

2m11.3034.10

Université de Montréal

Identification de facteurs génétiques liés à l'hypertrophie cardiaque par analyse de liaison de croisements génétiques et génération de lignées congéniques de rats

par  
Isabelle B-Ganache

Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

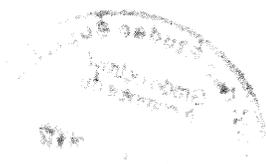
Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en biologie moléculaire

Août 2002

©Isabelle B-Ganache, 2002



QH  
506  
154  
2002  
N. 020

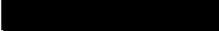


Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Identification de facteurs génétiques liés à l'hypertrophie cardiaque par analyse de liaison de croisements génétiques et génération de lignées congéniques de rats

présenté par

Isabelle B-Ganache  


a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jean Vacher  
Président-rapporteur

Dr Christian Deschepper  
Directeur de recherche

Dr Bernard Brais  
Membre du jury

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANF	<i>Atrial Natriuretic Factor</i>
ANF <sub>v</sub>	Concentration ventriculaire en ANF
Ang II	Angiotensine II
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
BN	Rat <i>Brown Norway</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosine monophosphate</i>
cGMP	<i>cyclic Guanosine monophosphate</i>
cM	CentiMorgan
CNP	<i>C-type Natriuretic peptide</i>
CO	<i>Carbon monoxide</i>
CRF	<i>Corticotropin releasing factor</i>
DOCA	Déoxycorticostérone acétate
GC-A	Guanylyl cyclase de type A
GC-B	Guanylyl cyclase de type B
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche
kb	Kilobase
LEW	Lewis
LOD	<i>Log of Odds</i>
LTCC	<i>L-type Ca<sup>2+</sup> Channel</i>
LRS	<i>Likelihood Ratio Statistic</i>
NE	Norépinéphrine
NKE	Nkx-2.5 response element
NO	<i>Nitric oxide</i>
<i>Nppa</i>	<i>Natriuretic peptide precursor type A</i>
NPR-A	<i>Natriuretic peptide receptor type A</i>
NPR-B	<i>Natriuretic peptide receptor type B</i>
NPR-C	<i>Natriuretic peptide receptor type C</i>

NRS	<i>Normal Rabbit Serum</i>
pb	<i>Paire de base</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PERE	<i>Phenylephrine response element</i>
PE	<i>Phenyléphrine</i>
PKG	<i>cGMP dependent protein kinase</i>
Ptgs1	<i>Prostaglandine synthase1</i>
QTL	<i>Quantitative trait locus</i>
R	<i>Rat Dahl salt-resistant</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
S	<i>Rat Dahl salt-sensitive</i>
SD	<i>Rat Sprague-Dawley</i>
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>
SHRSP	<i>Stroke-prone spontaneously hypertensive rat</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSLP	<i>Simple Sequence Length polymorphism</i>
WKY	<i>Rat Wistar Kyoto</i>
WKHA	<i>Rat Wistar-Kyoto-dérivé hyperactif mais non hypertendu</i>
WKHT	<i>Rat Wistar-Kyoto-dérivé hypertendu mais non hyperactif</i>
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Marqueurs SSLP utilisés pour cribler le génome complet des rats mâles de chaque génération lors de la production des lignées congéniques par la méthode rapide.....	31
Tableau II : Comparaison des pourcentages moyens de l'homozygosité des fonds génétiques théoriques et obtenus pour chaque génération de lignées congéniques produites.....	32

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Structures et fonctions des peptides natriurétiques et leurs récepteurs.. 10
- Figure 2 : Comparaison et alignements des séquences retrouvées près du polymorphisme C(-93)T dans le promoteur du gène *Nppa* de différentes espèces et diverses souches de rats .....16
- Figure 3 : Utilisation des phénotypes intermédiaires dans la recherche des déterminants génétiques de traits complexes.....17
- Figure 4 : Génération de lignées congéniques : comparaison de la méthode conventionnelle et de la méthode dite rapide.....30
- Figure 5 : Génération de lignées sous-congéniques.....87

## RÉSUMÉ

Une analyse de liaison a précédemment été effectuée chez les mâles du croisement F2 entre deux souches de rats normotendus présentant une différence quantitative pour la masse cardiaque (WKY et WKHA). Celle-ci a permis d'établir que le chromosome 5 (incluant le gène du précurseur de l'ANF (*Nppa*)) contient un locus lié à la masse cardiaque et à la concentration ventriculaire en ANF (ANF<sub>v</sub>).

