypertension-related phenotypes is tested with genotypes at individual loci. At present, these analyses are most commonly carried out in F_2 generation of a cross between normotensive and hypertensive inbred strains [4]. It has been demonstrated that several hypertension-related phenotypes are abnormal before the development of high blood pressure. Therefore, to better understand the involvement of these phenotypes in the pathogenesis of hypertension, it is important to study them at different time-points during development and progression of the disease. Since the collection of some phenotypes, such as organ size, usually requires the experimental animal to be sacrificed, they cannot be analyzed at different ages in the F_2 generation. This is because the F_2 generation represents a set of genetically unique animals that cannot be reproduced, and if sacrificed at a certain age, these animals are lost for analysis at a later age. In contrast, in recombinant inbred strains (RIS), which are an inbred replica of F_2 hybrids and as such are genetically reproducible, phenotypes can be collected at different ages and then related to their stable genotypes. At present, only a single set of rat RIS exists. This set has been derived from a reciprocal cross between a spontaneously hypertensive rat (SHR) strain and Brown Norway (BN) congenic strain

[5]. Since the current study was aimed at elucidating the genetic basis of kidney growth and its possible relationship to the pathogenesis of hypertension at two different ages, at birth and at 15 weeks, we employed this set of RIS.

METHODS

The rat RIS used in this study consisted of 2 reciprocal crosses developed in the Biology Department of the Faculty of Medicine, Charles University (BN.lx × SHR/Ola) and the Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic (SHR/Ola × BN.lx), respectively. The normotensive progenitor was a congenic strain derived from BN that carries a segment of chromosome 8 from the polydactylous PD/Cub strain [6]. The hypertensive progenitor, SHR/Ola, was originally obtained from OLAC, England.

Neonatal body and kidney weights were determined in animals sacrificed within 18 hours after delivery. For each RIS ($N = 27$), an average value was obtained from at least three litters each consisting of six to nine newborns. To avoid a possible confounding effect of litter size on newborn phenotypes, extremely small (< 6) and large (> 9) litters were excluded [7]. Adult body weight, kidney weight, and blood pressure were determined at the age of 15 weeks. Blood pressure was measured by direct puncture of the carotid artery as described previously [5].

A total genome search for quantitative trait loci (QTL) of newborn and adult kidney weight was carried out with 453 markers [8,9]. Strain distribution patterns of these markers were obtained from the Ratmap World Wide Web site (<http://ratmap.gen.gu.se>). QTL were identified by means of Pearson's correlation analysis. The possible confounding effects of significant covariates (for example, systolic blood pressure) on analyzed phenotypes were evaluated by multiple regression analysis.

RESULTS

In progenitors of the RIS, neonatal relative kidney weight was higher in the hypertensive (SHR/Ola) than in the normotensive (BN.lx) strain (Table 1). This was also true for adult relative kidney weight. In the RIS, average newborn kidney weight values were distributed around BN.lx values but did not reach SHR/Ola values (Fig. 1A). In contrast, the distribution of adult kidney weight values was shifted towards values of the SHR/Ola progenitor (Fig. 1B). This suggests that some factors involved in the determination of newborn and adult kidney weight may be distinct. In addition, there was no significant difference in newborn and adult kidney weight between reciprocal crosses (SHR/Ola \times BN.lx, 8.68 ± 0.87 , BN.lx \times SHR/Ola, 8.31 ± 1.08 ; $P > 0.3$), which indicates that the Y chromosome does not play an important role in the determination of these phenotypes.

To establish whether neonatal kidney hyperplasia is related to adult kidney weight and adult BP, we estimated correlation coefficients between these phenotypes in the RIS. Our calculations showed that newborn kidney weight correlates with adult kidney weight (Fig. 2), but not with adult BP, and that adult BP is negatively associated with the size of the adult kidneys (Fig. 3). These data suggest that newborn and adult kidney weights share some genetic determinants (24%) and that systolic blood pressure (SBP) appears to have a negative impact on adult kidney size, which explains its 17% variance.

To identify the genetic determinants of newborn and adult kidney weight, a total genome search was performed. For both phenotypes, although no QTL were identified that would satisfy stringent statistical criteria of the total genome search allowing a claim to linkage were identified [10], several suggestive QTL were demonstrated (Table 2). Some loci appeared to have an effect on both newborn and adult kidney weight (such as,

D3Mit9), whereas other loci were significant for only either newborn (for example, *B*-brown) or adult kidney weight (such as, *Rt6* and *D8Cebr46s6*). The *Rt6* locus on rat chromosome 1 was associated with a negative impact of the SHR allele on adult kidney weight and a positive impact on SBP. Since in the RIS, there was a negative relationship between adult BP and adult kidney size (Fig. 3), this locus, in fact, could have been one of the genetic determinants of that relationship. However, multiple regression analysis suggested that this was not the case since the effect of the locus on adult kidney weight was independent of SBP ($P > 0.7$). Interestingly, the *Rt6* marker lies in close proximity to the *Sa* gene (Fig. 4), which was originally identified as being expressed at a higher level in SHR kidneys when compared to Wistar-Kyoto (WKY) rats [11] and which has been demonstrated to be a genetic determinant of BP in several rat crosses [12-15]. Recently, QTL of susceptibility to hypertensive renal disease were identified within neighboring regions of the *Sa* locus and, similarly to our results, the effects of these loci were independent of BP [13].

Furthermore, a decrease of relative kidney weight in adult rats as compared to newborns was observed, which indicates that growth of the kidneys slows after birth relative to the whole body. This growth pattern differed between the progenitors as well as among individual RIS. In the progenitors, the difference between newborn and adult relative kidney weight was greater in SHR/Ola than in BN.lx (Table 1). In the RIS, the values in half of the group were close to those of the BN.lx progenitor, and several animals had values similar to those of SHR/Ola (Fig. 5). When this difference between newborn and adult kidney weight was subjected as a phenotype to total genome scan, several suggestive loci were identified (Table 3). Interestingly, one of the most significant effects was observed at the *D1a* locus, which has been shown previously to be a significant determinant of heart weight in the RIS [8].

DISCUSSION

It has been suggested that one of the primary defects in the pathogenesis of essential hypertension is a growth-promoting process originating during childhood or, perhaps, as early as fetal development [16]. Based on epidemiological studies, increased SBP and diastolic blood pressure have been related to lower birth weight [16-21]. Furthermore, it has been suggested that impaired fetal growth may have effects on BP regulation. A reduced number of nephrons, frequently found in infants with low birth weight, may compromise the ability of the kidneys to excrete sodium, and this may become particularly significant during salt-overload and/or in the presence of a genetic defect of sodium transport [22].

Previous studies from our [23,24] and other laboratories [25,26] have demonstrated, over a decade ago, cardiac and kidney enlargement in newborn SHR when compared to WKY. Increased DNA synthesis was noted in both organs [23], suggesting the existence of cellular hyperplasia in SHR organs. A similar observation was reported for newborn organs from SHRSP and GH (New Zealand) hypertensive strains. On the other hand, in the Lyon hypertensive model, only cardiac and not kidney enlargement was found and, in addition, in the Milan hypertensive strain, both the heart and the kidneys were significantly smaller when compared to their respective controls. Thus, it is evident that growth "programming" of these 2 very important cardiovascular organs is different, indicating heterogeneity of their involvement in the pathogenesis of hypertension.

An increasing body of evidence supports the critical role of the kidneys in the pathogenesis of hypertension in SHR [27] and humans [28,29]. Thus, it has been shown that BP can be transferred together with transplantation of the SHR kidney [27,30]

and that parameters of renal hemodynamics co-segregate with BP in the F₂ generation [31]. Furthermore, it has been demonstrated that in F₂ hybrids derived from a cross of SHR and WKY strains, the reduced diameter of the renal afferent arteriole at the age of 7 weeks is associated with increased BP at age 23 weeks [32]. This suggests that some phenotypic abnormalities related to the development of hypertension may precede the actual BP changes. In progenitors of the RIS, both newborn and adult relative kidney weight as well as adult BP were higher in SHR than in BN. This indicates that the higher kidney weight in newborn rats may predict higher kidney weight and higher BP in adult rats. In the RIS, a significant positive correlation between newborn and adult kidney weight was observed (Fig. 2), suggesting that large kidneys in newborns predict large kidneys in adults and that, therefore, the two phenotypes may share some genetic determinants. In fact, the total genome search we conducted showed that some of the suggestive QTL are significant for both newborn and adult kidney weight. The use of newborn and adult animals with identical genetic characteristics allowed us to study genes involved in organ size in the newborn (prehypertensive) stage. Furthermore, the use of newborn RIS let us uncover that the decreased relative kidney/total body ratio, which occurs in the transition from the newborn to the adult stage, was twice as big in SHR phenotypes. This developmental change, modulated or not by BP, appears to be controlled by a few candidate loci (Table 3).

In conclusion, we propose that RIS are a unique tool to evaluate neonatal phenotypes and the impact on final outcome, such as hypertension and related target organ damage. This study allowed the distinction between primary hyperplasia and secondarily induced proliferation and permit the determination of genetic loci associated with these events. The identification of positional candidate genes will be one of the paths to uncover loci participating in the pathogenesis of complex traits, such as hypertension and its target organ damage.

REFERENCES

1. FOLKOW B: Cardiovascular structural adaptation: its role in the initiation and maintenance of primary hypertension. *Clin Sci* 55:3S-22S, 1978
2. KORNER PI: Causal and homeostatic factors in hypertension. *Clin Sci* 63:5S-26S, 1982
3. HAMET P, TREMBLAY J, PANG SC, WALTER SV, WEN YI: Primary versus secondary events in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 63:380-386, 1985
4. LANDER ES, SCHORK NJ: Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-2048, 1994
5. PRAVENEK M, KLIR P, KREN V, ZICHA J, KUNES J: An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J Hypertens* 7:217-222, 1989
6. KREN V: Genetics of the polydactyly luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol (Med) (Praha)* 58:1-104, 1975
7. DOBESOVA Z, ZICHA J, KUNES J: Newborn organ weight and spontaneous hypertension: recombinant inbred strain study. *Clin Exp Hypertens* 19:403-415, 1997
8. PRAVENEK M, GAUGUIER D, SCHOTT JJ, BUARD J, KREN V, BILA V, SZIRER C, SZIRER J, WANG JM, HUANG H, ST-LEZIN E, SPENCE MA, FLODMAN P, PRINTZ M, LATHROP GM, VERGNAUD G, KURTZ TW: Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and

- cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J Clin Invest* 96:1973-1978, 1995
9. JACOB HJ, BROWN DM, BUNKER RK, DALY MJ, DZAU VJ, GOODMAN A, KOIKE G, KREN V, KURTZ T, LERNMARK A, LEVAN G, MAO YP, PETTERSSON A, PRAVENEC M, SIMON JS, SZPIRER C, SZPIRER J, TROLLIET MR, WINER ES, LANDER ES: A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet* 9:63-69, 1995
 10. BURTON K: Study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62:315-323, 1956
 11. IWAI N, INAGAMI T: Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension* 17:161-169, 1991
 12. GU L, DENE H, DENG AY, HOEBEE B, BIHOREAU MT, JAMES M, RAPP JP: Genetic mapping of two blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 1. *J Clin Invest* 97:777-788, 1996
 13. BROWN DM, PROVOOST AP, DALY MJ, LANDER ES, JACOB HJ: Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nature Genetics* 12:44-51, 1996
 14. KREUTZ R, STRUK B, RUBATTU S, HUBNER N, SZPIRER J, SZPIRER C, GANTEN D, LINDPAINNER K: Role of the α -, β -, and γ -subunits of epithelial sodium channel in a model of polygenic hypertension. *Hypertension* 29:131-136, 1997

15. KOVACS P, VOIGT B, KLOTING I: Novel quantitative trait loci for blood pressure and related traits on rat chromosomes 1, 10 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 235:343-348, 1997
16. BARKER DJP, OSMOND C, GOLDING J, KUH D, WADSWORTH MEJ: Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Br Med J* 298:564-567, 1989
17. CHERTOW GM, BRENNER BM: Low birth weight as a risk factor for juvenile and adult hypertension, in *Hypertension-Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, edited by LARAGH JH, BRENNER BM, New York, Raven Press, 1995, p. 89-96
18. CATER J, GILL M: The follow-up study: medical aspects. in *Low birthweight, a medical, psychological and social study*. edited by ILLSLEY R, MITCHELL RG, Chichester, John Wiley, 1984, p. 191-205
19. WHINCUP PH, COOK DG, SHAPER AG: Early influences on blood pressure: a study of children aged 5-7 years. *Br Med J* 299:587-591, 1989
20. SEIDMAN DS, LAOR A, GALE R, STEVENSON DK, MASHIACH S, DANON YL: Birth weight, current body weight, and blood pressure in late adolescence. *Br Med J* 302:1235-1237, 1991
21. GENNSER G, RYMARK P, ISBERG PE: Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br Med J* 296:1498-1499, 1988
22. BRENNER BM, CHERTOW GM: Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kidney Dis* 23:171-175, 1994

23. PANG SC, LONG C, POIRIER M, TREMBLAY J, KUNES J, VINCENT M, SASSARD J, DUZZI L, BIANCHI G, LEDINGHAM J, PHELAN EL, SIMPSON FO, IKEDA K, YAMORI Y, HAMET P: Cardiac and renal hyperplasia in newborn genetically hypertensive rats. *J Hypertens* 4 (Suppl. 3):S119-S122, 1986
24. WALTER SV, HAMET P: Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 8:520-525, 1986
25. CUTILLETTA AF, BENJAMIN M, CULPEPPER WS, OPARIL S: Myocardial hypertrophy and ventricular performance in the absence of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 10:689-703, 1978
26. GRAY SD: Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biol Neonate* 45:25-32, 1984
27. RETTIG R, FOBERTH C, KOFF D, STRAUSS H, UNGER T: Role of the kidney in the pathogenesis of primary hypertension. *Clin Exp Hypertens* A12:957-1002, 1990
28. DE WARDENER HE: The primary role of kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension, part I. *Clin Sci* 79:193-200, 1990
29. DE WARDENER HE: The primary role of kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension, part II. *Clin Sci* 79:289-297, 1990
30. UBER A, RETTIG R: Pathogenesis of primary hypertension - Lessons from renal transplantation studies. *Kidney Int* 49 (Suppl. 55):s42-s45, 1996

31. HARRAP SB, DOYLE AI: Genetic co-segregation of renal haemodynamics and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Sci* 74:63-69, 1988
32. NORRELUND H, CHRISTENSEN KL, SAMANI NJ, KIMBER P, MULVANY MJ, KORSGAARD N: Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension* 24:301-308, 1994

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10803, MT-12574), Bayer AG and Pfizer Pharmaceutical Company. The secretarial help of Josée Bédard-Baker and the editorial assistance of Ovid Da Silva are greatly appreciated.

TABLE 1**Relative kidney weight and blood pressure in newborn and adult progenitor strains**

	NEWBORN		ADULT	
	BN.lx	SHR	BN.lx	SHR
KW/BW <i>mg/100g of body weight</i>	742 ± 18	1128 ± 17 ^a	493 ± 6	636 ± 6 ^a
SBP <i>mm Hg</i>	Not measured		132 ± 3	215 ± 4 ^a
MAP <i>mm Hg</i>	Not measured		113 ± 3	182 ± 4 ^a
DBP <i>mm Hg</i>	Not measured		93 ± 3	149 ± 3 ^a

Data shown as means ± SEM. Abbreviations are: BN.lx, normotensive progenitor strains; SHR, spontaneously hypertensive progenitor strain; KW/BW, relative kidney weight; SBP, systolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; DBP, diastolic blood pressure. ^a $P < 0.001$ vs BN.lx.

TABLE 2

Total genome search: suggestive quantitative trait loci (QTL) of newborn and adult relative kidney weight (KW/BW)

Chromosome	Marker	<i>N</i>	Newborn KW/BW <i>r</i>	Adult KW/BW <i>r</i>
1	<i>Rt6</i>	25	-0.23	-0.43 ^a
3	<i>D3Mit9</i>	27	-0.50 ^b	-0.47 ^b
5	<i>D5Cebr312s4</i>	27	+0.20	+0.49 ^b
5	<i>B-brown</i>	22	+0.54 ^b	+0.10
6	<i>D6Mit5</i>	27	-0.45 ^a	-0.28
7	<i>D7Ucsf1</i>	24	+0.58 ^b	+0.32
7	<i>D7Mit10</i>	27	+0.48 ^a	+0.30
8	<i>D8Cebr46s6</i>	25	-0.07	-0.45 ^a
10	<i>D10Cebrp44s3</i>	24	+0.51 ^a	+0.25

The results of Pearson's correlation analysis are presented as correlation coefficients (*r*).

The statistical significance of these analyses is as follows: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

N indicates the number of RIS available for analysis of an individual marker.

TABLE 3

Total genome search: suggestive quantitative trait loci (QTL) of the difference (Δ) between newborn and adult relative kidney weight

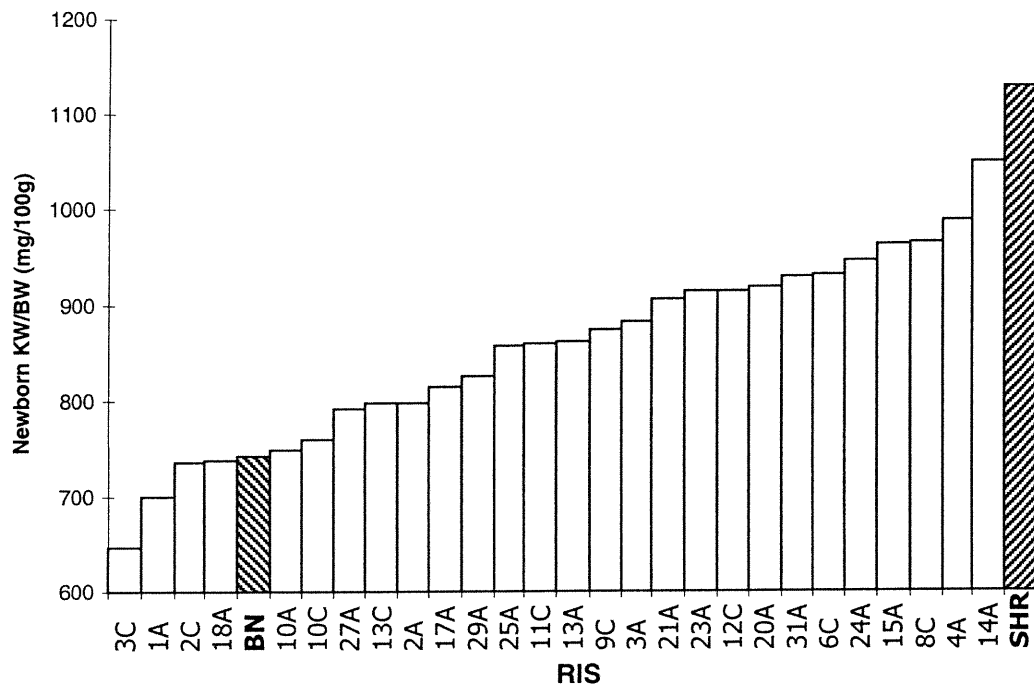
Chromosome	Marker	<i>N</i>	Δ of newborn and adult KW/BW <i>r</i>
7	<i>D7Ucsf2</i>	27	+0.46 ^a
8	<i>D8Mgh9</i>	24	+0.43 ^a
10	<i>D10Mit4</i>	26	+0.44 ^a
12	<i>D12Mit6</i>	26	+0.46 ^a
17	<i>D1a</i>	27	-0.51 ^b
19	<i>Es3</i>	27	+0.51 ^b

The results of Pearson's correlation analysis are presented as correlation coefficients (*r*). The statistical significance of these analyses is as follows: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$. *N* indicates the number of recombinant inbred strains (RIS) available for analysis of an individual marker.

FIGURE 1

Distribution of newborn (A) and adult (B) relative kidney weight values in the recombinant inbred strain (RIS)

A)



B)

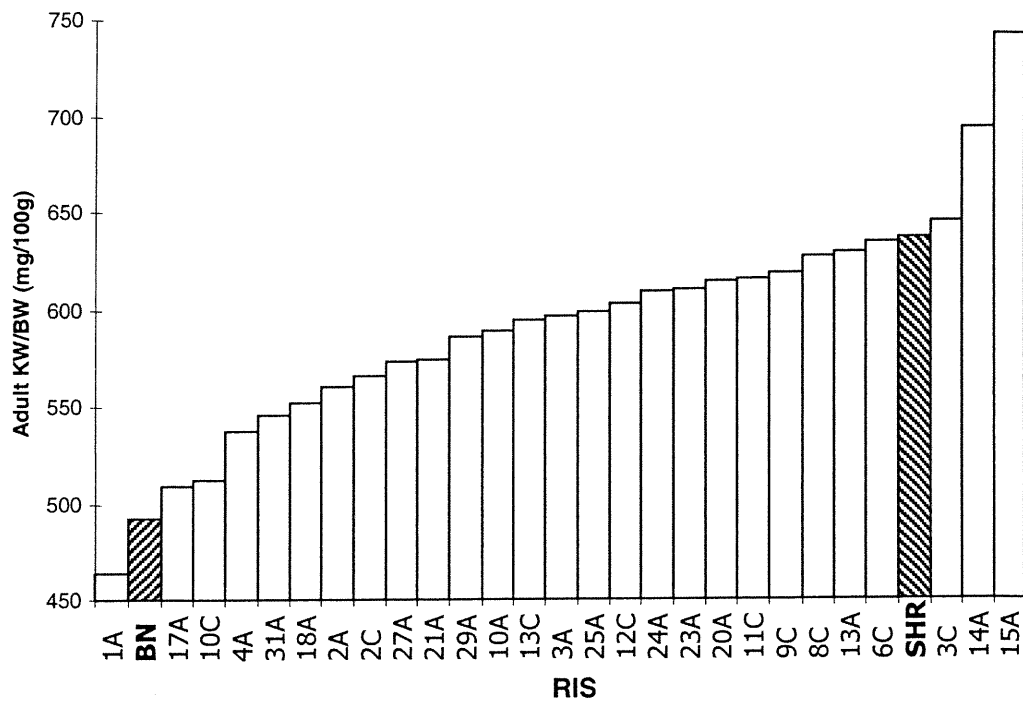


FIGURE 2

Correlation between newborn and adult relative kidney weight (KW/BW) in the recombinant inbred strain (RIS)

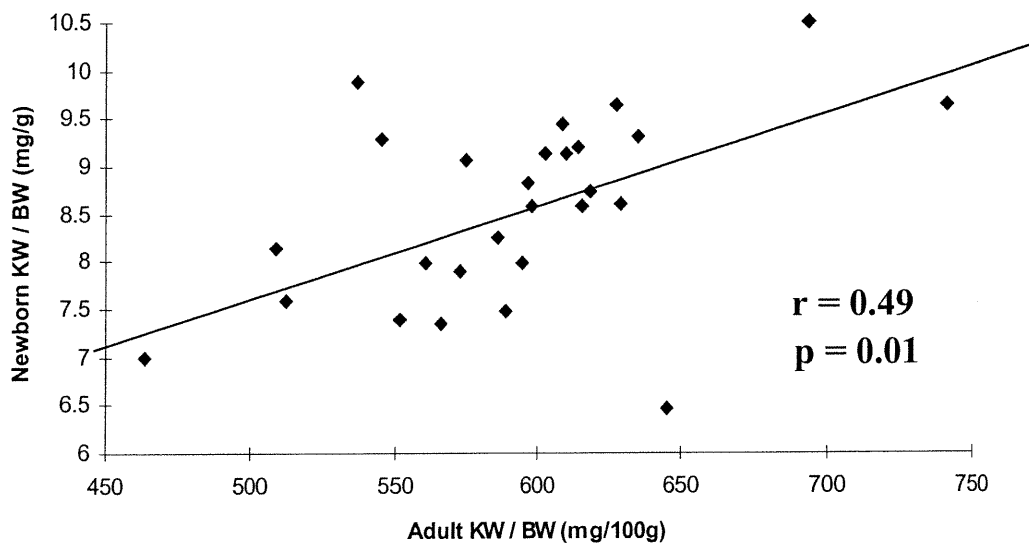


FIGURE 3

Correlation between systolic blood pressure (SBP) and adult relative kidney weight (KW/BW) in the recombinant inbred strain (RIS)