L'utilisation de marqueurs M13 pour la production de génotypes permet l'obtention de résultats plus lisibles et l'automatisation du processus. Ceci a facilité la production des lignées congéniques WKHA contenant le locus du chromosome 5 en provenance des WKY (et inversement), générées pour renforcer les résultats précédemment obtenus. Chez les mâles des lignées WKY.WKHA-(*D5Rat173-D5Mgh16*) et WKHA.WKY-(*D5Rat45-D5Rat245*), le fragment *D5Rat45-D5Rat245* était lié à la masse cardiaque (selon la mesure du ratio largeur/longueur des cardiomyocytes isolés) et à l'ANF<sub>v</sub>. Cependant, chez les femelles de ces lignées, il a été prouvé que la provenance parentale du fragment d'intérêt déterminait la valeur de l'ANF<sub>v</sub> seulement. Ces résultats appuient ceux de l'analyse de liaison effectuée chez les femelles (F2 WKY/WKHA) ayant permis de déterminer que le locus du gène *Nppa* n'est pas lié à la masse cardiaque bien qu'il soit lié à l'ANF<sub>v</sub>.

De plus, les mesures des ratio de largeur/longueur des cardiomyocytes isolés ont montré que les cellules isolées à partir des femelles WKHA étaient plus longues que celles des WKY mais, contrairement à ce qui est observé chez les mâles, pas plus larges.

Mots-clés : Maladies cardio-vasculaires, Hypertrophie du ventricule gauche, ANF, Marqueurs SSLP, Marqueurs M13, Effets selon le sexe, Génomique fonctionnelle.

## SUMMARY

Linkage analysis has previously shown that a locus on chromosome 5 (that contains the *Nppa* gene coding for the precursor of ANF) was linked to cardiac mass and Atrial Natriuretic Factor (ANF) ventricular concentration (ANF<sub>v</sub>) in the male progeny of a F2 crosses between inbred WKY and WKHA. These rats are normotensive and present a quantitative difference in cardiac mass and (ANF<sub>v</sub>).

M13-tailed primers facilitate microsatellite analysis and were used to help the production of these congenic lines, generated to reinforce the linkage analysis results : WKY.WKHA-(*D5Rat173-D5Mgh16*), WKY.WKHA-(*D5Rat45-D5Rat245*) (where a locus from WKHA's chromosome 5 was introgressed within the WKY background), and WKHA.WKY-(*D5Rat245-D5Mgh16*) (the reciprocal strain). In male progeny of these rats, the *D5Rat45-D5Rat245* minimal fragment was shown to be linked to cardiomyocytes hypertrophy (measured as the width/length ratio of isolated cardiomyocytes) and ANF<sub>v</sub>. However, in the female progeny of these strains, the results obtained showed that the parental origin of the fragment of interest determine solely the ANF<sub>v</sub> value. This is in accordance with the results obtained from a linkage analysis that has shown that the locus on chromosome 5 containing *Nppa* was linked to ANF<sub>v</sub> but not cardiac mass in the female progeny (F2 WKY/WKHA population).

Moreover, measures of width/length ratio of isolated cardiomyocytes showed that cells isolated from female WKHA were longer than that from WKY but, in contrast to males, were not different in terms of width.

Key words : Cardiovascular disease, Left ventricular hypertrophy, ANF, SSLP markers, M13 markers, Gender-specific effect, Functional genomics.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>V.</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VI</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>IX</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XII</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>1.</b>
<b>1.1 L'hypertrophie cardiaque.....</b>	<b>1.</b>
1.1.1 L'épidémiologie de l'hypertrophie cardiaque .....	1
1.1.2 Définition de l'hypertrophie cardiaque .....	1
1.1.3 Les déterminants de la masse cardiaque .....	2
1.1.3.1 Différence de masse cardiaque entre les hommes et les femmes .....	2
1.1.4 Le rat : modèle animal de l'hypertrophie cardiaque .....	3
1.1.4.1 Mesure de l'hypertrophie cardiaque : cardiomyocytes isolés .....	5
1.1.5 Marqueurs biochimiques associés à l'hypertrophie cardiaque .....	5
<b>1.2 L'ANF.....</b>	<b>7..</b>
1.2.1 La biologie des peptides natriurétiques .....	7
1.2.2 Le GMPc : ses cibles potentielles dans la cellules cardiaques .....	8
1.2.3 L'ANF : le peptide et le gène.....	11
1.2.4 L'ANF et l'hypertrophie cardiaque .....	11
<b>1.3 Génétique des traits complexes .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 La masse cardiaque : un trait quantitatif complexe .....	13
1.3.2 Identification de QTLs liés à la masse cardiaque .....	14
1.3.3 Identification d'un gène candidat .....	15
1.3.4 L'utilisation de rats congéniques pour la dissection génétique de traits complexes	19