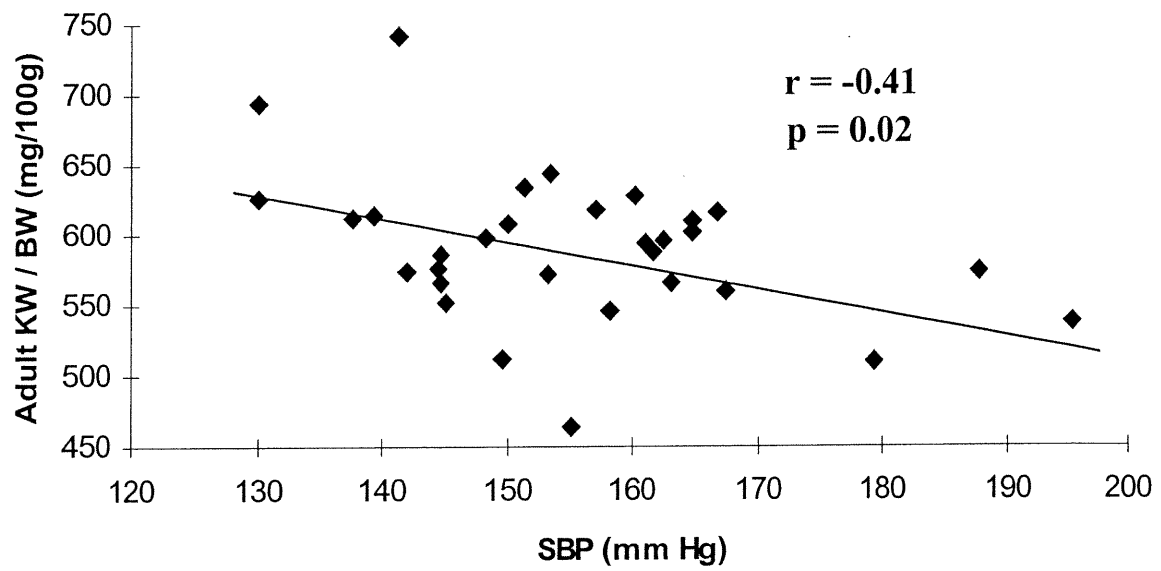


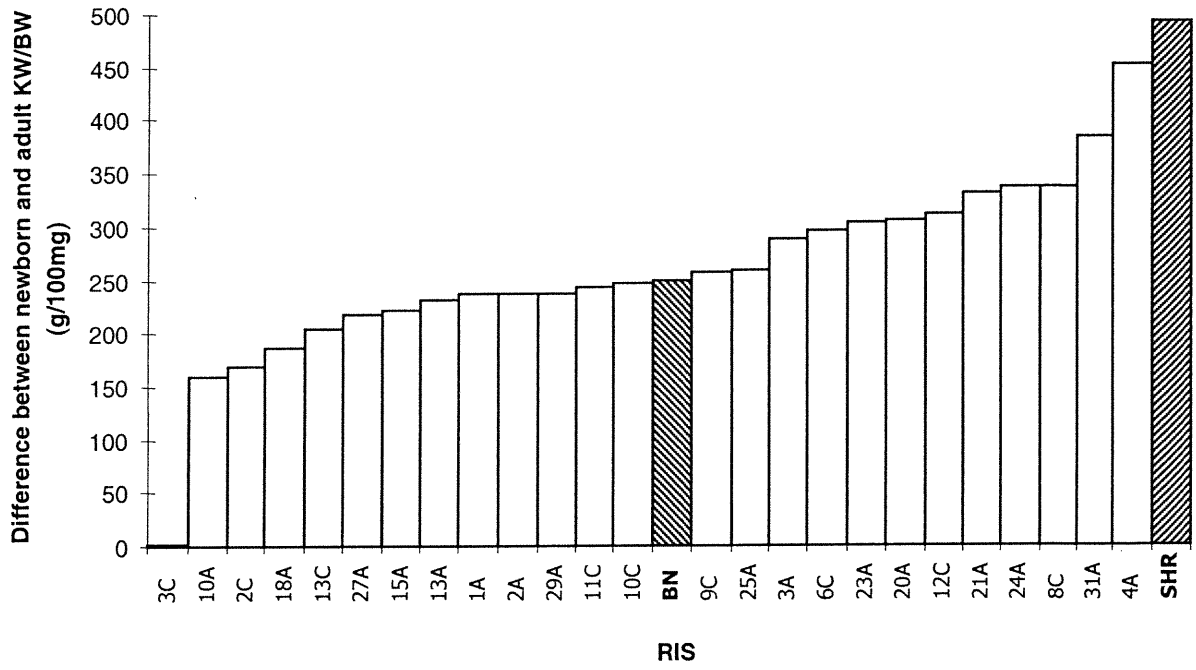
FIGURE 4

Quantitative trait locus of adult relative kidney weight (KW/BW) and systolic blood pressure (SBP) on rat chromosome 1

Chromosome 1		SBP p-value (r)	Adult KW/BW p-value (r)
D1Cebr16s1			
D1Cebr103s1		0.05 (0.34)	0.5 (-0.13)
C	0.9cM	0.04 (0.47)	0.3 (-0.18)
D1N64			
	5.3cM		
→ Rt6		0.003 (0.53)	0.04 (-0.41)
D1Cebr52s3	2.8cM		
Sa		0.1 (0.28)	0.3 (-0.18)
D1Cebr7s3	1.2cM		
Scnn1b	5.3cM	0.03 (0.38)	0.3 (-0.18)
Scnn1g			
Mt1pa			
RtB		0.08 (0.38)	0.3 (-0.17)
Myl2			
	3.3cM		
Lsn		0.2 (0.25)	0.5 (-0.12)

FIGURE 5

Distribution of the difference between newborn and adult kidney weight (KW/BW) values in the recombinant inbred strain (RIS)



TROISIÈME PARTIE
DISCUSSION GÉNÉRALE

Plusieurs organes et systèmes participent au contrôle de la pression artérielle. Ces multiples acteurs engendrent de nombreuses redondances des systèmes physiologiques responsables de l'homéostasie très fine de la pression artérielle. Ces nombreux niveaux de contrôle rendent cependant la détermination des causes de l'hypertension essentielle ardue. L'hypothèse généralement acceptée veut que la maladie soit le résultat d'un ou plusieurs phénomènes dits primaires (génétiques) affectant la pression artérielle et changeant la valeur cible normale de la pression (le "*set-point*"). Les divers organes et systèmes modulateurs agiraient à leur tour tout au long de la vie en amplifiant ou en "combattant" l'anomalie primaire. Par exemple, l'hypertrophie ventriculaire, le durcissement des artères ou l'insuffisance rénale observables chez un patient pourraient n'être que les conséquences du défaut primaire causal. Inversement, on pourrait tout aussi bien imaginer qu'un gène anormal ne soit pas capable seul d'induire l'hypertension sans le concours d'autres gènes anormaux (prédisposition). Cette hypothèse se rapproche de l'hypothèse proposée pour le développement du cancer, à savoir que plusieurs mutations doivent être présentes dès le départ ou apparaître *de novo* pour l'induction, le développement et le maintien de la maladie. Dans ce cas, la distinction entre phénomènes primaires et secondaires n'est que temporelle, tous les acteurs anormaux sont requis, mais doivent agir en séquence. Finalement, nous proposons ici l'existence de gènes de susceptibilité environnementale qui auront besoin d'un environnement spécifique pour manifester leurs effets délétères. Comme ces effets néfastes peuvent être pléiotropiques et que ces gènes de susceptibilités peuvent être en interaction avec d'autres gènes, il n'est pas facile de les distinguer des gènes de prédisposition qui peuvent eux aussi être modulés par l'environnement.

La caractéristique unique des gènes de susceptibilité environnementale est la nécessité d'un environnement spécifique pour qu'ils se manifestent de *façon différentielle*. Nous avons essayé d'insister sur le fait que, dans le cas des gènes de susceptibilité, l'effet de l'environnement sur le phénotype étudié n'est pas additif. Il y a

donc un risque associé à l'expression *différentielle* d'un gène de susceptibilité environnementale qui n'est pas simplement le risque dû à l'effet additif de l'environnement. Finalement, il faut changer l'environnement afin de trouver les conditions permettant d'observer *l'expression différentielle* de ces gènes.

Dans cette thèse, nous avons étudié la susceptibilité au stress. Pour ce faire, nous avons soumis des rats à 2 stress différents, soient un stress d'immobilisation, et un jeûne de 36 heures. Nous avons mesuré divers phénotypes modulés par ces stress chez des lignées RIS ségrégantes et tenté de trouver les déterminants génétiques responsables. Les gradients prononcés des profils de distribution que nous avons observés chez les RIS pour tous les traits confirment les fondements génétiques (et polygéniques) des différences mesurées et l'existence d'une susceptibilité différente entre les souches pour un *même* stress. Finalement, nous avons montré qu'il est impossible de comprendre l'étiologie d'une maladie sans s'attarder à son développement. Nous avons observé l'association de QTLs spécifiques pour le nouveau-né qui auront un impact sur le phénotype mesuré à l'âge adulte. Ainsi, le temps (l'âge), lorsqu'il module de façon différentielle l'expression d'un phénotype ayant des répercussions à l'âge adulte peut être aussi perçu comme un phénotype environnemental pour lequel il existe des susceptibilités différentes. Donc, certains gènes expliquent peut-être pourquoi l'âge en soi, n'a pas les mêmes effets pour tous! Le tableau VI résume les résultats présentés dans cette thèse.

Tableau VI. QTL de quelques phénotypes de la réponse au stress et du poids relatif du rein (en fonction de l'âge) chez les lignées RIS.

Stimulus externe	Phénotype	Locus	
Jeûne	Na urinaire K urinaire Rapport Na/K Ca urinaire	<i>D10Cebrp97s5</i> <i>Alb</i> (Chr 14) <i>D6Cebrp97s14</i> <i>D7Mit3</i>	
Stress d'immobilisation	Température corporelle	<i>Myh3</i> (Chr 10) <i>Lsn2/hsp27</i> (Chr 12) Chromosome Y	
	Expression des <i>hsp</i>	<i>Myh3</i> Chromosome Y <i>D7Cebrp187s3/</i> <i>D7Mit3 (hstf1)</i>	
Âge	Nouveau-né	Poids relatif du rein	<i>D3Mit9</i> <i>B-brown</i> (Chr 5) <i>D6Mit5</i> <i>D7Ucsf1</i> <i>D7Mit10</i> <i>D10Cebrp44s3</i>
		Adulte	Poids relatif du rein
	Poids relatif du rein, Δ adulte - nouveau-né	<i>D7Ucsf2</i> <i>D8Mgh9</i> <i>D10Mit4</i> <i>D12Mit6</i> <i>D1a</i> (Chr 17) <i>Es3</i> (Chr 19)	

Nous montrons dans le premier manuscrit (chapitre 11) que l'environnement doit être changé de façon à pouvoir observer et amplifier la variance due à l'environnement, et que cela est essentiel et préalable à la recherche de QTLs de susceptibilités environnementales. Nous avons trouvé que 4 chromosomes différents portent les QTLs associés à l'excrétion urinaire du sodium, potassium, calcium ainsi que du rapport Na/K, soient les chromosomes 10 (*D10Cebrp97s5*), 14 (*Alb*), 7 (*D7Mit3*) et 6 (*D6Cebrp97s14*), respectivement. Dans le deuxième manuscrit (chapitre 12), nous avons mesuré l'augmentation de température corporelle induite par le stress d'immobilisation et trouvé les loci responsables de la réponse différentielle sur le chromosome 10 (*Myh3*), 12 (*Lsn2/hsp27*) et le chromosome Y. Nous avons aussi observé un effet de la diète à forte teneur en sodium sur le phénotype. Dans le troisième manuscrit (chapitre 13), nous avons trouvé les QTLs associés à l'expression de 5 gènes de stress suite à l'immobilisation chez les RIS. Encore ici, les chromosomes 10 (*Myh3*) et Y portent des QTLs. De plus, un QTL contenant le facteur de transcription des gènes de stress *Hsf1* sur le chromosome 7 semble déterminer en partie l'expression de la majorité des *hsp*s étudiés. Le dernier chapitre des résultats rapporte l'existence de plusieurs QTLs impliqués dans la détermination de la taille du rein chez SHR. Certains sont communs aux nouveaux-nés et aux adultes, d'autres unique à l'un ou l'autre âge et d'autres responsables de la progression entre les 2 périodes. Mentionons parmi eux l'existence de 2 QTLs portés par le chromosome 10 (*D10Cebrp44s3* et *D10Mit4*) qui chevauchent les QTLs précédemment trouvés pour l'excrétion de sodium et la réponse thermique au stress.

L'analyse d'ensemble de nos résultats fait ressortir quelques points intéressants. Nos données indiquent que la réponse thermique (T20) et l'expression des *hsp* en réponse à l'immobilisation possèdent un QTL en commun sur le chromosome 10 (*Myh3*), suggérant l'existence d'un même gène déterminant les 2 phénotypes. De plus, le locus *D10Cebrp97s5* responsable de l'excrétion urinaire de sodium n'est pas différent du locus

Myh3, indiquant la possibilité que l'excrétion de sodium soit aussi modulée par ce gène de la réponse au stress. Cela pourrait aussi expliquer l'effet potentiateur de la diète riche en sodium sur T20. Finalement, il faut noter l'impact du chromosome Y sur les 2 phénotypes de stress mesurés, mais aussi sur le potassium urinaire ainsi que sur le rapport Na/K urinaire (voir chapitres 11, 12 et 13). Il est donc possible que la réponse au stress, le dimorphisme sexuel ainsi que la sensibilité au sel soient en interaction pour moduler les paramètres cardiovasculaires chez les RIS.

15. INTERACTION ENTRE LE SODIUM ET LE STRESS. Modulation de la pression artérielle et des paramètres cardiovasculaires.

Comme nous l'avons mentionné, l'effet du sodium nutritionnel sur la PA a été étudié par plusieurs groupes et a produit une quantité considérable de publications scientifiques contradictoires. Le consensus actuel sur l'effet hypertenseur du sodium nutritionnel reste fragile, les études épidémiologiques aussi bien que les études d'interventions ne suggérant qu'un effet marginal du sodium sur la pression artérielle dans la population générale (voir chapitre 11). Toutefois, on s'accorde à reconnaître l'existence d'une sous-population d'individus sensibles au sel voyant leur PA augmenter en proportion de la charge sodique, indiquant une courbe de pression/natriurèse anormale (non-modulateurs). La controverse sur les effets cardiovasculaires possibles du sodium nutritionnel vient donc peut-être d'un ciblage inadéquat et/ou d'un phénotypage trop général des populations étudiées, la PA étant sujette à de multiples niveaux de contrôles. Par exemple, la réponse au stress, parce qu'elle affecte la PA et qu'elle est modulée par le sodium nutritionnel sera une variable confondante dans les études visant à déterminer le rôle du sodium dans les maladies cardiovasculaires et l'hypertension.

En effet, dans cette thèse, nous avons observé qu'une diète à forte teneur en sodium augmente la réponse au stress (T20), l'analyse de variance sur 209 rats et 21 RIS

montrant un effet global significatif de la diète en sodium sur T20. Cela se traduit par un *LOD score* apparent plus élevé pour les QTLs du chromosome 10 et 12. De plus, l'effet du sodium sur T20 est aussi présent chez les animaux congéniques pour le chromosome 10 portant un des QTLs de la réponse différentielle au stress trouvée chez les RIS. Ces résultats suggèrent donc que l'action du sodium nutritionnel sur T20 pourrait s'exercer par une interaction avec le QTL du chromosome 10, l'augmentation de T20 chez les animaux congéniques par rapport aux témoins (figure 4b du chapitre 12) étant du même ordre que la différence observée dans les résultats utilisant toutes les RIS (Figures 1a et b du chapitre 12). Comme le QTL du chromosome 10 (*Myh3*) est en interaction avec celui du chromosome 12 (*Lsn2*) d'après l'équation de régression, l'effet apparent du sodium sur le QTL du chromosome 12 (Figure 3b du chapitre 12) se manifeste peut-être au travers de l'interaction avec le QTL du chromosome 10. Cependant, nous n'avons pu trouver d'interaction significative entre le QTL du chromosome 10 et la diète à forte teneur en sodium (voir l'équation de régression, chapitre 12). De plus, aucun nouveau QTL n'est apparu lors de l'étude chez les animaux sur diète à forte teneur en sodium. Donc, sans exclure la possibilité d'une interaction, nous devons conclure à un effet strictement additif du sodium nutritionnel sur T20.

15.1 Modulation de la température corporelle et de la réponse thermique au stress d'immobilisation par le sodium et le calcium

La température corporelle des mammifères est maintenue très précisément ($\pm 0.2^{\circ}\text{C}$) autour de sa valeur optimale de 37°C . On sait depuis longtemps que le maintien de la température à cette valeur cible est le fait de l'hypothalamus postérieur (Myers 1969). Cependant, on semble ignorer la contribution essentielle de Myers et Veale (1970), alors que plusieurs travaux plus récents ont répété leurs expériences, redécouvert leurs résultats et reformulé leur postulat (Denbow et Edens 1980, Arad et Skadhauge 1986, Badgaiyan et Mandal 1995). Myers et Veale (1970) ont été les premiers à proposer

que la cible de température corporelle est contrôlée au niveau de l'hypothalamus par les ions Na et Ca. Ils ont infusé diverses solutions de Krebs contenant des concentrations variables de Na et de Ca au niveau de l'hypothalamus postérieur chez le chat conscient, et observé que le Na augmente et le Ca diminue la température corporelle. Ils ont proposé que le rapport des ions Na/Ca est essentiel au maintien de la température à sa valeur cible chez les mammifères. Le niveau de Na et de Ca au niveau du liquide céphalo-rachidien doit donc rester constant pour que la température corporelle reste constante. Ainsi, Arad et Skadhauge (1986) ont montré une corrélation significative entre le rapport Na/Ca et la température corporelle ($r=0.62$) chez le poulet. De plus, ils ont observé que la température corporelle de cet oiseau augmente ou diminue significativement après une semaine d'exposition à une diète riche ou pauvre en sodium, respectivement. Il est intéressant de rappeler que nous avons montré (Dumas *et al.* 1994) que le rapport Na/Ca module la hausse de pression artérielle due au sel chez le rat SHR sensible au sel (SHR-S) ainsi que la réponse thermique au stress d'immobilisation. Nous avons alors observé qu'une diète riche en calcium prévient la hausse de pression induite par le sodium nutritionnel chez SHR-S et diminue la réponse thermique au stress d'immobilisation. À l'inverse, le sodium nutritionnel augmenta la pression et la réponse au stress. Cependant, l'effet maximum sur la pression fut observé avec la diète riche en sodium et en calcium, les animaux soumis à ce régime présentant la pression la plus basse. De façon intéressante, la réponse thermique au stress sous ce régime fut intermédiaire. Même si le Na était élevé, le calcium a "compensé" pour donner des valeurs de températures inférieures à ce que l'on s'attendait en regard de la concentration de Na seule. Ces résultats confirment donc le rôle du rapport Na/Ca sur le contrôle de la température et, chez le rat, généralise cet effet à la température observé lors d'un stress psychogénique comme l'immobilisation.

15.2 Contribution du stress et du sodium à la pression artérielle

L'action du sodium sur la pression artérielle s'exerce donc peut-être par la modulation de la réponse au stress (effet environnemental). Dans ce modèle, une réponse au stress préalablement inadéquate expliquerait une réponse anormale au sodium (non-modulation, gêne de susceptibilité environnementale). D'ailleurs, il semble qu'une activité sympathique accrue soit un préalable nécessaire pour que le sodium nutritionnel puisse exercer son effet hypertenseur, un pouls élevé ainsi qu'une grande excrétion urinaire de sodium (comme marqueur de l'ingestion) interagissant pour déterminer la PA (Poulter *et al.* 1988, Staessen *et al.* 1989 et 1991). Cela est d'autant plus intéressant que moins de 2% de la variance de la pression artérielle est attribuable aux changements d'excrétion urinaire du sodium seul (Staessen *et al.* 1989). D'autre part, le sodium de la diète augmente la pression artérielle et les niveaux de catécholamines de certaines régions du cerveau chez le rat SHR stressé par rapport aux SHR témoins, les taux de catécholamines pouvant prédire avec une précision de 90-100% l'appartenance au groupe stressé/témoin (Ely et Weigand 1983).

Dans une étude d'intervention chez le chien, Anderson et coll. (1987) montrèrent que le stress provoque l'hypertension et une rétention de sodium. Les animaux de l'étude reçurent une infusion de solution saline pendant 12 jours, et furent soumis quotidiennement à un stress d'une demi-heure. L'hypertension s'établit graduellement, en parallèle à une balance sodique positive. L'aspect spectaculaire de l'expérience est que les mêmes chiens, toujours recevant une infusion de solution saline, mais sans session de stress quotidienne, retrouvèrent une pression normale. Pendant 12 jours encore, cette PA normale fut maintenue, et la balance sodique redevenue nulle resta stable, démontrant la réversibilité de l'effet du sodium en l'absence de stress. Des résultats similaires furent aussi observés chez le rat (DiBona et Jones 1995, Bensi *et al.* 1997).

Chez l'Homme, on a observé une interaction entre le stress professionnel et le sodium nutritionnel (Staessen *et al.* 1994). Dans cette étude épidémiologique portant sur

384 fonctionnaires masculins, les sujets présentant un indice de stress élevé (selon un questionnaire) tout en étant dans le 90^e percentile pour l'excrétion de sodium (250 mmol/d et plus) avaient une pression artérielle systolique et diastolique plus élevée que les autres sujets de 6.3 et 5.9 mm Hg respectivement. Inversement, une diète à faible teneur en sodium (excrétion de 100 mmol/d) chez les sujets présentant aussi un fort indice de stress était associée à une pression systolique et diastolique plus basse en moyenne de 4.5 et 1.4 mm Hg respectivement. Dans une étude d'intervention sous diète standardisée, Rollnik et coll. (1995) soumirent 27 hommes normotendus et 21 hypertendus à un stress psychogénique (jeux vidéos compétitifs). Ils observèrent que 69% des sujets augmentèrent et 31% réduisirent leur excrétion de sodium lors du stress, l'augmentation de pression associée au stress étant moindre chez les "excréteurs". Il semble donc qu'il y ait un mécanisme opposant la rétention de sodium causée par l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAS) lors du stress. Comme pour le système RAS, *mais ici en réponse au stress*, il y aurait des modulateurs et non-modulateurs de l'excrétion du sodium.