<b>1.4</b>	<b>Projet de recherche .....</b>	<b>24</b>
	<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Étapes générales pour la dissection d'un trait complexe : justification des méthodes utilisées.....</b>	<b>25</b>
2.1.1	Production de la carte génétique .....	25
2.1.1.1	Production de la génération F2 .....	25
2.1.1.2	Criblage du génome entier .....	26
2.1.1.3	Analyses de liaison.....	27
2.1.2	Identification d'un gène candidat .....	28
2.1.2.1	Identification de SNP : séquençage du promoteur et du gène de l'ANF .....	29
2.1.3	Production de la carte physique.....	29
2.1.3.1	Génération de congéniques .....	29
2.1.4	Observation des phénotypes .....	33
2.1.4.1	Concentration ventriculaire en ANF .....	33
2.1.4.2	Cardiomyocytes isolés .....	33
<b>2.2</b>	<b>Matériel et méthodes détaillés .....</b>	<b>34</b>
2.2.1	Animaux .....	34
2.2.2	Expérimentation sur les animaux.....	34
2.2.3	Croisements génétiques et analyses statistiques.....	35
2.2.4	Stratégie de croisements pour la génération de lignées congéniques .....	35
2.2.5	Analyses à l'aide des marqueurs SSLP .....	36
2.2.6	Quantification de l'ANF .....	38
2.2.7	Isolement des cardiomyocytes.....	39
2.2.8	Mesure des cardiomyocytes isolés .....	40
	<b>CHAPITRE 3 : MANUSCRIT 1.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Contribution au manuscrit 1.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods.....</b>	<b>42</b>
	<b>CHAPITRE 4 : MANUSCRIT 2.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Contribution au manuscrit 2.....</b>	<b>49</b>

<b>4.2 Distinct gene-gender interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently from one another.....</b>	<b>51</b>
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....</b>	<b>76</b>
<b>5.1 Cartes génétique et physique.....</b>	<b>76</b>
5.1.2 Marqueurs M13 vs traditionnels .....	78
<b>5.2 Identification d'un gène candidat.....</b>	<b>79</b>
<b>5.3 Différences observées entre les individus mâles et femelles dans les déterminants de la taille des cardiomyocytes.....</b>	<b>82</b>
<b>5.4 Expérimentations futures .....</b>	<b>86</b>
5.4.1 Réduction de la longueur du segment introduit dans la souche receveuse .....	86
5.4.2 Association du SNP détecté dans le promoteur du gène <i>Nppa</i> et de la masse cardiaque chez d'autres souches de rats et d'autres espèces .....	88
5.4.3 Effet protecteur de l'œstrogène contre l'hypertrophie cardiaque .....	89
5.4.4 Analyses de liaison chez les femelles et dans d'autres croisements de rats .....	89
5.4.5 Approches alternatives complémentaires .....	90
<b>5.5 Conclusion.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>93</b>

## REMERCIEMENTS

Je remercie tous les membres du laboratoire qui ont contribué (par leur participation à la vie dans le labo, à ma formation ou à mes travaux) à faire de mes deux années de maîtrise des années mémorables : Sandro, Ahmad, Valérie, Véronique, Zhi bin, Nathalie, Nadia, Jennifer et Guillaume.

De sincères remerciements à Mme Sylvie Picard sans qui ma maîtrise n'aurait pu être complétée. En tant qu'assistante de recherche du laboratoire, Sylvie a été en charge de ma formation technique et a su me fournir une assistance continue et de précieux conseils pour tous les travaux que j'ai réalisés.