Les effets cardiovasculaires néfastes du sodium nutritionnel semblent donc s'exercer en partie par la modulation de la réponse au stress. De plus, la réponse différentielle observée pour l'excrétion du sodium lors du stress suggère une différence génétique entre modulateurs et non-modulateurs. Il est aussi intéressant de constater que tous les aspects de la balance sodique sont modulés par le stress. Ainsi, les rats ayant le choix entre de l'eau et une solution de sel à 1% comme breuvages vont augmenter leur consommation de sel lors d'un stress psychogénique (apparition d'un intrus) (Bourjeili *et al.* 1995). De plus, le rat hypertendu SHR va avoir une consommation de sel plus élevée que le rat normotendu WKY en présence ou en l'absence d'agent stressant, suggérant fortement une différence génétique entre les 2 souches (Bourjeili *et al.* 1995). Cette faim pour le sel chez SHR s'accompagne d'une rétention de sodium causée par une activité

sympathique rénale accrue (Koepke 1985). Chez les enfants normotendus de parents hypertendus, un test de stress (calcul mental ou jeux vidéos compétitifs) suite à une surcharge sodique provoque une augmentation accrue de la résistance vasculaire périphérique (Miller *et al.* 1995), et de la PA systolique et diastolique (Falkner *et al.* 1981b) par rapport à l'expérience menée sous diète normale. À l'opposé, les enfants sans histoire familiale d'hypertension ne présentent pas de différences entre les 2 sessions de stress avec ou sans sel. Notons que les PA basales lors de l'apport en sodium n'étaient pas différentes entre les sujets avec ou sans histoire familiale d'hypertension pour les 2 études. Il semble donc qu'il y ait une base génétique à l'expression différentielle de l'excrétion du sodium et de l'action cardiovasculaire du sodium lors du stress.

Finalement, notons que la non-modulation telle que définit par Williams et coll. (1992) sert à caractériser la sensibilité au sel. Cette définition a permis de mettre en évidence des différences raciales dans les types d'hypertension. Ainsi, 30% des hypertendus mais jusqu'à 50% des noirs américains (*african american*) seraient non-modulateurs selon cette définition. Lors d'un stress, les noirs américains présentent aussi une réactivité vasculaire plus élevée et une excrétion de sodium réduite par rapport aux blancs (37 à 43% des sujets testés, et seulement 18% chez les blancs) (Falkner et Kushner 1989, Light et Turner 1992).

Ces différences raciales renforcent l'hypothèse d'une différence génétique entre individus sensibles et résistant, et sont peut-être le reflet d'une sélection génétique. Wilson et Grim (1991) proposèrent une hypothèse controversée mais néanmoins très intéressante pour expliquer ces observations. Pour étayer leur thèse, les auteurs soutiennent qu'une sélection génétique a pu s'exercer sur les millions d'esclaves africains "importés" pour travailler dans le nouveau monde. En effet, ils rappellent que l'esclavage s'est pratiqué à grande échelle du XVI^e au XIX^e siècle, une période suffisante, selon eux, pour que la sélection naturelle s'applique. Les conditions dans lesquelles les gens étaient traités depuis leur capture jusqu'au port, puis durant la traversée de l'Atlantique, et

enfin dans les plantations étaient inhumaines. Cet euphémisme traduit en fait l'absence de mot pouvant décrire les horreurs que ces gens ont dû subir. Wilson et Grim, de par leur recherche minutieuse, ont cependant permis de mettre en lumière des conditions de détention communes à tous ces gens: les conditions sanitaires déficientes, le peu d'eau potable, et la chaleur. Ces circonstances expliquent les principales causes de décès: vomissements et maladies intestinales (dysenterie, diarrhée). Ces troubles provoquant des pertes importantes de fluides et de sel, les auteurs suggérèrent que les plus résistants devaient en partie leur survie à une capacité accrue à garder le sel. Cette qualité génétique unique aura ainsi agi comme sélection génétique au cours des siècles d'esclavage. Ce travail reçut cependant des commentaires négatifs soulignant le danger de stigmatiser une "race" plus qu'une autre, le débat étant toujours d'actualité (Cooper et Kaufman 1998, O'Donnell et Kannel 1998). Néanmoins, nous pensons que cette hypothèse a tout de même le mérite de proposer une explication bio-historique valable pour expliquer la prévalence étonnamment élevée de sensibilité au sel retrouvée aujourd'hui chez les descendants d'esclaves africains amenés de force sur le continent américain. Dans le cas qui nous occupe, le concept de race ne se veut qu'une autre façon d'estimer le risque d'être non-modulateur, et qui peut être utile pour mieux cibler et traiter certaines sous-populations.

15.3 Mécanismes possibles

Le facteur natriurétique des oreillettes (*Atrial Natriuretic Factor, ANF*) est un peptide natriurétique et hypotenseur libéré des oreillettes du coeur lorsque la distension mécanique (*stretch*) est suffisante, une condition retrouvée lors de l'augmentation du volume sanguin. L'ANF ainsi libérée exerce son effet diurétique et natriurétique au niveau des glomérules rénaux afin de contrecarrer l'expansion du volume sanguin. Chez le rat, un stress aigu comme un choc électrique va augmenter les taux d'ANF circulant à des niveaux équivalant à ce qui peut être mesuré dans des conditions physiologiques

après une stimulation mécanique hypervolémique du coeur (Blizzard et Morris 1987). Rappelons que le jeûne aigu, perçu aussi comme un stress, induit aussi une augmentation de l'ANF circulant suivi d'une diurèse et d'une natriurèse prononcées (voir chapitre 11). Jezova et coll. (1994) ont proposé un rôle inhibiteur de l'ANF sur la libération de l'ACTH, et donc sur la réponse au stress. Nous avons montré ici qu'il existe un gradient significatif dans l'excrétion urinaire de sodium lors d'un jeûne aigu chez les RIS, et que cette réponse différentielle est liée à un locus sur le chromosome 10 du rat. La natriurèse induite par l'ANF suite au jeûne chez les RIS pourrait peut-être modulée par le QTL du chromosome 10. L'effet inhibiteur de l'ANF sur la réponse au stress pourrait aussi être modulé par ce QTL. S'il s'avérait que le QTL trouvé pour T20 soit identique à celui responsable de l'excrétion de sodium, cela expliquerait la réponse au stress différentielle observée chez les RIS. Rappelons que le QTL du chromosome 10 pour T20 est modulé par le contenu en sel de la diète, une observation vérifiée aussi chez les animaux congéniques pour ce QTL. Cependant, nos résultats ne montrent pas de différence dans l'excrétion urinaire de sodium entre SHR et SHR^{·BN-RNo10} (résultats non montrés). Ces résultats sont préliminaires et devront être reproduit avec plus d'animaux sous plusieurs charges sodiques. Nos données actuelles ne nous permettent donc pas d'affirmer que les 2 QTLs trouvés soient identiques ou non. Il est important aussi de rappeler que les QTLs déterminant la PA chez les RIS (Pravenec *et al.* 1995) ne correspondent à aucun des QTLs que nous avons rapportés pour la réponse au stress ou pour l'excrétion des ions. Les PA employées pour cette analyse ont été obtenues sous anesthésie. Il serait donc essentiel de mesurer la pressions des RIS sous stress de façon à voir si certains de nos loci déterminent aussi la tension artérielle dans ces conditions.

Enfin, notons que la réponse au stress telle que nous l'avons mesurée (température) ou évaluée par la résistance vasculaire et la pression artérielle peut être atténuée et/ou normalisée par l'apport nutritionnel d'autres ions, étendant ainsi l'impact des interactions entre électrolytes aux états de stress (Huie *et al.* 1987, Zaloga *et al.* 1988,

Hatton *et al.* 1989, Dumas *et al.* 1994, Sudhir *et al.* 1997). Par exemple, nous avons montré qu'une diète riche en sodium et en calcium prévient l'augmentation de pression artérielle causée par le sodium, augmente de 5 fois le rapport d'excrétion Na/K et diminue la thermosensibilité lors du stress d'immobilisation chez le rat SHR sensible au sel (Dumas *et al.* 1994).

16. DIMORPHISME SEXUEL DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET DE LA RÉPONSE AU STRESS

Les hommes ont en général une PA supérieure à celle des femmes (avant la ménopause) (Boe *et al.* 1957, T Gordon 1964). De même, les mâles de plusieurs souches consanguines de rat dont SHR et WKY montrent aussi une PA supérieure que les femelles des mêmes souches (Okamoto et Aoki 1963, Wexler et Greenberg 1978). Plusieurs groupes ont rapporté un effet du chromosome Y sur la pression artérielle par l'étude de croisements F₂ utilisant des rats génétiquement hypertendus SHR ou SHR-SP (Hilbert *et al.* 1991, Ely *et al.* 1993, Davidson *et al.* 1995). De plus, si les rats mâles ont une PA supérieure aux femelles, les rats F₂ dont le grand-père est de la souche hypertendue présentent une pression encore plus élevée, suggérant une anomalie du chromosome Y hypertendu. Chez l'humain, on observe aussi une influence du sexe sur la pression artérielle diastolique et la masse ventriculaire du coeur gauche, les hommes ayant des valeurs plus élevées que les femmes pour ces paramètres (Galderisi *et al.* 1993).

Nos résultats actuels chez le rat militent fortement pour un impact du chromosome Y d'origine SHR (Ys) sur plusieurs paramètres cardiovasculaires. Nous avons en effet trouvé que la réponse thermique au stress d'immobilisation (T20) était déterminée en partie par Ys, mais que Ys interagissait aussi avec le locus *Myh3* du chromosome 10 pour produire son action. Notons que la modulation de la pression artérielle basale par Ys rapporté par Ely (1993) chez les lignées consanguines s'observe aussi sur la PA mesurée

lors du stress d'immobilisation avec une réponse parallèle à celle observée pour la température. La PA la plus élevée se mesure chez SHR (mm Hg \pm erreur type, 214 \pm 5), suivi de SHR.WKY-Y (198 \pm 7), WKY.SHR-Y (163 \pm 5) et WKY (135 \pm 5) (D. Ely, communication personnelle). Le chromosome Y hypertendu seul est capable d'induire une hausse de pression, mais les autosomes sont requis pour l'expression maximale de l'hypertension chez SHR. Finalement, Kreutz et coll. (1996) ont aussi montré une interaction entre le chromosome 10 (locus *BP/SP-1a* modulant la PA systolique basale) et le chromosome Y d'origine hypertendu (SHR-SP). Notre locus (*Myh3*) chevauchant le locus *BP/SP-1a*, il se peut que le même gène sur le chromosome 10 module la PA et la réponse au stress en interaction avec le chromosome Y d'origine hypertendu.

Cet effet de Ys se retrouve aussi au niveau de la réponse au stress "cellulaire", Ys déterminant en partie l'expression du gène de stress *hsp70* dans le coeur et le rein, de même que l'expression de *hsp86* et *hsp105* dans le rein (voir chapitre 13). D'autre part, nous rapportons une modulation de l'excrétion de potassium et du rapport Na/K par Ys (souches B \times H) qui pourraient contribuer à la sensibilité au sel chez les RIS. Une modulation de la sensibilité au sel par l'apport exogène de potassium a d'ailleurs été rapportée chez des hommes noirs normotendus, soulignant l'importance du rapport Na/K (Morris *et al.* 1999). Finalement, nous montrons que Ys ne joue pas de rôle différentiel dans la détermination du poids relatif des reins des nouveau-nés ou des adultes chez les RIS. De plus, même indépendamment de son origine, le chromosome Y n'exerce aucun effet sur le poids relatif des reins chez les RIS (Dobesová *et al.* 1997). Au contraire, le poids relatif du coeur est influencé par le chromosome Y chez les RIS, soit par Ys chez les souches B \times H (mâle SHR) et par le chromosome Y de BN chez les lignées H \times B (mâle BN) (Dobesová *et al.* 1997). Finalement, Van Abeelen et coll. (1990) suggérèrent un effet marginal du chromosome Y sur le poids du rein chez la souris. Tous ces résultats permettent donc de distinguer une influence du chromosome Y en soit, et une autre qui est fonction de sa provenance.

Le chromosome Y d'origine hypertendue semble exercer son action sur le système sympathique. Ely et coll. (1997) ont en effet rapporté une hausse des taux surrenaliens de chromogranine A et de norépinéphrine chez WKY·SHR-Y qui est cependant abolie par sympathectomie. Chez cette souche, le contenu et la libération de norépinéphrine rénale sont accrus, et modulés par la testostérone (Jones *et al.* 1998). De plus, les rats SHR mâles, indépendamment de la pression artérielle, possèdent plus de récepteurs α_2 -adrénergiques au niveau du rein que les femelles, dont l'expression est modulée par les androgènes (Gong *et al.* 1994). On a aussi rapporté la stimulation *de novo* de l'expression des récepteurs α_1 -adrénergiques par la testostérone dans des cellules de muscle lisse *in vitro* (Phillippe *et al.* 1991). De même, on trouve un plus grand nombre de récepteurs α_1 -adrénergiques dans la paroi des vaisseaux de rats SHR (McConnaughey et Iams 1993). Cette augmentation apparente du nombre de récepteurs est réduite et normalisée par gonadectomie parallèlement à une réduction de la pression artérielle, mais restaurée par un apport exogène de testostérone chez les animaux gonadectomisés (McConnaughey et Iams 1993). Chez des femelles SHR ovariectomisées, la testostérone infusée pendant 5 semaines produit un niveau de pression artérielle presque équivalent à celui retrouvé chez les mâles SHR par un mécanisme affectant la courbe de pression/natriurèse (Reckelhoff *et al.* 1998). De façon intéressante, un mécanisme dépendant des androgènes semble responsable de l'augmentation de l'expression des ARNm de l'angiotensinogène et de la rénine chez les rats SHR, expliquant en partie le profil de développement de l'hypertension retrouvé chez les mâles (Chen *et al.* 1992). Cette modulation du système RAS par la testostérone explique peut-être l'absence d'effet d'une diète riche en sodium sur la pression de rats gonadectomisés, alors que les rats témoins ainsi que les animaux gonadectomisés mais supplémentés en testostérone, ont une PA plus élevée et sensible au sel (Jenkins *et al.* 1994).

Turner et coll. (1991), et Ely *et al.* (1993) ont montré que les 2 lignées consomiques pour le chromosome Y qu'ils ont créées, SHR·WKY-Y et WKY·SHR-Y, ont

des PA intermédiaires à celles mesurées chez WKY et de SHR, indiquant l'importance de Ys, mais aussi des autosomes de SHR pour le développement de l'hypertension chez ce modèle. Nous avons vu le rôle essentiel des androgènes sur le développement de l'hypertension et la modulation du système sympathique, un rôle confirmé aussi chez les lignées consomiques (Ely *et al.* 1993). Cependant, dans une expérience chez des hybrides F₁ d'un croisement entre mâle SHR et femelle King-Holtzman hétérozygote pour le récepteur aux androgènes, la castration a aussi diminué la PA chez les 50% de mâles dépourvus de récepteurs aux androgènes (Ely *et al.* 1991). Chez ceux-ci, la pression est réduite de -27 mm Hg, presque autant que la baisse de -38 mm Hg trouvée chez les hybrides normaux, suggérant l'existence de 2 mécanismes distincts responsables de l'action de Ys sur la PA. Ce que les auteurs appellent le "*testis-derived factor*" et qui ne requiert pas de récepteurs aux androgènes pour son effet sur la PA milite en faveur de l'existence d'une interaction entre le chromosome Y et les autosomes.

Si l'effet hypertenseur général du chromosome Y sur la PA est bien démontré (i.e. les mâles ayant une PA supérieure à celle des femmes), l'effet hypertenseur *supérieur* du chromosome Y de SHR est toutefois débattu. Par exemple, Vincent et coll. (1994) n'ont pas vu d'effet de Ys chez les hybrides F₂ d'un croisement entre WKY et SHR. On peut donc se demander si les différences précédemment observées, si elles s'avèrent vraies, sont dues à un chromosome Y "anormal" ou à des mutations présentes sur des gènes autosomaux en interaction avec des gènes du chromosome Y. Le chromosome Y, en excluant les régions pseudo-autosomales, ne se recombine pas lors de la méiose. On peut donc s'attendre à une faible diversité génétique en comparaison de celle retrouvée chez les autres chromosomes. Seules des mutations spontanées pourront s'accumuler au court du temps si elles ne sont pas délétères. Ainsi, chez 9 souches de souris consanguines testées, il n'existerait que 2 formes polymorphiques pour l'ADN du chromosome Y (Lamar et Palmer 1984), l'une affectant les taux de testostérone, et l'autre la réponse des organes

cibles (Jutley et Stewart 1985). Ces travaux confirment la faible variabilité génétique soupçonnée du chromosome Y.

Une autre avenue pour mieux cerner le rôle du chromosome Y dans les maladies cardiovasculaires serait d'explorer le rôle des gènes autosomaux possiblement en interactions avec des loci du chromosome Y. À cet effet, il est intéressant de rappeler que des isoformes de plusieurs peptides vasoactifs sont spécifiquement exprimées dans les testicules. Par exemple, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*Angiotensin Converting Enzyme, ACE*) possède une isoforme spécifique dont l'expression testiculaire est dirigée par une région promotrice ignorée par les tissus somatiques (Howard *et al.* 1990). L'ACE testiculaire est 1/2 fois la taille de l'ACE somatique, et ne possède qu'un seul domaine catalytique (El-Dorry *et al.* 1982, Ehlers *et al.* 1989). Son expression étant précisément modulée durant la spermatogenèse, les chercheurs lui attribuent un rôle dans la physiologie de la reproduction (Langford *et al.* 1993). Son importance pour la reproduction a été confirmée dans une expérience de "knock-out" où l'on a introduit des mutations neutralisant les 2 formes de ACE chez la souris (Krege *et al.* 1995). Dans cette expérience, les homozygotes des 2 sexes pour la mutation présentèrent une PA inférieure à la normale allant de pair avec des concentrations réduites d'ACE circulant. Cependant, chez les hétérozygotes, malgré des concentrations réduites d'ACE sanguin similaires chez les 2 sexes, seuls les mâles montrèrent une baisse de la pression artérielle suggérant un rôle de l'ACE testiculaire dans l'homéostasie cardiovasculaire. Finalement, les mâles homozygotes montrèrent aussi une fertilité très réduite, les femelles étant normalement fertiles quel que soit leur génotype. Cette expérience montre bien le rôle de cette isoforme testiculaire d'ACE dans la régulation différentielle de la PA et de la capacité reproductive chez les mâles et les femelles, et pourrait expliquer certains dimorphismes sexuels affectant ces phénotypes.

D'autre part, nous avons montré dans cette thèse que le chromosome Y est un locus déterminant l'expression des *hsp*. Chez les rats WKY^{SHR-Y}, l'expression de

hsp27 est significativement augmentée par 1 heure de stress d'immobilisation, suggérant une interaction entre Ys et *hsp27* (Ely *et al.* 1996), ce que nous avons aussi observé pour *hsp70* (résultats non présentés). Mentionnons que, à l'instar de ACE, *hsp70* possède une isoforme dont l'expression est spécifique au testicule, et qui semble aussi impliquée dans la spermatogenèse (Wisniewski *et al.* 1990). Fait intéressant, l'activation de la transcription de cette isoforme est le fait de HSF2, qui est aussi spécifique au testicule, et dont la température d'activation est de 7° C inférieure à celle de HSF1 qui est somatique (Goodson *et al.* 1995, Sarge 1995).

Des composants majeurs de la réponse au stress et de la régulation de la PA possèdent donc des isoformes dont l'expression est spécifiques au testicule. Si ces isoformes semblent essentiels à la spermatogenèse, on pourrait cependant leur prêter aussi une partie de l'explication du dimorphisme sexuel de la pression artérielle. Par exemple, une mutation permettant à l'expression de l'isoforme testiculaire de ACE d'être exprimée dans les tissus somatiques pourrait expliquer l'action du "*testis-derived factor*" de Ely et de mieux comprendre le dimorphisme sexuel et ses extrêmes (Ys). On peut aussi imaginer que l'expression extra-testiculaire de HSF2 aurait pour conséquence d'abaisser le seuil d'activation de la réponse au stress, ayant pour conséquence une réponse anormalement forte en regard de l'agression environnementale l'ayant causée, mais seulement chez les hommes. Ce serait la démonstration d'une susceptibilité environnementale spécifique aux mâles.

17. IMPORTANCE DES ÉTUDES LONGITUDINALES POUR DÉTERMINER LE LIEN DE CAUSALITÉ ENTRE UN QTL ET UNE PATHOLOGIE

L'hypertension essentielle se caractérise aussi par l'établissement graduel de la maladie au cours de l'âge adulte. Les mécanismes responsables de cette manifestation graduelle sont donc actifs avant même la possibilité de diagnostic de la maladie, compliquant ainsi la recherche de gènes causals, les manifestations phénotypiques observées à l'âge adulte pouvant n'être que consécutives aux anomalies primaires. La plupart des travaux utilisant des croisements ségrégants pour la recherche des gènes de l'hypertension s'effectuent chez des animaux adultes lorsque l'hypertension est bien établie (chez le rat, habituellement 12 semaines, ce qui correspond à la maturité sexuelle). Rares sont donc les expériences où l'on étudie le développement d'une pathologie à différentes périodes. Bien souvent, pour des considérations matérielles légitimes (support financier et espace disponible), les chercheurs ne peuvent se permettre l'étude à différents âges. Ou alors, ce seront des considérations techniques. Par exemple, les animaux sacrifiés pour les besoins du phénotypage qui ne peuvent évidemment plus servir ultérieurement; ou encore, l'étude exclusive des mâles, le cycle menstruel des femelles pouvant affecter les résultats. L'étude simultanée et différentielle des mâles et femelles (parvenant à maturité sexuelle à des âges différents) est aussi rarement envisagée, étant donné les difficultés statistiques de l'analyse résultant de la division par sexe. Dès lors, on se retrouve avec des résultats qui reflètent soit une partie de la réalité (sexes séparés), un mélange (sexes combinés) ou une vision partielle (étude à un seul âge). Ainsi, à cause de la faible puissance statistique (petits groupes, mélanges) les résultats obtenus sont partiels et quelquefois non fiables. Cela, additionné à l'emploi de croisements utilisant une variété de souches hypertendues explique pourquoi les résultats ne sont pas toujours reproductibles, et pourquoi on rapporte des QTLs liés à

l'hypertension sur la quasi-totalité des chromosomes du rat! (voir le Tableau II de la revue de la littérature).

Évidemment, dans une perspective générale de dépistage de tous les locus possibles, cette stratégie est valable, puisqu'elle réduit l'erreur de type II. Il est en effet sans doute préférable d'explorer tous les loci trouvés pour mieux cerner la maladie, quitte à exclure certains faux-positifs en cours de route. Certains auteurs proposent la méta-analyse pour combiner les résultats de plusieurs travaux similaires (Kunz *et al.* 1997, Goffinet et Gerber 2000). Cependant, tous les QTLs ainsi détectés devront être testés, par exemple chez des lignées congéniques, afin de valider leur existence. Dans cette perspective, nous pensons que l'emploi de *lignées ségrégantes* comme les RIS possède un avantage unique. Par l'approche longitudinale d'un phénotype, il est en effet possible de mieux évaluer le lien de causalité que l'on veut attribuer aux QTLs associés et d'exclure les faux positifs. De plus, au-delà de leur utilité pour la découverte de QTLs, ces études effectuées chez l'humain sont essentielles pour leur pouvoir prédictif et pourront avoir un impact considérable afin de cibler les traitements futurs.