Sa contribution à l'ambiance extraordinaire qui règne dans le laboratoire grâce à ses dons pour la communication (!) et son aptitude à maintenir la bonne entente entre tous m'a permis de vivre d'agréables moments en sa compagnie. Son soutien dans les moments difficiles a été plus qu'apprécié.

Un grand merci à mon directeur de maîtrise, le Dr Christian Deschepper. Ses conseils concernant les aspects autant théoriques que techniques de mon projet ainsi que son encadrement serré de mes démarches de recherche m'ont permis de compléter cette étape de ma formation.

Je tiens ici à souligner particulièrement le respect que Christian a pour ses étudiants. Cette considération pour les personnes a grandement contribué à l'accomplissement de ma réalisation dans un contexte de travail agréable, harmonieux et productif.

Mille mercis à tous!!!

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1.1 L'hypertrophie cardiaque

### 1.1.1 L'épidémiologie de l'hypertrophie cardiaque

Les maladies cardio-vasculaires sont la principale cause de mortalité et de morbidité en Amérique du Nord. Plusieurs facteurs de risque tels que l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète, l'hyperthyroïdie et ceux associés au mode de vie (sédentarité, consommation de tabac ou d'alcool et obésité) contribuent de façon significative au développement de ces maladies. Cependant, ces divers facteurs ne suffisent pas à prédire entièrement la mortalité reliée aux maladies cardio-vasculaires.

L'étude "The Framingham Heart Study", réalisée à l'aide de mesures prises par échocardiographie, a démontré que l'hypertrophie cardiaque du ventricule gauche (HVG) était un prédicteur puissant de morbidité et de mortalité reliées aux maladies cardiovasculaires et que sa valeur prédictive était indépendante de ces autres facteurs (notamment de l'hypertension) (Levy, 1988) et (Frohlich, 1991).

### 1.1.2 Définition de l'hypertrophie cardiaque

D'un point de vue morphologique, l'HVG peut être séparée en deux catégories distinctes : l'hypertrophie concentrique (lorsque l'épaisseur de la paroi augmente sans que la chambre ventriculaire ne varie) et l'hypertrophie excentrique (lorsque le volume de la chambre ventriculaire augmente sans que l'épaisseur de la paroi ne soit affectée) (Grossman et al., 1975).

Au niveau cellulaire, l'hypertrophie est caractérisée par une croissance accrue des cardiomyocytes accompagnée d'une augmentation de la quantité de protéines par cellule.

### 1.1.3 Les déterminants de la masse cardiaque

Plusieurs facteurs sont reconnus pour influencer la masse cardiaque chez l'humain : le sexe; l'âge; le mode de vie; le degré d'activité physique; la consommation de sel, de gras, d'alcool ou de tabac; le diabète; l'hypertension; l'hypercholestérolémie; d'autres cardiomyopathies; des problèmes rénaux (Levy, 1988), (Devereux et al., 1994), (Amann et al., 1998), (Lind et al., 1995), (Benetos et al., 1999) et (Gardin et al., 1995).

Cependant, les facteurs énumérés ci-haut ne suffisent pas à expliquer la variance totale de la masse cardiaque dans la population (Nunez et al., 1996) et (Lauer et al., 1994). Des études effectuées chez l'humain ont démontré l'héritabilité de la masse cardiaque (Verhaaren et al., 1991), (Maron et al., 1984), (Post et al., 1997) et (Greaves et al., 1987), ce qui suggère l'importance de facteurs génétiques, en plus des facteurs environnementaux, dans la détermination de la masse cardiaque (Garner et al., 2000). D'autres études, effectuées sur des jumeaux, ont montré que les différences de masse ventriculaire entre paires de jumeaux monozygotes sont plus petites qu'entre paires de jumeaux dizygotes (Harshfield et al., 1990).

La cardiomyopathie hypertrophique est un type particulier d'HVG. Dans ce groupe d'affections, des mutations dans les gènes codant pour différentes protéines sarcomériques cardiaques (la chaîne lourde de la myosine, l'alpha-tropomyosine, la troponine T cardiaque, l'actine alpha, la protéine C liant la myosine et la titine) ont été identifiés comme responsables des problèmes cardiaques (Vikstrom and Leinwand, 1996), (Seidman and Seidman, 1991), (Thierfelder et al., 1994), (Kimura et al., 1997), (Anan et al., 1994), (Mogensen et al., 1999), (Sato et al., 1999). Ceci démontre que dans certaines formes particulières d'hypertrophie cardiaques, des mutations monogéniques peuvent en être la cause. Cependant, l'HVG semble être un trait complexe qui dérive de l'action de plusieurs gènes.