Ici, nous avons montré l'existence d'une corrélation significative entre le poids relatif des reins des nouveau-nés et des adultes chez les RIS, et observé que certains QTL suggestifs associés sont communs aux 2 âges de la vie (*D3Mit9*), alors que d'autres le sont à l'âge adulte seulement (chromosome 1, *Rt6*), ou pour la différence phénotypique aux 2 âges (*D1a*, chromosome 17). Chez l'humain, Zureik et coll. (1996) ont trouvé une association significative entre le faible poids à la naissance et la PA systolique chez des sujets âgés entre 8 et 24 ans, la pression systolique étant la plus grande lorsque le poids néonatal était le plus faible. De plus, indépendamment de la PA et ajusté pour des variables confondantes, les auteurs montrèrent que le poids ventriculaire du coeur gauche était augmenté chez les sujets ayant présenté un retard de croissance selon les données obtenues à 9 mois et 2 ans. Chez le rat, Contreras et Oparil (1992) ont clairement montré que l'exposition pré- et postnatale à une diète riche en sodium (8% NaCl) modifie la

sensibilité des récepteurs à l'angiotensine II, et augmente la PA moyenne des femelles devenues adultes (dimorphisme) alors qu'elles sont nourries avec une diète normale (1% NaCl) depuis leur sevrage. Le calcium nutritionnel module aussi le développement de l'hypertension dès le bas-âge (Muntzel *et al.* 1989).

Par ailleurs, sans influence environnementale de la diète, l'établissement graduel de l'hypertension chez SHR induit des modifications quantifiables. Ainsi, Watanabe et coll. (1995) observèrent une diminution graduelle de la constante de dissociation K_d ainsi que de la capacité de liaison maximale B_{max} des récepteurs à dopamine DA_1 du cortex rénal chez SHR entre 3 et 18 semaines. Les témoins normotendus WKY n'ont pas présentés ces modifications. Ces études, comme la nôtre, indiquent donc que l'âge et l'évolution au cours du temps sont des facteurs essentiels à considérer. Un phénotype peut apparaître, disparaître ou se modifier. De même, l'influence d'un génotype sera variable au cours du temps.

Finalement, dans la perspective de la réponse au stress, nous tenons à mentionner un travail démontrant l'importance des soins néonataux dans la future susceptibilité au stress (Liu *et al.* 1997). Il semblerait que, chez le rat, la manipulation quotidienne des nouveau-nés par les chercheurs pendant les 10 premiers jours de vie entraînerait des soins plus attentifs de la mère. Ainsi, chez ces nouveau-nés, l'excès de soins maternel consécutif à la manipulation aurait pour effet de diminuer les taux d'ACTH et de corticostérone circulants lors d'un stress d'immobilisation effectué à l'âge adulte lorsque comparés avec les animaux témoins non manipulés en bas âge. L'expression d'ARNm de CRH est diminuée chez les rats manipulés, et la diminution proportionnelle aux soins prodigués par la mère. Les auteurs ont montré que cette rétro-inhibition de l'expression hypothalamique de CRH par les glucocorticoïdes est essentielle à cette réponse au stress atténuée, et est due à l'augmentation concomitante des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe. La sensibilité à la corticostérone est donc augmentée, requérant des niveaux circulant inférieurs à ce qui est observé chez les témoins. De plus, cette

adaptation en bas âge persiste chez l'adulte (24 à 26 mois), démontrant que la plasticité de ce mécanisme chez les nouveau-nés a des répercussions importantes pour la perception du stress tout au long de la vie.

De même chez l'Homme, personne ne niera l'importance des soins (au sens large) et des expériences vécues durant l'enfance sur le développement futur des traits de personnalité complexes. Liu et coll. (1997) suggèrent que des taux de cortisol inférieurs tout au long de la vie pourraient protéger de la neurodégénération et permettre le maintien des fonctions cognitives supérieures, ayant donc des conséquences importantes sur la longévité et la qualité de vie. Finalement, une des découvertes les plus intéressantes du travail de Liu et coll. est que cette atténuation de la réponse au stress s'observe aussi dans les générations subséquentes issues des animaux "manipulés". Il s'agirait donc dans ce cas particulier d'une transmission non-génomique d'un phénotype acquis! Notons que les résultats de Lindsay et coll. (1996) suggèrent un rôle des taux de glucocorticoïdes "foetoplacentaires" sur le poids à la naissance, et la "programmation" du développement future de l'hypertension, la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase placentaire étant responsable des taux observés. Ces notions aident à comprendre l'hypothèse de transmission non-génomique apparente. Nous croyons que l'étude de tous ces processus, si complexes soient-ils, et des bases génétiques qui les sous-tendent, est possible par l'emploi de *lignées* ségrégantes comme les RIS dans des études longitudinales.

18. ORIGINALITÉ ET IMPORTANCE DES RÉSULTATS

Dans cette thèse, nous avons tenté d'insister sur le fait que la détermination des bases génétiques des maladies complexes, si elle est difficile, n'est pas impossible pour autant que l'on sache ce que l'on étudie. Par exemple, une maladie commune comme l'hypertension a un diagnostic tributaire d'une distribution quantitative (est hypertendu quelqu'un possédant une pression artérielle systolique/diastolique supérieure ou égale à

140/90 mm Hg), reflétant l'implication de plusieurs gènes, leur pléiotropie ainsi que l'effet de l'environnement. Une approche possible pour son étude pourrait consister à disséquer la maladie en phénotypes intermédiaires possiblement monogéniques.

Plus particulièrement, dans notre travail, nous avons disséqué l'effet de l'environnement et voulu montrer que l'influence environnementale n'est pas toujours additive, et qu'il existe des gènes de susceptibilité environnementale ayant un impact variable sur la maladie. Il n'est pas toujours facile de distinguer un gène de prédisposition modulé par l'environnement d'un gène de susceptibilité environnementale ayant aussi un impact sur la maladie. Néanmoins, nous croyons que la distinction est de taille, un gène de susceptibilité environnementale pouvant affecter plusieurs maladies, avoir une action indépendante ou être en interaction avec d'autres gènes. Afin d'être en mesure de faire ces distinctions, nous avons insisté sur l'importance de bien définir le phénotype à l'étude. Dans le cas des gènes de susceptibilité environnementale, nous avons montré qu'il est essentiel de changer l'environnement afin d'augmenter la variance phénotypique pour mesurer leur contribution au phénotype à l'étude. Ainsi, pour un même stress d'immobilisation, les différentes lignées RIS ont répondu différemment, que ce soit pour T20 ou dans l'expression des gènes de stress. De même, le jeûne de 36 heures imposé aux animaux pour les collections urinaires nous a permis de mettre en évidence des profils de distribution prononcés impossible à observer à l'état basal. Finalement, dans une étude longitudinale, nous avons montré que les lignées RIS permettent la recherche des déterminants génétiques responsables de l'apparition, de l'établissement et du maintien d'une maladie.

Notre travail nous permet donc de proposer une approche systématique permettant de déterminer et distinguer les différentes composantes génétiques possiblement en jeu dans les maladies complexes. (Voir le Tableau VII).

TABLEAU VII

**Approche systématique proposée pour la dissection génétique
d'une maladie complexe.**

•Définition: Pathologie = G + E + (G×E)

(avec G=gènes; E=environnement)

1. Définir la pathologie et/ou le phénotype à l'étude

2. Définir l'environnement

•Rechercher les loci impliqués à plusieurs âges (étude longitudinale)

4. Changer l'environnement de façon à augmenter la variance génétique

•Rechercher les loci impliqués à plusieurs âges (étude longitudinale)

6. Recommencer la recherche de loci dans tous les environnements désirés

7. Recommencer ces étapes avec tous les phénotypes possiblement impliqués dans la maladie.

Nous croyons que chez l'animal, cette approche sous plusieurs environnements, doublée de l'emploi de plusieurs modèles génétiques devrait permettre de trouver tous les gènes causals impliqués. Il devient possible de distinguer la contribution additive de l'environnement de son interaction avec les gènes de susceptibilité. Nous montrons finalement que les études longitudinales permettent de suivre l'influence de l'environnement et le rôle des gènes causals au cours du temps, et aussi d'éliminer les faux positifs.

Ces distinctions ne sont pas qu'académiques. En effet, le raffinement requis pour effectuer ces études se transpose dans le traitement personnalisé du patient en fonction de la "saveur" de la maladie propre à chacun. Mentionnons le travail de Vincent et coll. (1997) qui ont mesuré la pression artérielle *en réponse* à un antagoniste des canaux calciques dans un rétro-croisement entre rats Lyon hypertendus et normotendus. Notons que leur phénotype (PA) n'est pas "général", mais bien *en réponse* à l'action du médicaments. Leur expérience a ainsi permis de mettre en lumière un locus de réponse aux bloqueurs des canaux calciques (sur le chromosome 2) responsable de l'action plus ou moins efficace du médicament. Cette approche pharmacogénétique permettra donc de distinguer les patients qui peuvent le plus bénéficier de médicaments spécifiques, tout en permettant probablement de réduire la posologie étant donné l'efficacité élevée chez les sujets répondeurs.

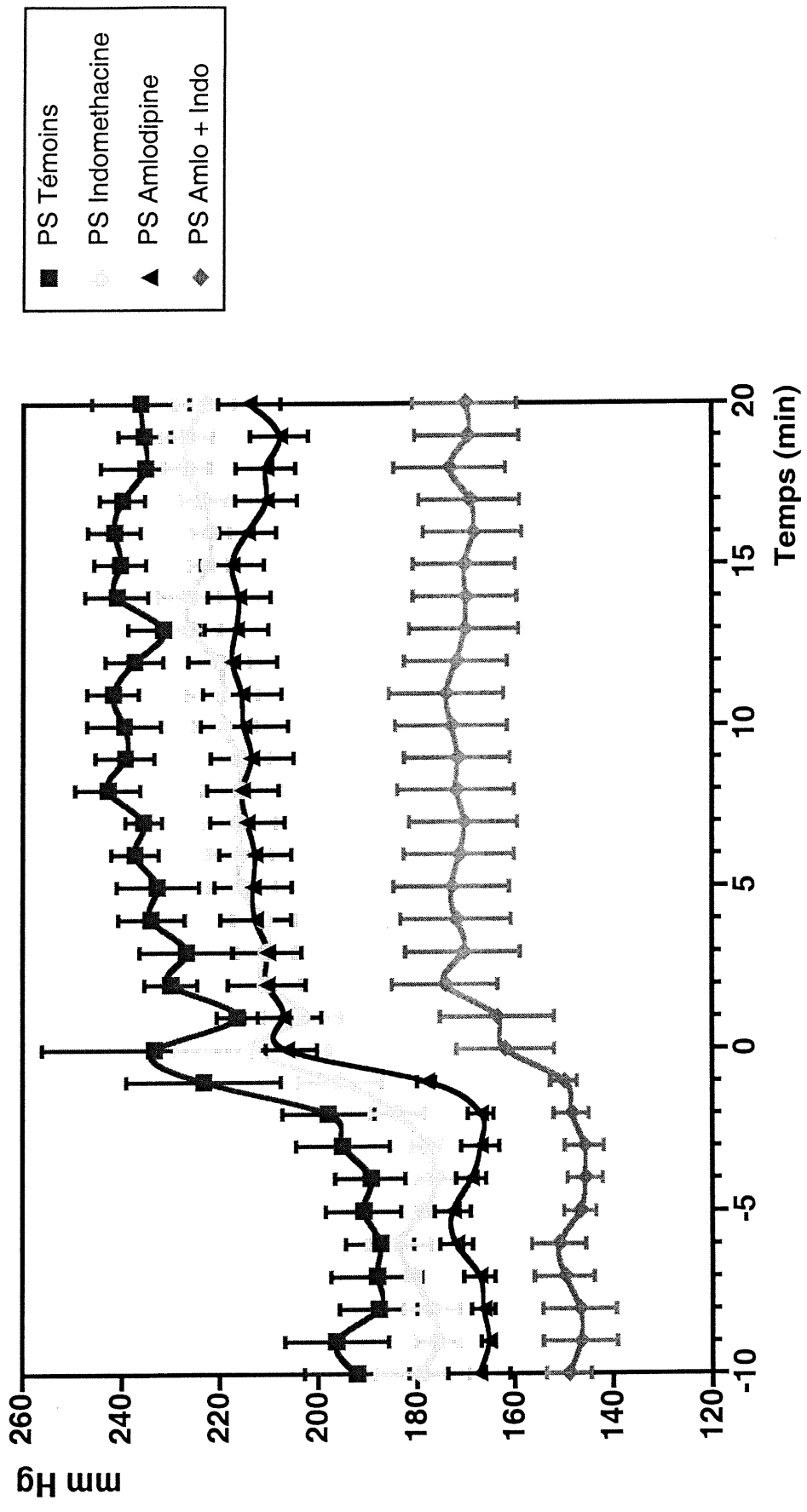
La pharmacogénétique permettra ainsi d'optimiser le traitement en fonction des "sous-types" de maladies. Par exemple, dans le traitement de l'hypertension, on étudie de plus en plus les variations de la PA (rythme circadien, PA lors du stress, effet de la diète...), et l'effet des médications sur celles-ci. Plusieurs chercheurs se sont demandé si les médicaments actuels protégeaient les patients dans ces situations de la vie quotidienne qui sont souvent loin des conditions standardisées des protocoles de recherches cliniques. Par exemple, on s'intéresse maintenant à l'effet à long terme des médicaments sur la réponse au stress dans l'hypertension (Kahan et Eliasson 1999). Les différentes classes

de médicaments sont aussi comparées dans ces conditions, de même que les médicaments d'un même groupe. Fauvel et coll. (1994) ont ainsi montré qu'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Lisinopril) pouvait prévenir la rétention sodique induite par le stress. Cependant, chez les sujets qui excrètent le sodium lors du stress (voir plus haut), un autre inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Captopril) provoqua une rétention de sodium et de potassium (Rollnik *et al.* 1995). Le Captopril augmenta la réponse de PA lors du stress chez les excréteurs, qui était préalablement inférieure à celle des non-excréteurs, leur faisant ainsi perdre un "avantage" pouvant avoir des répercussions importantes à long terme. Donc, à l'intérieur d'une même classe de médicaments, des différences importantes peuvent se manifester selon le phénotype étudié. Cependant, ces différences ne sont pas propres aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; on rapporte aussi des variations dans l'action des bloqueurs des canaux calciques (Nazzaro *et al.* 1995) et dans l'action des β -bloquants (Takita *et al.* 1995) sur la réponse au stress. Connaissant les différences dans l'action des médicaments, il s'agira ensuite d'identifier les patients pouvant bénéficier de ces résultats.

Quelques expériences effectuées par radio-téléométrie chez le rat nous ont d'ailleurs permis de confirmer ces résultats et de constater que l'effet des différentes classes d'agents antihypertenseurs n'agissent pas toutes de la même façon lors du stress. La téléométrie est, selon nous, une technologie prometteuse pour l'approche longitudinale de même que pour la pharmacogénétique étant donné la précision des enregistrements, et l'acquisition continue des données en conditions contrôlées (Brockway *et al.* 1991). La Figure V montre un exemple des résultats obtenus chez le rat SHR soumis à un stress d'immobilisation. La téléométrie nous a ici permis d'observer une interaction entre l'Amlodipine et l'indométhacine. Des travaux similaires sur des lignées ségréantes seront nécessaires afin de déterminer les locus responsables de cette réponse (*i.e.* pharmacogénétique) en plus de nous renseigner sur les mécanismes en jeu.

FIGURE V

**Pharmacogénétique, pression artérielle systolique chez SHR
par télémetrie**



19. CONCLUSIONS ET COMMENTAIRES GÉNÉRAUX

Dans cette thèse, nous avons voulu montrer l'importance de l'effet de l'environnement et du temps sur l'expression phénotypique. Nous avons ainsi pu mettre en lumière l'existence de locus de susceptibilités environnementales et d'autres dont l'action varie en fonction du temps. Au-delà des spécificités de cette thèse, nous tenons encore à souligner l'importance d'aborder un phénotype sous tous ses angles, à le "disséquer" si possible, afin de mieux l'intégrer au tableau pathophysiologique. Plusieurs chercheurs ont maintenant cette "déformation", qui leur fait regarder la maladie sous un autre jour. Par exemple, on étudie maintenant la pression pulsatile (*pulse pressure*) et non plus seulement les pressions systolique et diastolique. En effet, cette différence entre la PA systolique et diastolique peut avoir un impact indépendant sur le développement de la rigidité artérielle ou sur le travail cardiaque que les composantes individuelles de la PA ne pourront pas montrer. Ainsi, Benetos et coll. (1997) ont observé que la pression pulsatile était prédictrice de la mortalité cardiovasculaire à long terme chez les hommes alors que Verdecchia et coll. (1998) ont montré son pouvoir de prédiction du risque cardiovasculaire général.

Cette recherche du phénotype "simple" et informatif doit refléter notre compréhension de la physiologie, et est fonction des limites actuelles de la science médicale. Comme nous avons voulu le montrer, on ne peut rechercher simultanément tous les QTLs impliqués dans une maladie complexe à cause de la définition souvent trop large de la maladie, de la pléiotropie des QTLs, des effets individuels très faibles, de l'expression variable au cours du temps et des influences environnementales. Nous avons proposé une approche qui pourrait peut-être résoudre ces problèmes.

Cependant, il faut souligner le danger de poursuivre inlassablement cette approche réductionniste qui est d'oublier la complexité du système, et de croire que la somme des gènes et QTLs ainsi trouvés pourra un jour nous fournir un portrait adéquat de toutes les

pathologies (ou d'un organisme!). En effet, ce n'est pas parce que l'on possède toutes les pièces du casse-tête que l'on peut présumer de l'aspect de l'image complète. Mentionnons le texte de Hutter (2000) où l'auteur souligne avec justesse le prix de l'arrogance scientifique qui a empêché pendant 35 ans Gregor Mendel de recevoir le mérite qui lui revenait, ou qui a fait que Barbara McClintock ait dû attendre 20 ans pour être récompensée du prix Nobel pour sa découverte des gènes "sauteurs". L'auteur souligne le danger de toujours regarder de façon linéaire la relation de causalité entre les gènes et leurs effets, et rappelle qu'il n'y a pas de corrélation entre le nombre de gènes et la complexité d'un organisme. Sommes-nous seulement 4 fois plus complexe que *Caenorhabditis elegans* qui possède 19 758 gènes? Force est de convenir que le tout est souvent plus que la somme des parties, et que ce n'est pas toujours par facilité que l'on doit reconnaître que la complexité d'un système nous dépasse.

À l'appui de ce que nous avançons, mentionnons le travail de Waxman et Peck (1998) qui ont cherché à modéliser les effets d'une mutation pléiotropique. Ils rappellent que certaines protéines n'ont apparemment pas changé depuis 100 millions d'année, ce qui suggère l'existence de séquences optimales ou de "mutations" stabilisatrices. On observe cette absence de variation chez les populations restreintes ou lors d'une dérive génétique. Les auteurs démontrent cependant que, dans une grande population, dès qu'une mutation affecte 3 phénotypes ou plus, la variation est supprimée en faveur d'une séquence optimale, et ce, même lorsque des mutations ayant un faible effet sont fréquentes. Dans la réalité, si cette modélisation se vérifie, cela signifie que pour des systèmes redondants et pléiotropiques comme le système cardiovasculaire, aucune mutation ayant un effet majeur ne pourrait exister. L'hypertension essentielle serait-elle autant variée que le nombre de patients atteints? On peut en effet imaginer qu'à part les cas d'hypertension monogéniques ou les probables sous-populations où l'on trouverait un effet fondateur, toutes les autres "saveurs" d'hypertension seraient en fait le résultat de combinaisons différentes d'une multitude de petites variations de plusieurs gènes.

Enfin, pour venir encore compliquer la dissection génétique des maladies communes, notons les cas d'hérédités non mendéliennes souvent reliés à l'empreinte génétique. Par exemple, la "surdominance polarisée" (*polar overdominance*) où seuls les individus hétérozygotes ayant hérité l'allèle muté du père *ou* de la mère (surdominance) présentent le phénotype anormal (Cockett *et al.* 1996; dans cet article, le gène dominant muté est exprimé chez les hétérozygotes l'ayant hérité du père). Ou alors, les "épimutations", des mutations qui seraient responsables du changement de l'expression d'un gène sans changement de la séquence du gène (Junien 2000). Les épimutations pourraient être transmissibles sur plusieurs générations et réversibles! Plusieurs observations permettent de montrer l'existence des épimutations, et expliqueraient les effets multigénérationnels persistant en absence de stimulus, le stress originel ayant été subis par des individus de générations passées. Cette transmission transgénérationnelle de caractères acquis ferait ainsi revivre une sorte de lamarckisme... (Junien 2000).

En dépit de ces difficultés supposées ou avérées, nous pensons que la médecine génétique de l'avenir devra essayer de comprendre les interactions entre toutes ces "micro-variations" et leurs modulations par l'environnement afin de proposer des traitements personnalisés appropriés. Heureusement, plusieurs avenues s'offrent déjà pour l'analyse de la complexité du vivant grâce aux progrès accomplies dans la modélisation mathématique des systèmes physiques. De plus, si nous devons nous résigner à ne pas pouvoir trouver "les gènes de l'hypertension", nous avons maintenant les moyens d'étudier le génome dans son ensemble dans divers contextes par l'expression de plusieurs milliers de gènes simultanément (puce à ADN ou *microarrays*) afin de découvrir les différences individuelles d'un métabolisme donné et mieux caractériser les multiples "micromodulations pathologiques" (Lee et Hudson 2000).

L'emploi de modèles animaux et de lignées ségrégantes, combiné aux nouvelles technologies et aux études longitudinales sous plusieurs environnements nous permettront d'atteindre cet objectif, soit une meilleure compréhension des maladies communes, pour de meilleurs diagnostics et traitements. La démarche, si elle semble compliquée et multifactorielle, n'est cependant que le reflet de la nature complexe des phénomènes en jeu. Par cette thèse, nous espérons avoir pu contribuer à l'édifice de la génomique, ou du moins avoir pu aider à mettre en lumière quelques subtilités caractérisant les interactions entre l'environnement et le génome.

BIBLIOGRAPHIE

- Aitman TJ, Gotoda T, Evans AL, Imrie H, Heath KE, Trembling PM, Truman H, Wallace CA, Rahman A, Doré C, Flint J, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M, Scott J: Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 1997;16:197-201.
- Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J: Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 1999;21:76-83.
- Alexander F: Emotional factors in essential hypertension. Presentation of a tentative hypothesis. *Psychosom Med* 1939;1:173-179.
- Allen MT, Matthews KA, Sherman FS: Cardiovascular reactivity to stress and left ventricular mass in youth. *Hypertension* 1997;30:782-787.
- Allison DB, Faith MS, Nathan JS: Risch's lambda values for human obesity. *Int J Obes* 1996;20:990-999.
- Anderson EA, Mahoney LT, Lauer RM, Clarke WR: Enhanced forearm blood flow during mental stress in children of hypertensive parents. *Hypertension* 1987;10:544-549.
- Anderson DE, Dietz JR, Murphy P: Behavioural hypertension in sodium-loaded dogs is accompanied by sustained sodium retention. *J Hypertens* 1987;5:99-105.
- Arad Z, Skadhauge E: Body temperature and plasma arginine vasotocin in fowls adapted to high- and low-NaCl diets. *Br Poultry Sci* 1986;27:115-121.
- Badgaiyan RD, Mandal MB: Centrally infused anions alter body temperature in conscious rats. *Brain Res Bull* 1995;38:331-336.
- Bailey DW: Recombinant inbred strains, an aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes. *Transplantation* 1971;11:325-327.
- Bailey DW: Recombinant inbred strains and bilineal congenic strains. In: The mouse in biomedical research. Vol 1, pp 223-239. New York, Academic Press (1981).