#### *1.1.3.1 Différence de masse cardiaque entre les hommes et les femmes*

Les différences observées entre les hommes et les femmes en ce qui a trait à la masse cardiaque méritent d'être soulignées. En plus des différences évidentes de taille observées entre le cœur des hommes et celui des femmes (Vriz et al., 1997), il

a été démontré que les hommes présentaient un ratio masse cardiaque/poids corporel significativement plus élevé que les femmes (étude effectuée chez une population normotendue d'hommes et de femmes entre 14 et 70 ans)(de Simone et al., 1995).

Des disparités importantes entre les deux sexes sont aussi observées dans les changements de masse cardiaque en réponse à divers stimuli hypertrophiques. Par exemple, la masse cardiaque des femmes augmente avec l'âge alors que celle des hommes reste plutôt stable tout au long de leur vie (Marcus et al., 1994) et (Dannenberg et al., 1989). En réponse à un sténose aortique chez des patients de plus de 60 ans, les femmes présentent une hypertrophie concentrique alors que les hommes développent une hypertrophie excentrique (Aurigemma and Gaasch, 1995). Les femmes auront plus tendance que les hommes à développer une hypertrophie du ventricule gauche en réponse à l'hypertension (Devereux et al., 1987). Il a de plus été montré qu'une augmentation de la masse du ventricule gauche était associé à un risque de mortalité plus élevé chez les femmes que chez les hommes (Levy et al., 1990). Enfin, une augmentation de la masse du ventricule gauche et de l'épaisseur de la paroi cardiaque corrélaient avec une augmentation de la pression artérielle systolique chez les femmes seulement (étude effectuée chez des hommes et des femmes entre 18 et 45 ans présentant une hypertension légère ou moyenne (Vriz et al., 1997).

Ceci laisse supposer que les déterminants de la masse cardiaque chez les hommes et les femmes sont en partie différents.

#### 1.1.4 Le rat : modèle animal de l'hypertrophie cardiaque

L'avancement des connaissances reliées à l'HVG n'aurait pu être possible sans l'existence de modèles animaux (Hasenfuss, 1998). Les rats ont été largement utilisés comme tel pour les avantages qui les caractérisent : courte période de gestation et faibles coûts de gestion des colonies. Dans les modèles animaux, l'hypertrophie cardiaque peut être induite de différentes façons : l'hypertension survenant après une ischémie rénale mène progressivement à l'hypertrophie du ventricule gauche (Anversa et al., 1992) et (Li et al., 1993); une constriction partielle de l'aorte augmente rapidement la charge de travail cardiaque et cause une

hypertrophie (Cutilletta et al., 1975), (Mercadier et al., 1981), (Chevalier et al., 1989), Mertens 1992], (Toffolo and Ianuzzo, 1994), (Teiger et al., 1996), (Foster et al., 1991), (Sahai et al., 1993), (Ito et al., 1994); l'infusion de cathécholamines (isoprénaline et noradrénaline) (Cohn et al., 1984), (Brodde, 1991), (Brown et al., 1992), (Mende et al., 1992), (Sarsero and Molenaar, 1995), (Teerlink et al., 1994) et (Rosenbaum et al., 1988) ainsi que l'infusion d'angiotensine II (Ang II)(Farivar et al., 1995), (Susic et al., 1996), (Kim et al., 1995) mènent à l'hypertrophie cardiaque. À noter aussi, l'utilisation de rats hypertendus tels que les SHR (*Spontaneous Hypertensive Rats*), les rats S (*Dahl salt-sensitive*),... qui permettent d'étudier les mécanismes de l'hypertrophie cardiaque dépendant en partie de l'hypertension (Mitchell et al., 1997), (Brooksby et al., 1993), (Hamet et al., 1995), (Brooksby et al., 1992). Il est aussi possible d'induire une hypertrophie cardiaque en créant un état hyperkinétique chez l'animal. En effet, lorsque soumis à un exercice quotidien comme la nage ou la course, les rats (et les humains) développent une hypertrophie légère (Oscai et al., 1971), (Morganroth et al., 1975) et (Scheuer and Tipton, 1977). Il n'en demeure pas moins que ces modèles, bien que fort utiles pour étudier certains mécanismes menant à l'hypertrophie cardiaque, ne représentent pas exactement la situation observée chez les humains. Chez le rat, une hypertrophie importante est induite très rapidement comparé à l'humain, qui développe généralement l'hypertrophie de façon progressive.