- Baima J, Nicolaou M, Schwartz F, DeStefano AL, Manolis A, Gavras I, Laffer C, Elijovich F, Farrer L, Baldwin CT, Gavras H: Evidence for linkage between essential hypertension and a putative locus on human chromosome 17. *Hypertension* 1999;34:4-7.
- Baldwin CT, Schwartz F, Baima J, Burzstyn M, DeStefano AL, Gavras I, Handy DE, Joost O, Martel T, Manolis A, Nicolaou M, Bresnahan M, Farrer L, Gavras H: Identification of a polymorphic glutamic acid stretch in the alpha2B-adrenergic receptor and lack of linkage with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1999;12:853-85.
- Barley J, Carter ND, Cruickshank S, Jeffery S, Smith A, Charlett A, Webb DJ: Renin and atrial natriuretic peptide restriction fragment length polymorphisms: association with ethnicity and blood pressure. *J Hypertens* 1991;9:993-996.
- Belknap JK, Metten P, Helms ML, O'Toole LA, Angeli-Gade S, Crabbe JC, Phillips TJ: Quantitative trait loci (QTL) applications to substances of abuse: Physical dependence studies with nitrous oxide and ethanol in BxD mice. *Behav Genet* 1993;23:213-222.
- Belknap JK: Effect of within-strain sample size on QTL detection and mapping using recombinant inbred mouse strains. *Behav Genet* 1998;28:29-38.
- Benetos A, Safar M, Rudnichi A, Smulyan H, Richard J-L, Ducimetière P, Guize L: Pulse pressure: A predictor of long-term cardiovascular mortality in a french male population. *Hypertension* 1997;30:1410-1415.
- Benjafeld AV, Jeyasingam CL, Nyholt DR, Griffiths LR, Morris BJ: G-protein $\beta 3$ subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:094-1097.
- Benjafeld AV, Morris BJ: Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2000;13:994-998.
- Bensi N, Bertuzzi M, Armario A, Gauna HF: Chronic immobilization stress reduces sodium intake and renal excretion in rats. *Physiol Behav* 1997;62:1391-1396.

- Berkey DL, Meeuwsen KW, Barney CC: Measurement of core temperature in spontaneously hypertensive rats by radiotelemetry. *Am J Physiol* 1990;258:R743-R749.
- Bernard C: Introduction à la médecine expérimentale. Garnier-Flammarion Éds, Paris p 49 (1966).
- Bianchi G, Tripodi G, Casari G, Salardi S, Barber BR, Garcia R, Leoni P, Torielli L, Cusi D, Ferrandi M: Two point mutations within adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3999-4003.
- Blake MJ, Udelsman R, Feulner GJ, Norton DD, Holbrook NJ: Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:9873-9877.
- Blake MJ, Buckley DJ, Buckley AR: Dopaminergic regulation of heat shock protein-70 expression in adrenal gland and aorta. *Endocrinology* 1993;132(3):1063-1070.
- Blake MJ, Klevay LM, Halas ES, Bode AM: Blood pressure and heat shock protein expression in response to acute and chronic stress. *Hypertension* 1995;25:539-544.
- Blizard DA, Morris M: Acute stress increases plasma concentrations of atrial natriuretic peptides. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;184:123-126.
- Boe J, Humerfelt S, Wedervang F: The blood pressure in a population. *Acta Med Scand* 1957;321(suppl):1-336.
- de Bold AJ, Ma KK, Zhang Y, de Bold ML, Bensimon M, Khoshbaten A: The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:705-714.
- Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994;24:63-69.
- Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F: Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 1995;91:96-102.

- Bottger A, van Lith HA, Kren V, Krenova D, Bila V, Vorlicek J, Zidek V, Musilova A, Zdobinska M, Wang J-M, van Zutphen BFM, Kurtz TW, Pravenec M: Quantitative trait loci influencing cholesterol and phospholipid phenotypes map to chromosomes that contain genes regulating blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest* 1996;98:856-862
- Bottger A, Lankhorst E, van Lith HA, van Zutphen LF, Zidek V, Musilova A, Simakova M, Poledne R, Bila V, Kren V, Pravenec M: A genetic and correlation analysis of liver cholesterol concentration in rat recombinant inbred strains fed a high cholesterol diet. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:272-275.
- Bouchard C, Pérusse L, Leblanc C, Tremblay A, Thériault G: Inheritance of the amount and distribution of human body fat. *Int J Obes* 1988;12:205-215.
- Bourjeili N, Turner M, Stinner J, Ely D: Sympathetic nervous system influences salt appetite in four strains of rats. *Physiol Behav* 1995;58:437-443.
- Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Citterio L, Connell J, Grobbee D, Schmidt S, Schunkert H, Schuster H, Sharma AM, Soubrier F: Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension; a European study. *Hypertension* 1998a;31:725-729.
- Brand E, Chatelain N, Mulatero P, Féry I, Curnow K, Jeunemaitre X, Corvol P, Pascoe L, Soubrier F: Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 1998b;32:198-204.
- Brand E, Herrmann S-M, Nicaud V, Ruidavets J-B, Evans A, Arveiler D, Luc G, Plouin P-F, Tiret L, Cambien F: The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit $\beta 3$ is not related to hypertension. *Hypertension* 1999;33:1175-1178.
- Brennan PJ, Greenberg G, Miall WE, Thompson SG: Seasonal variation in blood pressure. *Br Med J* 1982;285:919-923.
- Briese E, De Quijada MG: Colonic temperature of rats during handling. *Acta Physiol Latinoam* 1970;20:97-102.

- Brockway BP, Mills PA, Azar SH: A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry. *Clin Exp Hypertens* 1991;A13:885-895.
- Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, Lander ES, Jacob HJ: Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nat Genet* 1996, 12:44-51.
- Busjahn A, Knoblauch H, Knoblauch M, Bohlender J, Menz M, Faulhaber HD, Becker A, Schuster H, Luft FC: Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms, plasma levels, cardiac dimensions. A twin study. *Hypertension* 1997;29:165-170.
- Burke W, Motulsky AG. Hypertension. In : King RA, Rotter JJ, Motulsky AG eds. *The Genetic Basis of Human Diseases*. New York, NY: Oxford University Press;1992:170-191.
- Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Path MRC, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJL: Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med* 1994, 330:1629-1633.
- Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty P, Clark AJL: Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest* 1995, 96:687-692.
- Chen A, Grigor MR, Thompson CM, Harris EL: Kallikrein binding protein (KBP) maps to rat chromosome 6 but does not cosegregate with blood pressure in a GH x BN cross. *Mamm Genome* 1997;8:701-703.
- Chen Y-F, Naftilan AJ, Oparil S: Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:456-463.
- Chrousos GP, Gold PW: The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992;267:1244-1252.

- Churchill PC, Churchill MC, Bidani AK, Griffin KA, Picken M, Pravenec M, Kren V, St-Lezin E, Wang J-M, Wang M, Kurtz TW: Genetic susceptibility to hypertension-induced renal damage in the rat: evidence based on kidney specific genome transfer. *J Clin Invest* 1997;100:1373-1382.
- Cicila GT, Rapp JP, Wang JM, St-Lezin E, Ng SC, Kurtz TW: Linkage of 11 β -hydroxylase mutations with altered steroid biosynthesis and blood pressure in the Dahl rat. *Nat Genet* 1993;3:346-353.
- Cicila GT, Rapp JP, Bloch KD, Kurtz TW, Pravenec M, Kren V, Hong CC, Quertermous T, Ng SC: Cosegregation of the endothelin-3 locus with blood pressure and relative heart weight in inbred Dahl rats. *J Hypertens* 1994;12:643-651.
- Clark JS, Jeffs B, Davidson AO, Lee WK, Anderson NH, Bihoreau MT, Brosnan MJ, Devlin AM, Kelman AW, Lindpainter K, Dominiczak AF: Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension* 1996;28:898-906.
- Cobb S, Rose RM: Hypertension, peptic ulcer, and diabetes in air traffic controllers. *JAMA* 1973;224:489-492.
- Cockett NE, Jackson SP, Shay TL, Farnir F, Berghmans S, Snowden GD, Nielsen DM, Georges M: Polar overdominance at the ovine *callipyge* locus. *Science* 1996;273:236-238.
- Contreras RJ, Oparil S: Sex difference in blood pressure of spontaneously hypertensive rats influenced by perinatal NaCl exposure. *Physiol Behav* 1992;51:449-455.
- Cooper RS, Kaufman JS: Race and hypertension. Science and nescience. *Hypertension* 1998;32:813-816.
- Crabbe JC, Kosobud A, Young ER, Janowsky JS: Polygenic and single gene determination of responses to ethanol in BxD/Ty recombinant inbred mouse strains. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1983;5:181-187.

- Curwen M: Excess Winter mortality: a British phenomenon? *Health Trends* 1991;22:169-175.
- Curwen M et Devis T: Winter mortality, temperature and influenza: has the relationship changed in recent years? *Population Trends* 1988;54:17-20.
- Daniel HI, Munroe PB, Kamdar SM, Lawson M, Lavender P, Forgaty P, Caulfield MJ: The atrial natriuretic peptide gene and essential hypertension in African-Caribbeans from St-Vincent and the Grenadines. *J Hum Hypertens* 1997;11:113-117.
- Davidson AO, Schork N, Jaques BC, Kelman AW, Sutcliffe RG, Reid JL, Dominiczak AF: Blood pressure in genetically hypertensive rats. Influence of the Y chromosome. *Hypertension* 1995;26:452-459.
- Denbow DM, Edens FW: Effects of intraventricular injections of sodium and calcium on body temperature in the chicken. *Am J Physiol* 1980;239:R62-R65.
- Deng Y, Rapp JP: Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nat Genet* 1992;1:267-272.
- Deng AY, Dene H, Rapp JP: Mapping of a quantitative trait locus for blood pressure on rat chromosome 2. *J Clin Invest* 1994a;94:431-436.
- Deng AY, Rapp JP: Evaluation of the angiotensin II receptor AT1B gene as a candidate gene for a blood pressure. *J Hypertens* 1994b;12:1001-1006.
- Deng AY, Dene H, Pravenec M, Rapp JP: Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes. *J Clin Invest* 1994c;93:2701-2709.
- Deng AY, Rapp JP: Locus for the inducible, but not a constitutive, nitric oxide synthase cosegregates with blood pressure in the Dahl salt-sensitive rat. *J Clin Invest* 1995;95:2170-2177.
- Deng AY, Dene H, Rapp JP: Congenic strains for the blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 2. *Hypertension* 1997a;30[part 1]:199-202.

- Deng AY, Rapp JP: Absence of linkage for (endothelial) nitric oxide synthase locus to blood pressure in Dahl rats. *Hypertension* 1997b;29:49-52.
- Diabetes Epidemiology Research International Group: Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1988;37:1113-1119.
- DiBona GF, Jones SY: Acute environmental stress overrides cardiac volume receptor reflex in borderline hypertensive rats. *J Hypertens* 1995;13:63-68.
- Diez J, Fortuno MA, Zalba G, Etayo JC, Fortuno A, Ravassa S, Beaumont J: Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur Heart J* 1998;19:G29-G33.
- Dilman WH, Mehta HB, Barrieux A, Guth BD, Neeley WE, Ross Jr J: Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress protein 71. *Circ Res* 1986;59:110-114.
- Ditto B, Miller SB: Forearm blood flow responses of offspring of hypertensives to an extended stress task. *Hypertension* 1989;13:181-187.
- Dobesová Z, Zicha J, Kunes J: Newborn organ weight and spontaneous hypertension: recombinant inbred strain study. *Clin Exp Hypert* 1997;19:403-415.
- Doerge RW, Churchill GA: Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 1996; 142:285-294.
- Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FLJ, Welch WJ, Wolfe CL: Heat shock protein induction in rat hearts: a role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 1992;85:769-778.
- Dubay C, Vincent M, Samani NJ, Hilbert P, Kaiser MA, Beressi JP, Kotelevtsev Y, Beckmann JS, Soubrier F, Sassard J, Lathrop GM: Genetic determinants of diastolic and pulse pressure map to different loci in Lyon hypertensive rats. *Nat Genet* 1993;3:354-357.

- Dukhanina OI, Dene H, Deng AY, Choi CR, Hoebee B, Rapp JP: Linkage map and congenic strains to localize blood pressure QTL on rat chromosome 10. *Mammalian Genome* 1997;8:229-235.
- Dumas P, Tremblay J, Hamet P: Stress modulation by electrolytes in salt-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Am J Med Sci* 1994;307:S130-S137.
- Dumas P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 2000;35:568-573.
- Dumas P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Mapping of quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 2000a;18:545-551.
- Dumas P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolytes excretion. *J Hypertens* 2001;in press.
- Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF: Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7741-7745.
- El-Dorry HA, Bull HG, Iwata K, Thornberry NA, Cordes EH, Soffer RL: Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *J Biol Chem* 1982;257:14128-14133.
- Ellis RJ: Molecular chaperones. *Semin Cell Biol* 1990;1:1-72.
- Ely DL, Weigand J: Stress and high sodium effects on blood pressure and brain catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypert* 1983;A5:1559-1587.
- Ely DL, Turner ME: Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension* 1990;16:277-281.

- Ely DL, Salisbury R, Hadi D, Turner M, Johnson ML: Androgen receptor and the testes influence hypertension in a hybrid rat model. *Hypertension* 1991;17:1104-1110.
- Ely DL, Daneshvar H, Turner ME, Johnson ML, Salisbury RL: The hypertensive Y chromosome elevates blood pressure in F₁₁ normotensive rats. *Hypertension* 1993;21:1071-1075.
- Ely D, Caplea A, Dunphy G, Turner M, Takiyyuddin M, Tremblay J, Hamet P: Interaction of the Y chromosome, heat shock protein and sympathetic nervous system. *in Stress: Molecular genetic and neurobiological advances*. R McCarty, G Aguilera, E Sabban, R Kvetnansky Eds. New York, Gordon and Breach Science, 1996.
- Ely D, Caplea A, Dunphy G, Daneshvar H, Turner M, Milsted A, Takiyyudin M: Spontaneously hypertensive rat Y chromosome increases indexes of sympathetic nervous system activity. *Hypertension* 1997;29:613-618.
- Falconer DS: Introduction to quantitative genetics. New York: Ronald Press Company, Chapitre 10, pp 165-185. (1960)
- Falkner B, Onesti G, Angelakos ET, Fernandes M, Langman C: Cardiovascular response to mental stress in normal adolescents with hypertensive parents: hemodynamics and mental stress in adolescents. *Hypertension* 1979;1:23-30.
- Falkner B, Kushner H, Onesti G, Angelakos ET: Cardiovascular characteristics in adolescents who develop essential hypertension. *Hypertension* 1981a;3:521-527.
- Falkner B, Onesti G, Angelakos E: Effect of salt loading on the cardiovascular response to stress in adolescents. *Hypertension* 1981b;3:II195-II199.
- Falkner B, Kushner H: Race differences in stress-induced reactivity in young adults. *Health Psycho* 1989;8:613-627.
- Fauvel JP, Laville M, Bernard N, Hadj-Aïssa A, Daoud S, Thibout E, Pozet N, Zech P: Effects of Lisinopril on stress-induced peak blood pressure and sodium excretion: a double-blind controlled study. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23:227-231.

- Ferrara LA, Mancini M, De Simone G, Turco S, Iovine C, Marotta T, Mainenti G, Mancini M: Responses of serum insulin and blood pressure to cold and handgrip in obese patients. *Int J Cardiol* 1991;32:353-360.
- Flint J, Corley R, DeFries JC, Fulker DW, Gray JA, Miller S, Collins AC: A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science* 1995;169:1432-1435.
- Folkow B: Central neuro-humoral mechanisms in spontaneously hypertensive rats as compared with human essential hypertension. *Clin Sci Mol Med* 1975;48:205s-214s.
- Folkow B: Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* 1982;62:347-504.
- Fortin A, Diez E, Rochefort D, Laroche L, Malo D, Rouleau GA, Gros P, Skamene E: Recombinant congenic strains derived from A/J and C57BL/6J: a tool for genetic dissection of complex traits. *Genomics* 2001;74:21-35.
- Fredrikson M, Matthews KA: Cardiovascular responses to behavioral stress and hypertension: a meta-analytic review. *Ann Behav Med* 1990;12:30-39.
- Friedman R, Dahl LK: Psychic and genetic factors in the etiology of hypertension. *Dans: Stress and the heart*. D Wheatley Ed; Raven Press; New York 1977:137-156.
- Frossard PM, Lestringant GG, Malloy MJ, Kane JP: Human renin gene BgII dimorphism associated with hypertension in two independent populations. *Clin Genet* 1999;56:428-433.
- Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Hamada Y, Kamide K, Rakugi H, Higaki J, Murakami H, Shimamoto K, Ogihara T: Trp64Arg mutation of β_3 -adrenergic receptor in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10:101-105.
- Galderisi M, Celentano A, Tammaro P, Mureddu GF, Garofalo M, de Simone G, de Divitiis O: Ambulatory blood pressure monitoring in offspring of hypertensive patients. Relation to left ventricular structure and function. *Am J Hypertens* 1993;6:114-120.

- Gavras I, Gavras H: Role of vasopressin in hypertensive disorders. *In: Laragh JH, Brenner BM, Eds. Hypertension. Pathophysiology, diagnosis and management.* Raven Press, New York. pp. 789-800;1995.
- Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FTF, Sigler PB, Lifton RP: Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 2000;289:119-123.
- Gelman R, Watson A, Bronson R, Yunis E: Murine chromosomal regions correlated with longevity. *Genetics* 1988;118:693-704.
- Gerbase-DeLima M, DeLima JG, Persoli LB, Bernardes Silva H, Marcondes M, Bellotti G: Essential hypertension and histocompatibility antigens. A linkage study. *Hypertension* 1989;14:604-609.
- Giacconi S, Ghione S, Palombo C, Genovesi-Ebert A, Marabotti C, Fommei E, Donato L: Seasonal influences on blood pressure in high normal to mild hypertensive range. *Hypertension* 1989;14:22-27.
- Ginn DI, Baptista CA, Alam KY, Deng AY, Dene H, Le H, Kurtz TW, Rapp JP: Genetic analysis of α_2 -adrenergic receptors and blood pressure using Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 1994;12:357-365.
- Glenn CL, Wang WYS, Morris BJ: Different frequencies of inducible nitric oxide synthase genotypes in older hypertensives. *Hypertension* 1999;33:927-932.
- Glenn CL, Wang WYS, Benjafield AV, Morris BJ: Linkage and association of tumor necrosis factor receptor 2 locus with hypertension, hypercholesterolemia and plasma shed receptor. *Hum Mol Genet* 2000;9:1943-1949.
- Goffinet B, Gerber S: Quantitative trait loci: A meta-analysis. *Genetics* 2000;155:463-473.
- Gollnick PD, Iannuzzo CD: Colonic temperature response of rats during exercise. *J Appl Physiol* 1968;24:747-750.

- Gong G, Dobin A, McArdle S, Sun L, Johnson ML, Pettinger WA: Sex influence on renal α_2 -adrenergic receptor density in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1994;23:607-612.
- Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD: Tissue-dependent expression of heat-shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol Cell Biol* 1995;15:5288-5293.
- Gora-Maslak G, McClearn GE, Crabbe JC, Phillips TJ, Belknap JK, Plomin R: Use of recombinant inbred strains to identify quantitative trait loci in psychopharmacology. *Psychopharmacology* 1991;104:413-424.
- Gordon T: Blood pressure of adults by race and area, United States 1960-62. *Vital Health Stat* 1964;11:1-20.
- Gosse P, Promax H, Durandet P, Clementy J: White coat hypertension: no harm for the heart. *Hypertension* 1993;22:766-770.
- Grunder S, Zagato L, Yagil C, Yagil Y, Sassard J, Rossier BC: Polymorphisms in the carboxy-terminus of the epithelial sodium channel in rat models for hypertension. *J Hypertens* 1997, 15:173-179.
- Gu L, Dene H, Deng AY, Hoebee B, Bihoreau MT, James M, Rapp JP: Genetic mapping of two blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 1. *J Clin Invest* 1996, 97:777-788.
- Gutmann MC, Benson A: Interaction of environmental factors and systemic blood pressure. A review. *Medicine* 1971;50:543-550.
- Guyton AC, Hall JE, Coleman TG, Manning RD Jr, Norman RA Jr: The dominant role of the kidneys in long-term arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. In: Laragh JH, Brenner BM, Eds. *Hypertension. Pathophysiology, diagnosis and management*. Raven Press, New York. pp. 1311-1326;1995.
- Hadrava V, Tremblay J, Hamet P: Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1989;13:589-597.

- Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Walter SV, Wen YI: Primary versus secondary events in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63:380-386.
- Hamet P, Malo D, Tremblay J: Increased transcription of a major stress gene in spontaneously hypertensive mice. *Hypertension* 1990;15:904-908.
- Hamet P, Malo D, Hashimoto T, Tremblay J: Heat stress genes in hypertension. *J Hypertens* 1990a;8:S47-S52.
- Hamet P, Malo D, Tremblay J: Genetic basis of increased sensitivity to environmental stress in hypertension. *Methods Achiev Exp Pathol* 1991;15:27-46.
- Hamet P, Kong D, Pravenec M, Kunes J, Kren V, Klir P, Sun YL, Tremblay J: Restriction fragment length polymorphism of *hsp70* gene, localized in the RT1 complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:611-614.
- Hamet P, Sun YL, Malo D, Kong D, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Dumas P, Richard L, Gagnon F, Tremblay J: Genes of stress in experimental hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21:907-911.
- Hamet P: Environmental stress and genes of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;Suppl 2:S394-S398.
- Hamet P: Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995a;4:1-7.
- Hamet P, Kaiser MA, Sun Y, Vincent M, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Tremblay J, Samani NJ: Hsp27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension* 1996;28:1112-1117.
- Hamet P, Sun YL, Kunes J, Pravenec M, Tremblay J, Kren V: Genes of susceptibility, development and maintenance of cardiac hypertrophy [abstract]. *Genetics '96, Satellite Symposium of the 16th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Glasgow, Scotland, June 21 1996.*

- Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Tremblay J: Hypertension: genes and environment. *J Hypertens* 1998;16:397-418.
- Hamet P, Pausova Z, Dumas P, Sun YL, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: Newborn and adult recombinant inbred strains: a tool for the search of genetic determinants of target organ damage in hypertension. *Kidney Int* 1998a;53:1488-1492.
- Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, Dumas P, Tea BS, deBlois D, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Sun Y, Tremblay J: Workshop: Excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension* 2001;37:760-766.
- Harris EL, Phelan EL, Thompson CM, Millar JA, Grigor MR: Heart mass and blood pressure have separate genetic determinants in the New Zealand genetically hypertensive (GH) rat. *J Hypertens* 1995;13:397-404.
- Hashimoto T, Mosser RD, Tremblay J, Hamet P: Increased accumulation of *hsp70* messenger RNA due to enhanced activation of heat-shock transcription factor in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1991;9:S170-S171.
- Hata T, Ogihara T, Maruyama A, Mikami H, Nakamaru M, Naka T, Kumahara Y, Nugent CA: The seasonal variation of blood pressure in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1982;A4:341-354.
- Hatton DC, Scrogin KE, Metz JA, McCarron DA: Dietary calcium alters blood pressure reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1989;13:622-629.
- Havlik RJ: Predictors of hypertension. Population studies. *Am J Hypertens* 1991;4:586S-589S.
- Hegele RA, Harris SB, Hanley AJG, Sun F, Connelly PW, Zinman B: Angiotensinogen gene variation associated with variation in blood pressure in aboriginal Canadians. *Hypertension* 1997;29:1073-1077.

- Hegele RA, Harris SB, Hanley AJG, Cao H, Zinman B: G protein $\beta 3$ subunit gene variant and blood pressure variation in Canadian Oji-Cree. *Hypertension* 1998;32:688-692.
- Henry JP: Biological basis of the stress response. *Int Physiol Behav Sci* 1992;27:66-83.
- Herrera VLM, Xie HX, Lopez LV, Schork NJ, Ruiz-Opazo N: The $\alpha 1$ Na,K-ATPase gene is a susceptibility hypertension gene in the Dahl salt-sensitive^{HSD} rat. *J Clin Invest* 1998;102:1102-1111.
- Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahashi S, Vincent M, Ganten D, Georges M, Lathrop GM: Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991;353:521-529.
- Hines EA Jr, Brown GE: The cold pressor test for measuring the reactivity of the blood pressure: data concerning 571 normal and hypertensive subjects. *Am Heart J* 1936;11:1-9.
- Hingorani AD, Sharma P, Hia H, Hopper R, Brown MJ: Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension* 1996;28:907-911.
- Howard TE, Shai S-Y, Langford KG, Martin BM, Bernstein KE: Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol Cell Biol* 1990;10:4294-4302.
- Huang H, Pravenec M, Wang JM, Kren V, St Lezin E, Szpirer C, Szpirer J, Kurtz TW: Mapping and sequence analysis of the gene encoding the beta subunit of the epithelial sodium channel in experimental models of hypertension. *J Hypertens* 1995;13:1247-1251.
- Hubner N, Kreutz R, Takahashi S, Ganten D, Lindpaintner K: Unlike human hypertension, blood pressure in a hereditary rat strain shows no linkage to the angiotensinogen locus. *Hypertension* 1994;23:797-801.

- Huie PE, Hatton DC, Muntzel MS, Metz JA, McCarron DA: Psychosocial stress, dietary calcium and hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Behav* 1987;40:425-429.
- Hunt SC, Williams CS, Sharma AM, Inoue I, Williams RR, Lalouel JM: Lack of linkage between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *J Hypertens* 1996;10:27-30.
- Hutter P: Entendrons-nous un jour les symphonies intégrales de gènes? *Médecine/Sciences* 2000;16:135-140.
- Innes BA, McLaughlin MG, Kapuscinski MK, Jacob HJ, Harrap SB: Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* 1998;31:741-746.
- Iwai N, Inagami T, Kinoshita M: Molecular genetics of the SA gene. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21:913-914.
- Iwai N, Ohmichi N, Hanai K, Nakamura Y, Kinoshita M: Human SA gene locus as a candidate locus for essential hypertension. *Hypertension* 1994a;23:375-380.
- Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES: Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991;67:213-224.
- Jacob HJ, Brown DM, Bunker RK, Daly MJ, Dzau VJ, Goodman A, Koike G, Kren V, Kurtz T, Lernmark A, Levan G, Mao Y, Pettersson A, Pravenec M, Simon JS, Szpirer C, Szpirer J, Trolliet MR, Winer ES, Lander ES: A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet* 1995;9:63-69.
- Jeffs B, Clark JS, Anderson NH, Gratton J, Brosnan MJ, Reid JL, Macrae IM, Dominiczak AF: Sensitivity to cerebral ischaemic insult in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) is determined by a single genetic locus. *Hypertension* 1997;30:42

- Jenkins C, Salisbury R, Ely D: Castration lowers and testosterone restores blood pressure in several rat strains on high sodium diets. *Clin Exp Hypertens* 1994;16:611-625.
- Jensen AR: How much can we boost IQ and scholastic achievement? *Harvard Educ Rev* 1969;39:1-123.
- Jeunemaitre X, Rigat B, Charru A, Houot AM, Soubrier F, Corvol P: Sibpair linkage analysis of renin gene haplotypes in human essential hypertension. *Hum Genet* 1992a;88:301-306.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, Corvol P: Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992b;71:169-180.
- Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM: Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet* 1992c;1:72-75.
- Jezova D, Guillaume V, Jurankova E, Carayon P, Oliver C: Studies on the physiological role of ANF in ACTH regulation. *Endocrine regulations* 1994;28:163-169.
- Jia H, Hingorani AD, Sharma P, Hopper R, Dickerson C, Trutwein D, Lloyd DD, Brown MJ: Association of the Gs α gene with essential hypertension and response to β -blockade. *Hypertension* 1999;34:8-14.
- Jiang J, Stec DE, Drummond H, Simon JS, Koike G, Jacob HJ, Roman RJ: Transfer of a salt-resistant renin allele raises blood pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1997;29:619-627.
- Jones TJ, Dunphy G, Milsted A, Ely D: Testosterone effects on renal norepinephrine content and release in rats with different Y chromosomes. *Hypertension* 1998;32:880-885.
- Julier C, Delepine M, Keavney B, Terwilliger J, Davis S, Weeks DE, Bui T, Jeunemaitre X, Velho G, Froguel P, Ratcliffe P, Corvol P, Soubrier F, Lathrop M: Genetic susceptibility for familial human essential hypertension in a region of homology for blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Hum Mol Genet* 1997;6:2077-2085.

- Julius S, Mejia A, Jones K, Krause L, Schork N, Van de Ven C, Johnson E, Petrin J, Sekkarie M, Kjedsen SE, Schmouder R, Gupta R, Ferraro J, Nazzaro P, Weissfeld J: 'White coat' versus 'sustained' borderline hypertension in Tecumseh, Michigan. *Hypertension* 1990;16:617-623.
- Junien C: L'empreinte parentale: de la guerre des sexes à la solidarité entre générations. *Médecine/Science* 2000;16:336-344.
- Jutley JK, Stewart AD: Genetic analysis of the Y-chromosome of the mouse: evidence for two loci affecting androgen metabolism. *Genet Res Camb* 1985;47:29-34.
- Kahan T, Eliasson K: The influence of long-term ACE inhibitor treatment on circulatory responses to stress in human hypertension. *Am J Hypertens* 1999;12:1188-1194.
- Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Yi Z, Mikami H, Miki T, Ogihara T: Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Human Hypertens* 1994;8:521-524.
- Kamitani A, Wong ZYH, Fraser R, Davies DL, Connor JM, Foy CJW, Watt GCM, Harrap SB: Human α -adducin gene, blood pressure, and sodium metabolism. *Hypertension* 1998;32:138-143.
- Kanayama N, Khatun S, Belayet H, She L, Terao T: Chronic local cold stress to the soles induces hypertension in rats. *Am J Hypertens* 1999;12:1124-1129.
- Karasek RA, Theorell T, Schwartz JE, Schnall PL, Pieper CF, Michela JL: 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* 1988;78:910-918.
- Kario K, Kanai N, Saito K, Nago N, Matsuo T, Shimada K: Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensive. *Circulation* 1996;93:1630-1633.

- Kato N, Sugiyama T, Nabika T, Morita H, Kurihara H, Yazaki Y, Yamori Y: Lack of association between the α -adducin locus and essential hypertension in the Japanese population. *Hypertension* 1998;31:730-733.
- Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y: Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension* 1999;33:933-936.
- Katsuya T, Higaki J, Zhao Y, Miki T, Mikami H, Serikawa T, Ogihara T: A neuropeptide Y locus on chromosome 4 cosegregates with blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Comm* 1993;192:261-267.
- Khan K-T: Temperature and cardiovascular mortality. *Lancet* 1995;345:337-338.
- Kirby RF, Callahan MF, Johnson AK: Regional vascular responses to an acute stressor in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Auton Nerv Syst* 1987;20:185-188.
- Klein TW: Analysis of major gene effects using recombinant inbred strains and related congenic lines. *Behav Genet* 1978;8:261-268.
- Kobashi G: A case-control study of pregnancy-induced hypertension with a genetic predisposition: association of a molecular variant of angiotensinogen in the Japanese women. *Hokkaido J Med* 1995;70:649-657.
- Koepke JP: Renal responses to stressful environmental stimuli. *Federation Proc* 1985;44:2823-2827.
- Koepke JP, DiBona GF: Central beta-adrenergic receptors mediate renal nerve activity during stress in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1985;7:350-356.
- Komiya I, Yamada T, Takara M, Asawa T, Shimabukuro M, Nishimori T, Takasu N: Lys(173)Arg and -344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low-renin hypertension. *Hypertension* 2000;35:699-703.

- Kotanko P, Binder A, Tasker J, DeFreitas P, Kamdar S, Clark AJL, Skrabal F, Caulfield M: Essential hypertension in African Caribbeans associates with a variant of the β_2 -adrenoceptor. *Hypertension* 1997;30:773-776.
- Kovacs P, Voigt B, Kloting I: Novel quantitative trait loci for blood pressure and related traits on rat chromosomes 1, 10 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:343-348.
- Kral BG, Becker LC, Blumenthal RS, Aversano T, Fleisher LA, Yook RM, Becker DM, Exaggerated reactivity to mental stress is associated with exercise-induced myocardial ischemia in an asymptomatic high-risk population. *Circulation* 1997;96:4246-4253.
- Krege JH, John SWM, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O: Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995;375:146-148.
- Kren V: Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol med (Praha)* 1975;monogr 68:1-103.
- Kren V, Bila V, Kasperek R, Krenova D, Pravenec M, Rapp K: Recombinant inbred and congenic strains of the rat for genetic analysis of limb morphogenesis. *Folia Biol* 1996;42:159-166.
- Kren V, Pravenec M, Lu S, Krenova D, Wang JM, Wang M, Merriouns T, Wong A, St.Lezin E, Lau D, Szpirer C, Szpirer J, Kurtz TW: Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest* 1997;99:577-581.
- Kren V, Qi N, Krenova D, Zidek V, Sladka M, Jachymova M, Mikova B, Horky K, Bonne A, Van Lith HA, Van Zutphen BFM, Lau Y-FC, Pravenec M, St Lezin E: Y-Chromosome transfer induces changes in blood pressure and blood lipids in SHR. *Hypertension* 2001;37:1147-1152.

- Kreutz R, Hubner N, James MR, Bihoreau MT, Gauguier Dr, K., Lathrop GM, Ganten D, Lindpaintner K: Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8778-8782.
- Kreutz R, Stock P, Struk B, Lindpaintner K: The Y chromosome. Epistatic and ecogenetic interactions in genetic hypertension. *Hypertension* 1996;28:895-897.
- Kreutz R, Struk B, Rubattu S, Hubner N, Szpirer J, Szpirer C, Ganten D, Lindpaintner K: Role of the α -, β -, and γ -subunits of epithelial sodium channel in a model of polygenic hypertension. *Hypertension* 1997;29:131-136.
- Krief S, Faivre JF, Robert P, Le Douarin B, Brument-Larignon N, Lefrere I, Bouzyk MM, Anderson KM, Greller LD, Tobin FL, Souchet M, Brill A: Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 1999;274:36592-36600.
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES: Parametric and nonparametric linkage analysis: A unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1348-1363.
- Krushkal J, Xiong M, Ferrell R, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E: Linkage and association of adrenergic and dopamine receptor genes in the distal portion of the long arm of chromosome 5 with systolic blood pressure variation. *Hum Mol Genet* 1998;7:1379-1383.
- Kunes J, kren V, Klir P, Zicha J, Pravenec M: Genetic determination of heart and kidney weights studied using a set of recombinant inbred strains: the relationship to blood pressure. *J Hypertens* 1990;8:1091-1095.
- Kunes J, Demin AN, Jelinek J, Capek K, Belkaniya GS: Stress hypertension in monkeys. *Physiol Bohemoslov* 1990a;30:417-423.
- Kunes J, Tremblay J, Bellavance F, Hamet P: Influence of environmental temperature on the blood pressure of hypertensive patients in Montreal. *Am J Hypertens* 1991;4:422-426.

- Kunes J, Poirier M, Tremblay J, Hamet P: Expression of *hsp70* gene in lymphocytes from normotensive and hypertensive humans. *Acta Physiol Scan* 1992;146:307-311.
- Kunes J, Zicha J: Association of salt sensitivity in rats with genes of the major histocompatibility complex. *Hypertension* 1994;24:645-647.
- Kunst AE, Looman CWN, Mackenbach JP: Outdoor air temperature and mortality in the Netherlands: a time series analysis. *Am J Epidemiol* 1993;137:331-341.
- Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM: Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites. *Hypertension* 1997;30:1331-1337.
- Kurtz TW, Simonet L, Kabra PM, Wolfe S, Chan L, Hjelle BL: Cosegregation of the renin allele of the spontaneously hypertensive rat with an increase in blood pressure. *J Clin Invest* 1990;85:1328-1332.
- Kvetnansky R, Weise VK, Kopin IJ: Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase by repeated immobilization in rats. *Endocrinology* 1970;87:744-749.
- Kuwajima I, Suzuki Y, Fujisawa A, Kuramoto K: Is white coat hypertension innocent? Structure and function of the heart in the elderly. *Hypertension* 1993;22:826-831.
- Lade JA, Moses EK, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Cooper DW, Brenecke SP: The eNOS gene: a candidate for the preeclampsia susceptibility locus? *Hypertens Pregnancy* 1999;18:81-93.
- Lamar EE, Palmer E: Y-encoded, species-specific DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 1984;37:171-177.
- Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE: Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 1993;48:1210-1218.

- Lantelme P, Milon H, Gharib C, Gayet C, Fortrat J-O: White coat effect and reactivity to stress: cardiovascular and autonomic nervous system responses. *Hypertension* 1998;31:1021-1029.
- Larson L, Hutchinson R, Boerwinkle E: Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African American. *Hypertension* 2000;35:1297-1300.
- Lee P, Hudson TJ: La puce à ADN en médecine et en science. *Médecine/Science* 2000;16:43-49.
- Lesage S, Velho G, Vionnet N, Chatelain N, Demenais F, Passa P, Soubrier F, Froguel P: Genetic studies of the renin-angiotensin system in arterial hypertension associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens* 1997;15:601-606.
- Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Pouysségur J, Lalouel JM: Exclusion of the Na⁺-H⁺ antiporter as a candidate gene in human essential hypertension. *Hypertension* 1991;17:8-14.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel J-M: A chimeric 11 β -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Science* 1992;355:262-265.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill R, Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC, Murnaghan DJ, Kaufman C, Stockigt JR, Ulick S, Lalouel J-M: Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet* 1992a;2:66-74.
- Lifton RP: Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996;272:676-680.
- Light KC, Turner JR: Stress-induced changes in the rate of sodium excretion in healthy black and white men. *J Psychosom Res* 1992;36:497-508.
- Light KC, Girdler SS, Sherwood A, Bragdon EE, Brownley KA, West SG, Hinderliter AL: High stress responsivity predicts later blood pressure only in combination with positive family history and high life stress. *Hypertension* 1999;33:1458-1464.

- Lindpaintner K, Takahashi S, Ganten D: Structural alterations of the renin gene in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: examination of genotype-phenotype correlations. *J Hypertens* 1990;8:763-773.
- Lindpaintner K, Hilbert P, Ganten D, Nadal-Ginard B, Inagami T, Iwai N: Molecular genetics of the SA-gene: Cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. *J Hypertens* 1993;11:19-23.
- Lindpaintner K, Chai K, Kreutz R, Hubner N, Ganten D, Chao L, Chao J: Identification of a major genetic locus on chromosome 6 linked to sodium-sensitivity in genetically hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21 (Suppl. 1):S3
- Lindpaintner K, Lee M, Larson MG, Rao VS, Pfeffer MA, Ordovas JM, Schaefer EJ, Wilson AF, Wilson PWF, Vasani RS, Myers RH, Levy D: Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N Engl J Med* 1996;334:1023-1028.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CRW, Seckl JR: Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension* 1996;27:1200-1204.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ: Maternal care, Hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997;277:1659-1661.
- Lodwick D, Kaiser MA, Harris J, Privat P, Vincent M, Sassard J, Samani NJ: Failure of the heat-shock protein 70 locus to cosegregate with blood pressure in spontaneously hypertensive rat \times Wistar-Kyoto rat cross. *J Hypertens* 1993;11:1047-1051.
- Lynch M, Walsh B: Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland: Sinauer Associates Pub. Chapitre 22, pp 657-685. (1997)
- Malo D, Tremblay J, Hamet P: Genetic and molecular characteristics of thermosensitivity in hypertension. *J Hypertens* 1988;6:S55-S57.

- Malo D, Schlager G, Tremblay J, Hamet P: Thermosensitivity, a possible new locus involved in genetic hypertension. *Hypertension* 1989;14:121-128.
- Malo D, Pang SC, Schlager G, Tremblay J, Hamet P: Decrease of blood pressure in spontaneously hypertensive mice by heat treatment. *Am J Hypertens* 1990;3:400-404.
- Mancia G, Bertinieri G, Grassi G, Parati G, Pomidossi G, Ferrari A, Gregorini L, Zanchetti A: Effect of blood-pressure measurements by the doctor on patient's blood pressure and heart rate. *Lancet* 1983;2:695-698.
- Manly KF, Elliott RW: RI Manager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. *Mammalian Genome* 1991;1:123-126.
- Markovitz JH, Matthews KA, Kannel WB, Cobb JL, D'Agostino RB: Psychological predictors of hypertension in the Framingham study. Is there tension in hypertension? *JAMA* 1993;270:2439-2443.
- Marazziti D, Di Muro A, Castrogiovanni P: Psychological stress and body temperature changes in humans. *Physiol Behav* 1992;52:393-395.
- Markel' AL: Genetic model of stress-induced arterial hypertension. *Izv Akad Nauk SSSR Biol* 1985;3:466-469.
- Matthews KA, Woodall KL, Allen MT: Cardiovascular reactivity to stress predicts future blood pressure status. *Hypertension* 1993;22:479-485.
- Mathis C, Neumann PE, Gershenfeld H, Paul SM, Crawley JN: Genetic analysis of anxiety-related behaviors and responses to benzodiazepine-related drugs in AxB and BxA recombinant inbred mouse strains. *Behav Genet* 1995;25:557-568.
- Matsumoto C, Nara Y, Ikeda K, Nabika T, Sawamura M, Yamori Y: A new locus on chromosome 3 strongly linked with salt-sensitive high blood pressure in female F2 from SHRSP and WKY rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22 suppl 1:s2-s3.
- McCarron DA, Lucas PA, Shneidman Rj, LaCour B, Drüeke T: Blood pressure development of the spontaneously hypertensive rat after concurrent manipulations of dietary Ca and Na. *J Clin Invest* 1985;76:1147-1154.

- McCarty R: Physiological and behavioural responses of New Zealand Hypertensive and normotensive rats to stress. *Physiol Behav* 1982;28:103-108.
- McCarty R: Stress, behavior and experimental hypertension. *Neurosci Biobehav Rev* 1983;7:493-502.
- McConnaughey MM, Iams SG: Sex hormones change adrenoceptors in blood vessels of the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 1993;15:153-170.
- McMurtry JP, Wexler BC: Hypersensitivity of spontaneously hypertensive rats (SHR) to heat, ether, and immobilization. *Endocrinology* 1981;108:1730-1735.
- McMurtry JP, Wexler BC: Hypersensitivity of spontaneously hypertensive rats to heat and ether before the onset of high blood pressure. *Endocrinology* 1983;112:166-171.
- Melander O, Orho M, Fagerudd J, Bengtsson K, Groop P-H, Mattiasson I, Groop L, Hulthén UL: Mutations and variants of the epithelial sodium channel gene in Liddle's syndrome and primary hypertension. *Hypertension* 1998;31:1118-1124.
- Melander O, Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, Forsblom C, Rastam L, Groop L, Hulthén UL: Role of the Gly460Trp polymorphism of the alpha-adducin gene in primary hypertension in Scandinavians. *Hypertension* 2000;14:43-46.
- Menkes MS, Matthews KA, Krantz DS, Lundberg U, Mead LA, Qaqish B, Liang KY, Thomas CB, Pearson TA: Cardiovascular reactivity to the cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension* 1989;14:524-530.
- Middlekauff HR, Nguyen AH, Negrao CE, Nitzsche EU, Hoh CK, Natterson BA, Hamilton MA, Fonarow GC, Hage A, Moriguchi JD: Impact of acute mental stress on sympathetic nerve activity and regional blood flow in advanced heart failure. Implications for 'triggering' adverse cardiac events. *Circulation* 1997;96:1835-1842.
- Miller SB, Ditto B: Exaggerated sympathetic nervous system response to extended psychological stress in offspring of hypertensives. *Psychophysiology* 1991;28:103-113.

- Miller SB, Friese M, Sita A: Parental history of hypertension, sodium loading, and cardiovascular response to stress. *Psychosom Med* 1995;57:381-389.
- Miller MJ, Boyd JE, Gedamu L: Induction of heat shock protein 72 protects against organ damage in essential hypertension: a hypothesis. *Can J Cardiol* 2000;16:44-48.
- Minowada G, Welch WJ: Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 1995;95:3-12.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K: Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:3-8.
- Mongeau JG, Biron P: The influence of genetics and of household environment in the transmission of normal blood pressure. *Clin Exp Hypertens* 1981;3:593-596.
- Moreau P, Tea BS, Dam TV, Hamet P: Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension* 1997;30:720-724.
- Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C: Introduction to the stress response, function of the proteins, and perspectives. In *Stress proteins in biology and medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1990, pp 18-24.
- Morley RM, Conn CA, Kluger MJ, Vander AJ: Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1990;258:R1064-R1069.
- Morris BJ, Zee RYL, Ying L-H, Griffiths LR: Independent, marked associations of alleles of the insulin receptor and dipeptidyl carboxypeptidase-I genes with essential hypertension. *Clin Sci* 1993, 85:189-195.
- Morris RC Jr, Sebastian A, Forman A, Tanaka M, Schmidlin O: Normotensive salt sensitivity. Effects of race and dietary potassium. *Hypertension* 1999;33:18-23.
- Mulvany MJ: Vascular structure and smooth muscle contractility in experimental hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;10:S79-S85.