De plus, dans les modèles décrits plus haut, il est souvent impossible de dissocier l'hypertrophie observée de l'hypertension sous-jacente. Pour ce faire, de nouvelles souches de rats consanguins ont été développées à partir de croisement F2 entre les WKY (Wistar Kyoto), et les SHR. Les deux nouvelles souches de rats consanguins créées sont la souche WKHA (Wistar-kyoto-dérivé hyperactif mais non hypertendu) et la souche WKHT (Wistar-kyoto-dérivé hypertendu mais non hyperactif).

Les rats WKHA constituent une souche intéressante : c'est le premier modèle animal connu pour lequel la masse cardiaque est plus élevée que chez le WKY, en présence d'une tension artérielle en tous points comparable à celle des WKY (Deschepper et al., 2002b) et (Masciotra et al., 1999).

#### 1.1.4.1 *Mesure de l'hypertrophie cardiaque : cardiomyocytes isolés*

Des modifications de forme et de volume peuvent notamment être étudiées au niveau de cardiomyocytes fraîchement isolés des coeurs d'animaux adultes (Gerdes et al., 1994) et donner des indications reliées à une hypertrophie cardiaque si présente. Dans les conditions physiologiques, le ratio largeur/longueur des cardiomyocytes demeure inchangé chez les rats en croissance (masse corporelle entre 75 et 750 g) (Schwartz, 1995). En réponse à plusieurs états, il a été démontré que les variations de volume des cardiomyocytes corrèlent bien avec les variations de masse cardiaque (Zierhut et al., 1991) (Gerdes et al., 1983). Des études effectuées précédemment dans le laboratoire ont montré que la mesure du ratio largeur/longueur des cardiomyocytes isolés est une indication plus précise que la mesure de la masse cardiaque dans la comparaison des coeurs des deux souches de rats WKY et WKHA (Deschepper et al., 2002a).

#### 1.1.5 Marqueurs biochimiques associés à l'hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque survient en réponse à une surcharge de travail du cœur et est caractérisée par une croissance accrue des cardiomyocytes accompagnée d'une augmentation de la quantité de protéines par cellule. Ce sont les changements biochimiques observés qui amènent une hypertrophie des cardiomyocytes et un remodelage interstitiel. Des études démontrent que selon le mode d'induction de l'hypertrophie cardiaque ou le type d'HVG, différents profils précis d'expression de marqueurs biochimiques sont observés. Les paragraphes suivants détaillent le profil d'expression de quelques-uns des gènes qui constituent des marqueurs biochimiques associés à l'HVG.

Au niveau des cardiomyocytes, une réinduction du programme d'expression des gènes foetaux est généralement remarquée.

Une augmentation de l'expression du gène de l'actine  $\alpha$ -squelettique est remarquée après induction de l'hypertrophie par surcharge de pression et infusion d'AngII ou de norépinéphrine (Calderone et al., 1995), (Kim et al., 1995), (Omura et al., 1994) et (Schwartz et al., 1986). Cependant, l'expression de ce gène ne varie pas lorsque

l'hypertrophie suit une surcharge de volume ou la création d'un état hyperkinétique chez l'animal (Calderone et al., 1995).

Une augmentation de l'expression du gène de la chaîne lourde de la  $\beta$ -myosine est remarquée après induction de l'hypertrophie par surcharge de pression (Calderone et al., 1995), (Imamura et al., 1991) et infusion d'AngII ou de norépinéphrine (Kim et al., 1995), (Susic et al., 1996); une diminution de l'expression de ce gène est remarquée lorsque l'hypertrophie est induite par la création d'un état hyperkinétique. L'expression du gène ne varie pas si une surcharge de volume est la méthode choisie (Calderone et al., 1995).

Une augmentation de l'ANF est toujours associée à l'induction d'une hypertrophie cardiaque (Calderone et al., 1995), (Kim et al., 1995), (Farivar et al., 1995), (Izumo et al., 1988), (Lattion et al., 1986) sauf lorsque la création d'un état hyperkinétique est la méthode utilisée.