- Muntzel MS, Hatton DC, Metz JA, McCarron DA: Dietary calcium alters blood pressure in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1989;2:158-162.
- Myers RD: *dans* The hypothalamus; Haymaker, Anderson, Nauta Eds. Thomas Springfield, Ill. p 512 (1969).
- Myers RD, Veale WL: Body temperature: Possible ionic mechanism in the hypothalamus controlling the set point. *Science* 1970;170:95-97.
- Nabika T, Bonnardeaux A, James M, Julier C, Jeunemaitre X, Corvol P, Lathrop G, Soubrier F: Evaluation of the SA locus in human hypertension. *Hypertension* 1995;25:6-13.
- Naftilan AJ, Williams R, Burt D, Paul M, Pratt RE, Hobart P, Chirgwin J, Dzau VJ: A lack of genetic linkage of renin gene restriction fragment length polymorphisms with human hypertension. *Hypertension* 1989;14:614-618.
- Nara Y, Nabika T, Ikeda K, Sawamura M, Mano M, Endo J, Yamori Y: Basal high blood pressure cosegregates with the loci on chromosome 1 in the F2 generation from crosses between normotensive Wistar Kyoto rats and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:1344-1351.
- Nara Y, Matsumoto C, Ikeda K, Nabika T, Sawamura M, Yamori Y: A new locus on chromosome 3 strongly linked with salt-sensitive high blood pressure in female F2 from stroke-prone SHR (SHRSP) and WKY [Abstract]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21 (Suppl 1):S2.
- Nazzaro P, Manzari M, Merlo M, Triggiani R, Scarano AM, Lasciarrea A, Pirrelli A: Antihypertensive treatment with Verapamil and Amlodipine. Their effect on the functional autonomic and cardiovascular stress responses. *Eur Heart J* 1995;16:1277-1284.
- Neumann PE: Inference in linkage analysis of multifactorial traits using recombinant inbred strains of mice. *Behav Genet* 1992; 22:665-676

- Nicholls DP, Onuoha GN, McDowell G, Elborn JS, Riley MS, Nugent AM, Steele IC, Shaw C, Buchanan KD: Neuroendocrine changes in chronic cardiac failure. *Basic Res Cardiol* 1996;91:13-20.
- Niu T, Xu X, Cordell HJ, Rogus J, Zhou Y, Fang Z, Lindpaintner K: Linkage analysis of candidate genes and gene-gene interactions in Chinese hypertensive sib pairs. *Hypertension* 1999;33:1332-1337.
- Noll G, Wenzel RR, Schneider M, Oesch V, Binggeli C, Shaw S, Weidmann P, Lüscher TF: Increased activation of sympathetic nervous system and endothelin by mental stress in normotensive offspring of hypertensive parents. *Circulation* 1996;93:866-869.
- Nomura M, Okamura K: Catecholamine content changes in brain regions of spontaneously hypertensive rats under immobilization stress. *J Neurochem* 1989;52:933-937.
- O'Donnell CJ, Kannel WB: Is there a racial predisposition to hypertension. *Hypertension* 1998;32:817-819.
- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998a;97:1766-1772.
- Okamoto K, Aoki K: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-293.
- O'Leary DS, Wang G: Impaired thermoregulatory cutaneous vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 1994;77:692-696.
- Onions KL, Hunt SC, Rutkowski MP, Klanke CA, Su YR, Reif M, Menon AG: Genetic markers at the leptin (OB) locus are not significantly linked to hypertension in African American. *Hypertension* 1998;31:1230-1234.

- Otsen M, den Bieman M, Kuiper MT, Pravenec M, Kren V, Kurtz TW, Jacob HJ, Lankhorst A, van Zutphen BF: Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat. *Genomics* 1996;37:289-294.
- Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P: Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 1985;57:65-73.
- Palatini P, Majahalme S, Amerena J, Nesbitt S, Vriz O, Michieletto M, Krause L, Julius S: Determinants of left ventricular structure and mass in young subjects with sympathetic over-activity. The Tecumseh offspring study. *J Hypertens* 2000;18:769-775.
- Panczak A, Kren V, Bila V, Pravenec M, Matouskova M, Krenova D, Otova B, Sladka M: Graft-versus-host disease in the rat: a genetic analysis in recombinant inbred strains of SHR x BN.Lx and BN.Lx x SHR sets. *Transplant Proc* 1999;31:1569-1570.
- Pang SC, Long C, Poirier M, Tremblay J, Kunes J, Vincent M, Sassard J, Duzzi L, Bianchi G, Ledingham J, Hamet P: Cardiac and renal hyperplasia in newborn genetically hypertensive rats. *J Hypertens* 1986;4(Suppl3):S119-S122.
- Paterson AH, Damon S, Hewin JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD: Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics* 1991;127:181-197.
- Pausova Z, Kunes J, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Tremblay J, Hamet P: Endotoxin response in spontaneously hypertensive rats: a role of the TNFalpha-gene region. *Folia Biol (Praha)* 1999;45:3-6.
- Pausova Z, Deslauriers B, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Larochelle P, Cowley AW, Hamet P: Role of tumor necrosis factor- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in french canadians. *Hypertension* 2000;36:14-19.
- Persu A, Barbry P, Bassilana F, Houot A-M, Mengual R, Lazdunski M, Corvol P, Jeunemaitre X: Genetic analysis of the β subunit of the epithelial Na⁺ channel in essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:129-137.

- Pérusse L, Després JP, Lemieux S, Rice T, Rao DC, Bouchard C: Familial aggregation of abdominal visceral fat level: results from the Quebec family study. *Metabolism* 1996;45:378-382.
- Pérusse L, Chagnon YC, Rice T, Rao DC, Bouchard C: L'épidémiologie génétique et la génétique moléculaire de l'obésité: les enseignements de l'étude des familles de Québec. *Médecine/Sciences* 1998;14:914-924.
- Phillippe M, Saunders T, Bangalore S: A mechanism for testosterone modulation of alpha-1 adrenergic receptor expression in the DDT₁ MF-2 smooth muscle myocyte. *Mol Cell Biochem* 1991;100:79-90.
- Phillips DP, Ruth TE, Wagner LM: Psychology and survival. *Lancet* 1993;342:1142-1145.
- Picard D, Khursheed B, Garabedian MJ, Fortin MG, Lindquist S, Yamamoto KR: Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action *in vivo*. *Nature* 1990;348:166-168.
- Pickering TG: Part II: Modern definitions and clinical expressions of hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM, Eds. *Hypertension. Pathophysiology, diagnosis and management*. Raven Press, New York. pp. 17-21;1995.
- Pieper C, LaCroix AZ, Karasek RA: The relation of psychosocial dimensions of work with coronary heart disease risk factors: a meta-analysis of five United States data bases. *Am J Epidemiol* 1989;129:483-494.
- Plomin R, McClearn GE, Gora-Maslak G, Neiderhiser JM: Use of recombinant inbred strains to detect quantitative trait loci associated with behaviour. *Behav Genet* 1991;21:99-116.
- Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegard J: Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 2000;36:303-307.

- Pohlova I, Zicha J, Kren V, Kunes J, Pravenec M: Renal renin activity is associated with alterations of the renin gene in recombinant inbred rat strains. *Clin Sci* 1993;84:129-132.
- Poulter NR, Shipley MJ, Bulpitt CJ, Markowe HJ, Marmot MG: Pulse rate and twenty-four hour urinary sodium content interact to determine blood pressure levels of male London civil servants. *J Hypertens* 1988;6:611-613.
- Pravenec M, Kren V, Klir P: Assignment of the *Es-6* locus to linkage group VII of the rat (*Rattus norvegicus*) by the use of HXB recombinant inbred rat strains. *J Immunogenet* 1987;14:313-316.
- Pravenec M, Klir P, Kren V, Zicha J, Kunes J: An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J Hypertens* 1989;7:217-222.
- Pravenec M, Kren V, Bila V, Kabra P, Krsiakova M, Simonet L, Kurtz TW: HXB and BXH sets of recombinant inbred strains: strain distribution patterns of some genetic markers. *Transplant Proc* 1990;22:2557-2558.
- Pravenec M, Kren V, Kunes J, Scicli AG, Carretero OA, Simonet L, Kurtz TW: Cosegregation of blood pressure with a kallikrein gene family polymorphism. *Hypertension* 1991a;17:242-246.
- Pravenec M, Simonet L, Kren V, Kunes J, Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Kurtz T: The rat renin gene: assignment to chromosome 13 and linkage to the regulation of blood pressure. *Genomics* 1991b;9:466-472.
- Pravenec M, Kunes J, Zicha J, Kren V, Klir P: Platelet aggregation in spontaneous hypertension: genetic determination and correlation analysis. *J Hypertens* 1992a;10:1453-1456.
- Pravenec M, Simonet L, Kren V, St-Lezin E, Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Kurtz T: Assignment of rat linkage group V to chromosome 19 by single-strand conformation polymorphism analysis of somatic cell hybrids. *Genomics* 1992b;12:350-356.

- Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szpirer C, Szpirer J, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J Clin Invest* 1995;96:1973-1978.
- Pravenec M, Gaugier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V, Szpirer C, Szpirer J, Wang JM, Huang H, St-Lezin E, Spence MA, Flodman P, Printz M, Lathrop GM, Vergnaud G, Kurtz TW: A genetic linkage map derived from recombinant inbred strains. *Mamm Genome* 1996a;7:117-127.
- Pravenec M, Kren V, Bila V, Krenova D, Zdobinska M, Kurtz TW: Genetic linkage maps of the rat derived from an intercross and recombinant inbred strains originating from the BN.Lx and SHR progenitors. *Folia Biol* 1996b;42:147-153.
- Pravenec M, Zidek V, Zdobinska M, Kren V, Krenova D, Bottger A, van Zutphen LF, Wang J, St Lezin E: Mapping genes controlling hematocrit in the spontaneously hypertensive rat. *Mamm Genome* 1997;8:387-389.
- Pravenec M, Zidek V, Simakova M, Vorliceck J, Kren V: Linkage mapping of the fos cellular oncogene (*Fos*) to rat chromosome 6 and its possible role in the regulation of compensatory renal growth. *Folia Biol* 1998a;44:151-153.
- Pravenec M, Kren V, Hope M, Wang JM, St Lezin E: Linkage mapping of the interleukin 1beta converting enzyme (*Il1bc*) and the glutamate receptor subunit KA1 (*Grik4*) genes to rat chromosome 8. *Folia Biol* 1998b;44:107-109.
- Pravenec M, Kren V, Krenova D, Bila V, Zidek V, Simakova M, Musilova A, van Lith HA, van Zutphen LF: HXB/Ipcv and BXH/Cub recombinant inbred strains of the rat: strain distribution patterns of 632 alleles. *Folia Biol* 1999;45:203-215.
- Pravenec M, Zidek V, Simakova M, Kren V, Krenova D, Horky K, Jachymova M, Mikova B, Kazdova L, Aitman TJ, Churchill PC, Clinton Webb R, Hingarh NH, Yang Y, Wang J-M, St Lezin EM, Kurtz TW: Genetics of *Cd36* and the clustering of multiple

- cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *J Clin Invest* 1999a;103:1651-1657.
- Pravenec M, Landa V, Zidek V, Musilova A, Kren V, Kazdova L, Aitman TJ, Glazier AM, Ibrahim A, Abumrad NA, Qi N, Wang J-M, St Lezin EM, Kurtz TW: Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* 2001;27:156-158.
- Pravenec M, Jansa P, Kostka V, Zidek V, Kren V, Forejt J, Kurtz TW: Identification of a mutation in ADD1/SREBP-1 in the spontaneously hypertensive rat. *Mamm Genome* 2001a;12:295-298.
- Price JM, Wilmoth FR: Elevated body temperature and increased blood vessel sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1990;258:H946-H953.
- Pritchard KA Jr, Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC: Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2001;276:17621-17624.
- Rapp JP: Genetics of experimental and human hypertension. *dans: Genest J, Kuchel O, Hamet P & Cantin M, Édts. Hypertension, Physiopathology and Treatment*, 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1983.pp 582-598.
- Rapp JP, Dene H: Failure of alleles at the Na⁺, K⁺-ATPase α_1 locus to cosegregate with blood pressure in Dahl rats. *J Hypertens* 1990;8:457-462.
- Rapp JP, Deng AY, Dene H, Cicila GT, Zhang Q, Dukhanina O: Localizing blood pressure QTL, statistical limitation versus substitution mapping [Abstract]. *Genetics '96, Satellite Symposium of the 16th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Glasgow, Scotland, June 21 1996*.
- Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP: Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31[part 2]:435-439.

- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-1346.
- Robinson M, Grim CE, Wilson TW, Nicholson GD, Grell GAC, Etienne CM, Grim CM, Wilson DM, Drew U: Nuclear and mitochondrial DNA are associated with 24 hour blood pressure in Afro-Caribbeans [Abstract]. *Am J Hypertens* 1996;9:30A
- Rogot E et Padgett SJ: Associations of coronary and stroke mortality with temperature and snowfall in selected areas of the United States 1962-1966. *Am J Epidemiol* 1976;103:565-575.
- Rollnik JD, Mills PJ, Dimsdale JE: Characteristics of individuals who excrete versus retain sodium under stress. *J Psychosom Res* 1995;39:499-505.
- Rose G: Seasonal variation in blood pressure in man. *Nature* 1961;189:235.
- Rotimi C, Morrison L, Cooper R, Oyejide C, Effrong E, Ladipo M, Osotemihen B, Ward R: Angiotensinogen gene in human hypertension - lack of an association of the 235T allele among African Americans. *Hypertension* 1994;24:591-594.
- Rotimi C, Cooper R, Ogunbiyi O, Morrison L, Ladipo M, Tewksbury D, Ward R: Hypertension, serum angiotensinogen, and molecular variants of the angiotensinogen gene among nigerians. *Circulation* 1997;95:2348-2350.
- Rubattu S, Volpe M, Kreutz R, Ganten U, Lindpaintner K: Chromosomal mapping of quantitative trait loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nat Genet* 1996;13:429-434.
- St-Lezin E.M., Pravenec M, Wong AL, Liu W, Wang N, Lu S, Jacob HJ, Roman RJ, Stec DE, Wang JM, Reid IA, Kurtz TW: Effects of renin gene transfer on blood pressure and renin gene expression in a congenic strain of Dahl salt-resistant rats. *J Clin Invest* 1996;97:522-527.
- St-Lezin E, Griffin KA, Picken M, Churchill MC, Churchill PC, Kurtz TW, Liu W, Wang N, Kren V, Zidek V, Pravenec M, Bidani AK: Genetic isolation of a chromosome 1

- region affecting susceptibility to hypertension-induced renal damage in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1999;34:187-191.
- St Lezin E, Liu W, Wang JM, Yang Y, Qi N, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M: Genetic analysis of rat chromosome 1 and the *Sa* gene in spontaneous hypertension. *Hypertension* 2000;35:225-230.
- Sakamoto H, Imataka K, Nishimura H, Fujii J: Hematological and pressor hormone responses to mental stress in essential hypertensive patients: a comparison with isometric handgrip exercise. *Hypertens Res* 1992;15:33-39.
- Samani NJ, Lodwick D, Vincent M, Dubay C, Kaiser MA, Kelly MP, Lo M, Harris J, Sassard J, Lathrop M, Swales JD: A gene differentially expressed in the kidney of the spontaneously hypertensive rat cosegregates with increased blood pressure. *J Clin Invest* 1993a;92:1099-1102.
- Samani NJ, Gauguier D, Vincent M, Kaiser MA, Bihoreau MT, Lodwick D, Wallis R: Analysis of quantitative trait loci for blood pressure on rat chromosome 2 and 13. *Hypertension* 1996;28:1118-1122.
- Sarge KD: Male germ cell-specific alteration in temperature set point of the cellular stress response. *J Biol Chem* 1995;270:18745-18748.
- Schlager G: Selection for blood pressure levels in mice. *Genetics* 1974;76:537-549.
- Schlesinger MJ: Heat shock proteins. *J Biol Chem* 1990;265:12111-12114.
- Schmidt S, Sharma AM, Zilch O, Beige J, Walla-Friedel M, Ganten D, Distler A, Ritz E: Association of M235T variant of the angiotensinogen gene with familial hypertension of early onset. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:1145-1148.
- Schnall PL, Pieper C, Schwartz JE, Karasek RA, Schlusser Y, Devereux RB, Ganau A, Alderman M, Warren K, Pickering TG: The relationship between 'job strain', workplace diastolic blood pressure, and left ventricular mass index. Results of a case-control study. *JAMA* 1990;263:1929-1935.

- Schork NJ, Krieger JE, Trollet MR, Franchini KG, Koibe G, Krieger EM, Lander ES, Dzau VJ, Jacob HJ: A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome Research* 1995;5:164-172.
- Sealey JE, Laragh JH: The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. *In: Laragh JH, Brenner BM, Eds. Hypertension. Pathophysiology, diagnosis and management.* Raven Press, New York. pp. 1763-1796;1995.
- Selye H: The stress of life. New York, Toronto, London: Mc Graw Hill, pp 25-43. (1956)
- Sharma P, Hingorani A, Jia H, Ashby M, Hopper R, Clayton D, Brown MJ: Positive association of tyrosine hydroxylase microsatellite marker to essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:676-682.
- Shechtman O, Sun Z, Fregly MJ, Katovich MJ: Increased tail artery vascular responsiveness to angiotensin II in cold-treated rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1999;77:974-979.
- Shechtman O, Fregly MJ, Papanek PE: Factors affecting cold-induced hypertension in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;195:364-368.
- Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW, Canessa CM, Rossier BC, Lifton RP: Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994;79:407-414.
- Singer RC, Harker CT, Vander AJ, Kluger MJ: Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. *Physiol Behav* 1986;36:1179-1182.
- Skowrya D, Georgopoulos C, Zylicz M: The *E. coli dnaK* gene product, the HSP70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 1990;62:939-944.
- Smirk FH et Hall WH: Inherited hypertension in rats. *Nature* 1958;182:727-728.
- Snow AE, Horita A: Interaction of apomorphine and stressors in the production of hyperthermia in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;220:335-339.

- Soubrier F, Jeunemaitre X, Rigat B, Houot AM, Cambien F, Corvol P: Similar frequencies of renin gene restriction fragment length polymorphisms in hypertensive and normotensive subjects. *Hypertension* 1990;16:712-717.
- Staessen J, Bulpitt CJ, Thijs L, Fagard R, Joossens JV, Van Hoof R, Amery A: Sympathetic tone and relation between sodium intake and blood pressure in the general population. *Br Med J* 1989;299:1502-1503.
- Staessen J, Bulpitt CJ, Thijs L, Fagard R, Joossens JV, Van Hoof R, Amery A: Pulse rate and sodium intake interact to determine blood pressure. A population study. *J Hypertens* 1991;4:107-112.
- Staessen JA, Poulter NR, Fletcher AE, Markowe HLJ, Marmot MG, Shipley MJ, Bulpitt CJ: Psycho-emotional stress and salt intake may interact to raise blood pressure. *J Cardiovasc Risk* 1994;1:45-51.
- Stec DE, Deng AY, Rapp JP, Roman RJ: Cytochrome P4504A genotype cosegregates with hypertension in Dahl S rats. *Hypertension* 1996;27 (part 2):564-568.
- Stephoe A, Cropley M: Persistent high job demands and reactivity to mental stress predict future ambulatory blood pressure. *J Hypertens* 2000;18:581-586.
- Stevens PA, Brown MJ: Genetic variability of the ET-1 and the ET α receptor genes in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 (suppl 3):S9-S12.
- Stewart J, Eikelboom R: Stress masks the hypothermic effect of naloxone in rats. *Life Sci* 1979;25:1165-1172.
- Stoll M, Kwitek-Black AE, Cowley AW Jr, Harris EL, Harrap SB, Krieger JE, Printz MP, Provoost AP, Sassard J, Jacob HJ: New target regions for human hypertension via comparative genomics *Genome Res* 2000;10:473-482.
- Sudhir K, Forman A, Yi S-L, Sorof J, Schmidlin O, Sebastian A, Morris RC Jr: Reduced dietary potassium reversibly enhances vasopressor response to stress in african americans. *Hypertension* 1997;29:1083-1090.

- Summers KM, West JA, Huggard PR, West MJ: Angiotensin-converting enzyme and regulation of blood pressure in a large Australian family. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993;20:320-323.
- Suzuki DT, Griffiths JF, Lewontin RC (eds): An introduction to genetic analysis. San Francisco: Freeman, 5th ed, Chapitre 24, pp 721-725 (1993).
- Svetkey LP, Timmons PZ, Emovon O, Anderson NB, Preis L, Chen YT: Association of hypertension with β_2 - and α_{2c10} -adrenergic receptor genotype. *Hypertension* 1996;27:1210-1215.
- Svetkey LP, Chen YT, McKeown SP, Preis L, Wilson AF: Preliminary evidence of linkage of salt sensitivity in black Americans at the β_2 -adrenergic receptor locus. *Hypertension* 1997;29:918-922.
- Takita M, Oda Y, Kigoshi S, Muramatsu I: Effects of propranolol and atenolol on immobilization stress-induced hypertension and down-regulation of central beta-adrenoceptors in rats. *Pharmacol, Biochem & Behav* 1995;50:225-232.
- Talib HK, Dobesova Z, Klir P, Kren V, Kunes J, Pravenec M, Zicha J: Association of red blood cell sodium leak with blood pressure in recombinant inbred strains. *Hypertension* 1992;20:575-582.
- Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, Kinoshita M: Genetic polymorphism of *CYP11B2* gene and hypertension in Japanese. *Hypertension* 1999;33[partII]:266-277.
- Tarricone BJ, Hingtgen JN, Belknap JK, Mitchell SR, Nurnberger JI Jr: Quantitative trait loci associated with the behavioral response of BxD recombinant inbred mice to restraint stress: A preliminary communication. *Behav Genet* 1995;25:489-495.
- Taylor BA: Development of recombinant inbred lines of mice. *Behav Genet* 1976;6:118
- Taylor BA: Recombinant inbred strains. In: Lyon MF, Searle AG (eds), Genetic variants and strains of the laboratory mouse, 2nd ed, Oxford University Press, Oxford, pp 773-789 (1989).

- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F: Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992;51:197-205.
- Tiret L, Poirier O, Hallet V, McDonagh TA, Morrison C, McMurray JVJ, Dargie HJ, Arveiler D, Ruidavets J-B, Luc G, Evans A, Cambien F: The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. *Hypertension* 1999;33:1169-1174.
- Traina-Dorge VL, Carr JK, Bailey-Wilson JE, Elston RC, Taylor BA, Cohen JC: Cellular genes in the mouse regulate *in trans* the expression of endogenous mouse mammary tumor viruses. *Genetics* 1985;11:597-615.
- Tremblay J, Hadrava V, Kruppa U, Hashimoto T, Hamet P: Enhanced growth-dependent expression of *TGF β 1* and *hsp70* genes in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;70:565-572.
- Trippodo NC et Frolich ED: Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: Man and rat. *Circulation Res* 1981;48:309-319.
- Turner ME, Johnson ML, Ely DL: Separate sex-influenced and genetic components in spontaneously hypertensive rat hypertension. *Hypertension* 1991;17:1097-1103.
- Trimarco B, Ricciardelli B, De Luca N, De Simone A, Cuocolo A, Galva MD, Picotti GB, Condorelli M: Participation of endogenous catecholamines in the regulation of left ventricular mass in progeny of hypertensive parents. *Circulation* 1985;1:38-46.
- Udelsman R, Blake M, Holbrook NJ: Molecular response to surgical stress: specific and simultaneous heat shock protein induction in the adrenal cortex, aorta and vena cava. *Surgery* 1991;110:1125-1131.
- Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, Li D, Putney DJ, Holbrook NJ: Vascular heat shock protein expression in response to stress. Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. *J Clin Invest* 1993;91:465-473.

- Udelsman R, Li DG, Stagg CA, Gordon CB, Kvetnansky R: Adrenergic regulation of adrenal and aortic heat shock protein. *Surgery* 1994;116:177-182.
- Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, Holbrook NJ: Endocrine control of stress-induced heat shock protein 70 expression *in vivo*. *Surgery* 1994a;115:611-616.
- Ulick S, Levine LS, Gunczler P, Zanconato G, Ramirez LC, Rauh W, Rösler A, Bradlow HL, New MI: A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:757-764.
- Van Abeelen JHF, Leenders HJ, Lemmens WAJG: Y-chromosomal influences on renal and adrenal measures in mice. *Growth, Dev & Aging* 1990;54:151-154.
- Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Porcellati C: Prognostic significance of the white coat effect. *Hypertension* 1997;29:1218-1224.
- Verdecchia P, Porcellati C, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Battistelli M, Guerrieri M, Gatteschi C, Zampi I, Santucci A, Santucci C, Reboldi G: Ambulatory blood pressure: an independent predictor of prognosis in essential hypertension. *Hypertension* 1994;24:793-801.
- Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Pede S, Porcellati C: Ambulatory pulse pressure. A potent predictor of total cardiovascular risk in hypertension. *Hypertension* 1998;32:983-988.
- Villar J, Edelson JD, Post M, Mullen B, Slutsky A: Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:177-181.
- Vincent M, Kaiser MA, Orea V, Lodwick D, Samani NJ: Hypertension in the spontaneously hypertensive rat and the sex chromosomes. *Hypertension* 1994;23:161-166.
- Vincent M, Hadour G, Oréa V, Samani NJ, Sassard J: Left ventricular weight but not blood pressure is associated with sex chromosomes in Lyon rats. *J Hypertens* 1996;14:293-299.

- Vincent M, Samani NJ, Gauguier D, Thompson JR, Lathrop GM, Sassard J: A pharmacogenetic approach to blood pressure in Lyon hypertensive rats. A chromosome 2 locus influences the response to a calcium antagonist. *J Clin Invest* 1997;100:2000-2006.
- Wang WYS, Zee RYL, Morris BJ: Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 1997;51:31-34.
- Wang WYS, Glenn CL, Zhang W, Benjafield AV, Nyholt DR, Morris BJ: Exclusion of angiotensinogen gene in molecular basis of human hypertension: Sibpair linkage and association analyses in Australian anglo-caucasians. *Am J Med Genet* 1999;87:53-60.
- Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S: A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet* 1993;4:59-61.
- Watanabe H, Ogura T, Hosoya M, Kageyama J, Ota Z: Developmental change of kidney dopamine receptors in spontaneously hypertensive rats. *Res Comm Mol Pathol Pharmacol* 1995;87:333-344.
- Waxman D, Peck JR: Pleiotropy and the preservation of perfection. *Science* 1998;279:1210-1213.
- Weber MA, Neutel JM, Smith DHG, Graettinger WF: Diagnosis of mild hypertension by ambulatory blood pressure monitoring. *Circulation* 1994;90:2291-2298.
- Weinberger MH: Clinical studies of the role of dietary sodium in blood pressure. Dans: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (JH Laragh & BM Brenner, Édés), pp 1999-2010. Raven Press, New York (1990).
- Welch WJ: How cells respond to stress. *Sci Am* 1993;5:56-64.
- Wexler BC, Greenberg BP: Pathophysiological differences between paired and communal breeding of male and female Sprague-Dawley rats. *Circ Res* 1978;42:126-134.
- Widgren BR, Wikstrand J, Berglund G, Andersson OK: Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. *Hypertension* 1992;20:606-611.

- Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, Wu LL, Hasstedt SJ, Stults BM, Kuida H: Genes, hypertension, and early familial coronary heart disease. Dans: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (JH Laragh & BM Brenner, Édés), pp 127-136. Raven Press, New York (1990).
- Williams RW, Strom RC, Goldowitz D: Natural variation in neuron number in mice is linked to a major quantitative trait locus on Chr 11. *J Neurosci* 1998;18:138-146.
- Williams GH, Dluhy RG, Lifton RP, Moore TJ, Gleason R, Williams R, Hunt SC, Hopkins PN, Hollenberg NK: Non-modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension. *Hypertension* 1992;20:788-796.
- Wilson JR, Wilson LM, Dicara LV: Evidence for an elevation in thermoregulatory set-point in the SHR. *Proc 2nd Int Symposium on SHR* 1977;6:376-384.
- Wilson TW, Grim CE: Biohistory of slavery and blood pressure differences in blacks today. A hypothesis. *Hypertension* 1991;17:1122-1128.
- Wisniewski J, Kordula T, Krawczyk Z: Isolation and nucleotide sequence analysis of the rat testis-specific major heat-shock protein (HSP70)-related gene. *Biochim Biophys Acta* 1990;1048:93-99.
- Wood DL, Sheps SG, Elveback LR, Schirger A: Cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension* 1984;6:301-306.
- Woodhouse P, Khaw KT, Plummer M: Seasonal variation in blood pressure in relation to temperature in elderly men and women. *J Hypertens* 1993;11:1267-1274.
- Wright G, Knecht E, Toraason M: Cardiovascular effects of whole-body heating on spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 1978;45:521-527.
- Wyndham CH et Felligham SA: Climate and disease. *South Afr Med J* 1978;53:1051-1061.
- Wyss JM, Carlson SH: The role of the nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2001;14:155S-162S.
- Xu Q, Li DG, Holbrook NJ, Udelsman R: Acute hypertension induces heat-shock protein 70 gene expression in rat aorta. *Circulation* 1995;92:1223-1229.

- Xu Q, Fawcett TW, Udelsman R, Holbrook NJ: Activation of heat shock transcription factor 1 in rat aorta in response to high blood pressure. *Hypertension* 1996;28:53-57.
- Yagil C, Sapojnikov M, Kreutz R, Katni G, Lindpaintner K, Ganten D, Yagil Y: Salt susceptibility maps to chromosomes 1 and 17 with sex specificity in the Sabra rat model of hypertension. *Hypertension* 1998;31:119-124.
- Yagil C, Sapojnikov M, Kreutz R, Zürcher H, Ganten D, Yagil Y: Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 1999;33[partII]:261-265.
- Yamamoto J, Nakai M, Natsume T: Cardiovascular responses to an acute stress in young-to-old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987;4:362-370.
- Yamori Y, Matsumoto M, Yamabe H, Okamoto K: Augmentation of spontaneous hypertension by chronic stress in rats. *Jpn Circ J* 1969;33:399-409.
- Yamori Y: Pathogenesis of spontaneous hypertension as a model for essential hypertension. *Jpn Circ J* 1977;41:259-266.
- Young EA, Nesse RM, Weder A, Julius S: Anxiety and cardiovascular reactivity in the Tecumseh population. *J Hypertens* 1998;16:1727-1733.
- Zagato L, Modica R, Florio M, Torielli L, Bihoreau M-T, Bianchi G, Tripodi B: Genetic mapping of blood pressure quantitative trait loci in Milan hypertensive rats. *Hypertension* 2000;36:734-739.
- Zaloga GP, Willey S, Malcolm D, Chernow B, Holaday JW: Hypercalcemia attenuates blood pressure response to epinephrine. *J Pharmacol Exp Therap* 1988;247:949-952.
- Zee RYL, Ying LH, Morris BJ, Griffiths LR: Association and linkage analyses of restriction fragment length polymorphisms for the human renin and antithrombin III genes in essential hypertension. *J Hypertens* 1991;9:825-830.
- Zhong M, Orosz A, Wu C: Direct sensing of heat and oxidation by *Drosophila* heat shock transcription factor. *Mol Cell* 1998;2:101-108.

- Zhu J, Quyyumi AA, Rott D, Csako G, Wu H, Halcox J, Epstein SE: Antibodies to human heat-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherosclerosis. *Circulation* 2001;103:1071-1075.
- Zidek V, Musilova A, Pintir J, Simakova M, Pravenec M: Genetic dissection of testicular weight in the mouse with the BXD recombinant inbred strains. *Mamm Genome* 1998;9:503-505.
- Zidek V, Fucikova A, Musilova A, Bila V, Kren V, Pravenec M: Hematocrit and hemoglobin values are negatively correlated with insulin resistance in spontaneous hypertension. *Folia Biol* 1999a;45:247-251.
- Zidek V, Pintir J, Musilova A, Bila V, Kren V, Pravenec M: Mapping of quantitative trait loci for seminal vesicle mass and litter size to rat chromosome 8. *J Reprod Fertil* 1999b;116:329-333.
- Zureik M, Bonithon-Kopp C, Lecomte E, Siest G, Ducimetière P: Weights at birth and in early infancy, systolic pressure, and left ventricular structure in subjects aged 8 to 24 years. *Hypertension* 1996;27 [part 1]:339-345.

ANNEXE 1 - LISTE DES PUBLICATIONS ET DES PRÉSENTATIONS

PUBLICATIONS:

DUMAS P, Tremblay J, Hamet P: Stress modulation by electrolytes in salt-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Am J Med Sci* 307 (Suppl. 1):S130-S137; 1994.

Hamet P, Sun Y, Malo D, Kong D, Kren V, Pravenec M, Kunes J, **DUMAS P**, Gagnon F, Tremblay J: Genes of stress in experimental hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21:907-911; 1994.

Hamet P, Pausova Z, **DUMAS P**, Sun Y L, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: 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; 1998.

Champagne M-J, **DUMAS P**, Orlov S N, Bennett M, Hamet P, Tremblay J: Protection against necrosis but not apoptosis by HSPs in vascular smooth muscles cells. Evidence for distinct mode of cell death. *Hypertension* 33:906-913; 1999

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 35:568-573; 2000.

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Mapping of the quantitative trait loci (QTL) of

differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 18:545-551; 2000.

Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, **DUMAS P**, Tea B-S, deBlois D, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Sun Y, Tremblay J: Excess growth and apoptosis. Is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension* 37[part 2]:760-766; 2001.

DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. Manuscrit accepté pour publication dans *J Hypertens*.

COMMUNICATIONS:

Tremblay J, Chang E, **DUMAS P**, Hamet P: *A novel peptidic factor activating calmodulin in genetic hypertension*. 44ème Réunion Annuelle du Council for High Blood Pressure Research, Baltimore, septembre 1990.

DUMAS P, Chang E, Hamet P, Tremblay J: *Expression différentielle d'un facteur intracellulaire chez les rats spontanément hypertendus sensibles (SHR-S) et résistants (SHR-R) au sel*. Journée de la Recherche, Département de Médecine, Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, mai 1992.

DUMAS P, Chang E, Hamet P, Tremblay J: *Differential expression of an intracellular factor in spontaneously hypertensive salt-sensitive (SHR-S) and salt-resistant (SHR-R) rats*. 14ème Réunion Scientifique de la Société Internationale d'Hypertension, Madrid, juin 1992.

DUMAS P, Tremblay J, Hamet P: *Susceptibilité génétique aux électrolytes et au stress dans l'hypertension*. Congrès de l'Association des Médecins de Langue Française du Canada, 150ème Anniversaire de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, mars 1993.

DUMAS P, Hamet P, Tremblay J: *Modulation de la réponse au stress par les électrolytes dans l'hypertension*. Réunion Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension, Montréal, janvier 1994.

Gagnon F, **DUMAS P**, Tremblay J, Hamet P: *Thermoregulatory response to immobilization and acute aquatic exercise in untrained SHR and BN: Intermediate phenotypes of susceptibility to environmental stress*. Réunion Annuelle du Collège Royal des Médecins et Chirurgiens du Canada, Toronto, novembre 1994.

DUMAS P, Ely D, Turner M, Sun YL, Kong D, Hamet P: *Modulation de la réponse au stress par le chromosome Y*. Réunion Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension, Québec, janvier 1995.

DUMAS P, Ely D, Turner M, Sun YL, Kong D, Hamet P: *Modulation of the stress response by the Y chromosome*. 11ème Réunion Scientifique de la Société Inter-Américaine d'Hypertension, Montréal, juin 1995. *Hypertension* 25(6):40;1995.

Orlov SN, Kuznetsov SR, **DUMAS P**, Tremblay J, Hamet P: *Dietary calcium does not affect altered monovalent ion transport in SHR*. 10ème Réunion

Scientifique de la Société Américaine d'Hypertension, New-York, mai 1995. *Am J Hypertens* 8:122A;1995.

Tremblay J, **DUMAS P**, Ely D, Turner M, Pravenec M, Kren V, Hamet P: *Étude des locus génétiques et des gènes candidats de la susceptibilité au stress dans l'hypertension*. Réunion Annuelle de la Société Française d'Hypertension, Paris, décembre 1995.

DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: *Analyse de locus de traits quantitatifs (QTL) pour la réponse au stress et l'excrétion urinaire d'ions dans l'hypertension à l'aide de rats recombinants consanguins*. Réunion Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension, Montréal, janvier 1996.

Champagne MJ, **DUMAS P**, Hamet P, Tremblay J: *Implication des protéines de stress dans le développement de la thermotolérance des cellules du muscle lisse vasculaire*. Réunion Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension, Montréal, janvier 1996.

Champagne M-J, Orlov S, **DUMAS P**, Sun Y, Hamet P, Tremblay J: *Modulation of apoptosis, necrosis and proliferation in vascular smooth muscle cells by heat stress*. 16ème Réunion Scientifique de la Société Internationale d'Hypertension, Glasgow, juin 1996.

DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Tremblay J, Hamet P: *Mapping of quantitative trait loci (QTL) for stress response and urinary sodium and potassium in the rat by total genome scan of recombinant inbred strains*. Réunion

Annuelle du Collège Royal des Médecins et Chirurgiens du Canada, Halifax, septembre 1996.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: QTL of the stress response by total genome scan of rat recombinant inbred strains. 9ème Symposium International sur le rat SHR et la génétique cardiovasculaire, Montréal, Novembre 1997.

Pausova Z, Gagnon F, Richard L, **DUMAS P**, Tremblay J, Sun Y, Pravenec M, Krenova D, Kren V, Hamet P: *Genetic determinants of serum uric acid: an intermediate phenotype of hypertension*. 9ème Symposium International sur le rat SHR et la génétique cardiovasculaire, Montréal, Novembre 1997.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: *Genetic determinants of the urinary excretion of sodium (Na), potassium (K) and of Na/K ratio*. 17ème Congrès Scientifique de la Société Internationale d'Hypertension, Amsterdam, Juin 1998. *J Hypertens* 16(suppl 2):S47; (1998).

Kunes J, Sun Y-L, Dobesova Z, **DUMAS P**, Pausova Z, Pravenec M, Kren V, Tremblay J, Hamet P: *Newborn organ weights as the determinants of high blood pressure: recombinant inbred strains (RIS) study*. 17ème Congrès Scientifique de la Société Internationale d'Hypertension, Amsterdam, Juin 1998. *J Hypertens* 16(suppl 2):S43; (1998).

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: *Étude des déterminants génétiques de la réponse des gènes de stress*

chez des lignées de rats recombinantes consanguines. Premier Congrès Annuel du Centre de Recherche du CHUM, Montréal, Décembre 1998.

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: *Genetic determinants of the stress genes response in rat recombinant inbred strains.* 9ème Congrès Scientifique de la Société Européenne d'Hypertension, Milan, Juin 1999.

Dion N, Ste-Marie L-G, Kren V, **DUMAS P**, Krenova D, Pravenec M, Tremblay J, Hamet P: *Determination of bone mineral density and histomorphometric analysis of lumbar vertebrae from rat recombinant inbred strains.* 21ème Congrès Annuel de la Société Américaine de Recherche sur les Os et les Minéraux, St-Louis, Sept-Oct 1999.

Tremblay J, Hum D, **DUMAS P**, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Gossard F, Hamet P: *Effect of chromosome 10 (Ace) and 2 (Gca) loci on diastolic blood pressure and guanylyl cyclase-A expression.* Congrès Annuel de la Société Canadienne d'Hypertension, Québec, Octobre 1999.

CONFÉRENCIER INVITÉ:

"Genetic Determinants of environmental susceptibilities".

Conférence donnée au *Medical College of Wisconsin*, le 24 février 1999.

**ANNEXE 2 - AUTORISATION DES COAUTEURS
POUR LE MICROFILMAGE ET LA REPRODUC-
TION DES MANUSCRITS INCLUS DANS LA
THÈSE.**

THÈSE DE PH.D. - PIERRE DUMAS

PUBLICATIONS - LISTE DES COAUTEURS

Autorisation pour le microfilmage et la reproduction des manuscrits inclus dans la thèse.

Authorization for microfilm reproduction of the manuscripts that are part of this thesis.

Coauteur

Signature

Pavel Hamet

Johanne Tremblay

Yulin Sun

Gilles Corbeil

Sandra Tremblay

Zdenka Pausova

Marc Dumont

Vladimir Kren

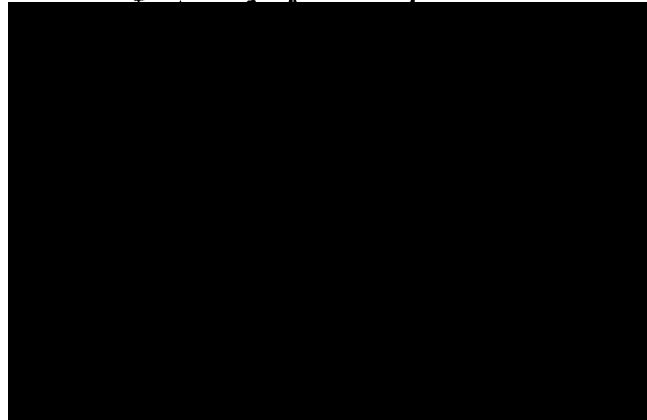
Drahomira Krenova

Michal Pravenec

Jaroslav Kunes

Daniel Ely

Monte Turner



.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Manuscrits:

Hamet P, Pausova Z, DUMAS P, Sun Y L, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: 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; 1998.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 35:568-573; 2000.

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Mapping of the quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 18:545-551; 2000.

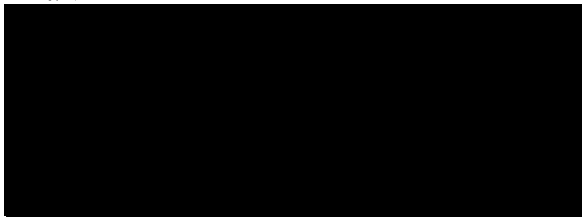
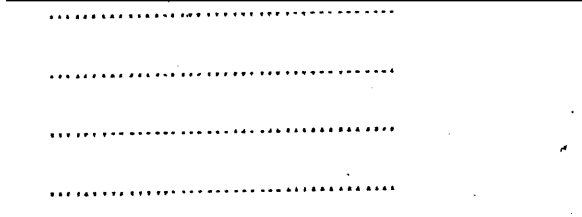
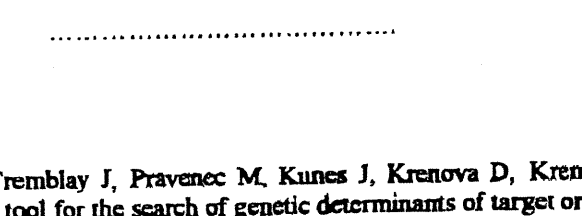
DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. Accepted for publication in *J Hypertens*.

13

OK complet

THÈSE DE PH.D. – PIERRE DUMAS
PUBLICATIONS – LISTE DES COAUTEURS

Autorisation pour le microfilmage et la reproduction des manuscrits inclus dans la thèse.
Authorization for microfilm reproduction of the manuscripts that are part of this thesis.

Coauteur	Signature
Pavel Hamet
Johanne Tremblay
Yulin Sun
Gilles Corbeil
Sandra Tremblay
Zdenka Pausova	
Marc Dumont	
Vladimir Kren	
Drahomira Krenova
Michal Pravenec
Jaroslav Kunes
Daniel Ely
Monte Turner

Manuscripts:

Hamet P, Pausova Z, **DUMAS P**, Sun Y L, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: 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; 1998.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 35:568-573; 2000.

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Mapping of the quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 18:545-551; 2000.

DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. Accepted for publication in *J Hypertens*.

THÈSE DE PH.D. - PIERRE HUMAS
PUBLICATIONS - LISTE DES COAUTEURS

Autorisation pour le microfilmage et la reproduction des manuscrits faisant partie de cette thèse.

Authorization for microfilm reproduction of the manuscripts that are part of this thesis.

Coauteur

Signature

Pavel Hamet

Johanne Tremblay

Vulla Sun

Gilles Corbeil

Sandra Tremblay

Zdenka Pausova

Marc Dumont

Vladimir Kren

Drahomira Krenova

Michal Pravenec

Jaroslav Kunes

Daniel Ely

Monte Turner

Manuscrits:

Hamet P, Pausova Z, DUMAS P, Sun V, L, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V. 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, 1998.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Hamet P, Sun V, Tremblay J, Hamet P. Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rat hypertension 35:568-573, 2000.

DUMAS P, Sun V, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J. Mapping of the quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 18:545-551, 2000.


DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J. Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. Accepted for publication in *J Hypertens*.

THÈSE DE PH.D. – PIERRE DUMAS

PUBLICATIONS – LISTE DES COAUTEURS

Autorisation pour le microfilmage et la reproduction des manuscrits inclus dans la thèse.

Authorization for microfilm reproduction of the manuscripts that are part of this thesis.

Coauteur	Signature
Pavel Hamet
Johanne Tremblay
Yulin Sun
Gilles Corbeil
Sandra Tremblay
Zdenka Pausova
Marc Dumont
Vladimir Kren
Drahomira Krenova	
Michal Pravenec
Jaroslav Kunes
Daniel Ely
Monte Turner

Manuscripts:

Hamet P, Pausova Z, **DUMAS P**, Sun Y L, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: 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; 1998.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 35:568-573; 2000.

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Mapping of the quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 18:545-551; 2000.

DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. Accepted for publication in *J Hypertens*.

THÈSE DE PH.D. - PIERRE DUMAS
PUBLICATIONS - LISTE DES COAUTEURS

Autorisation pour le microfilmage et la reproduction des manuscrits inclus dans la thèse.
Authorization for microfilm reproduction of the manuscripts that are part of this thesis.

Coauteur	Signature
Pavel Hamet
Johanne Tremblay
Yulin Sun
Gilles Corbeil
Sandra Tremblay
Zdenka Pausova
Marc Dumont
Vladimir Kren
Drahomira Krenova
Michal Pravenec
Jaroslav Kunes
Daniel Ely
Monte Turner

Manuscrits:

Hamet P, Pausova Z, **DUMAS P**, Sun Y L, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: 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; 1998.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 35:568-573; 2000.

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Mapping of the quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 18:545-551; 2000.




DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. Accepted for publication in *J Hypertens*.

THÈSE DE PH.D. – PIERRE DUMAS

PUBLICATIONS – LISTE DES COAUTEURS

Autorisation pour le microfilmage et la reproduction des manuscrits inclus dans la thèse.

Authorization for microfilm reproduction of the manuscripts that are part of this thesis.

Coauteur	Signature
Pavel Hamet
Johanne Tremblay
Yulin Sun
Gilles Corbeil
Sandra Tremblay
Zdenka Pausova
Marc Dumont
Vladimir Kren
Drahomira Krenova
Michal Pravenec
Jaroslav Kunes	
Daniel Ely	
Monte Turner	

Manuscripts:

Hamet P, Pausova Z, **DUMAS P**, Sun Y L, Tremblay J, Pravenec M, Kunes J, Krenova D, Kren V: 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; 1998.

DUMAS P, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Dumont M, Ely D, Turner M, Sun Y, Tremblay J, Hamet P: Contribution of autosomal loci and the Y chromosome to the stress response in rats. *Hypertension* 35:568-573; 2000.

DUMAS P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Mapping of the quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 18:545-551; 2000.

DUMAS P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J: Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. Accepted for publication in *J Hypertens*.