Au niveau des fibroblastes, le profil d'expression des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire est modifié.

Par exemple, une augmentation de l'expression du gène du collagène de type III est observée lorsque l'hypertrophie est induite par surcharge de volume et infusion d'AngII ou de norépinéphrine (Chapman et al., 1990), (Kim et al., 1995), (Michel et al., 1986) et (Villarreal and Dillmann, 1992). La création de l'état hyperkinétique et une surcharge de volume ne modifie pas l'expression de ce gène.

L'expression du gène du collagène de type I varie de la même façon que celle du gène du collagène de type III sauf lors de la création d'un état hyperkinétique qui entraîne la diminution de son expression (Chapman et al., 1990), (Kim et al., 1995), (Michel et al., 1986) et (Villarreal and Dillmann, 1992).

Pour résumer, durant le processus menant à l'hypertrophie cardiaque dans les modèles où l'hypertrophie est induite, on observe généralement une ré-induction de la synthèse de protéines normalement produites par les cardiomyocytes foetaux, ainsi que de protéines de la matrice extracellulaire par les cellules non-myocytaires accompagnant l'augmentation de volume des cellules. La création de l'état hyperkinétique est responsable de l'induction d'un profil d'expression assez différent des profils observés lors de l'utilisation des autres méthodes. L'hypertrophie induite par cette méthode doit être différente de l'hypertrophie induite par les autres méthodes.

## 1.2 L'ANF

### 1.2.1 La biologie des peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques cardiaques jouent un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle et du volume sanguin (Thibault et al., 1999) : ils stimulent la natriurèse et la diurèse, induisent la vasorelaxation et inhibent la sécrétion de rénine et d'aldostérone (Kishimoto et al., 2001).

La famille des peptides natriurétiques est composée de trois facteurs : l'ANF (ou ANP) (*Atrial Natriuretic Factor*), le BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) et le CNP (*type-C Natriuretic peptide*) (Suzuki et al., 2001). Dans des conditions normales, l'ANF et le BNP sont sécrétés principalement au niveau du cœur. Le CNP est exprimé dans le système nerveux, dans les macrophages et dans les cellules endothéliales. Il semble impliqué dans la régulation neurale et dans le contrôle du tonus vasculaire, bien que son importance ne soit pas encore entièrement comprise (Suzuki et al., 2001).

Les effets de ces peptides sont médiés par leurs récepteurs (Figure 1 p.10.). Trois ont été clonés jusqu'à maintenant : le NPR-A (ou GC-A), le NPR-B (ou GC-B) et le NPR-C (*Natriuretic Peptide Receptor Type-A, -B and -C*) (Kuno et al., 1986), (Shimonaka et al., 1987), (Schenk et al., 1987), (Maack et al., 1987), (Fuller et al., 1988), (Chinkers et al., 1989), (Chang et al., 1989) (résumé dans (Suzuki et al., 2001)). Les récepteurs NPR-A et NPR-B forment des tétramères au niveau de la membrane cellulaire. Leurs domaines intracellulaires possèdent un domaine kinase suivi d'un domaine catalytique de la guanylate cyclase par lequel ils sont reliés à la cascade de signalisation du GMPc (*cyclic Guanosine Monophosphate*), un second messenger intracellulaire : c'est grâce à ce domaine catalytique qu'il transforme le GTP (*Guanosine triphosphate*) en GMPc. Toutes les guanylates cyclases catalysent la formation du GMPc et du pyrophosphate directement, et en présence d'un cofacteur comme le  $Mg^{2+}$  ou le  $Mn^{2+}$  (Garbers et al., 1991). Le récepteur NPR-C ne possède pas de domaine intracellulaire et est potentiellement impliqué dans l'élimination des peptides natriurétiques circulant, même si un rôle de signalisation intracellulaire par couplage à des protéines G a pu lui être attribué récemment. Le

récepteur NPR-A est principalement exprimé dans les gros vaisseaux sanguins et le NPR-B, dans le cerveau. Ces deux récepteurs sont également retrouvés dans les glandes surrénales et les reins (Suzuki et al., 2001).

La sécrétion des peptides natriurétiques est influencée par divers facteurs : des facteurs hémodynamiques (augmentation du volume sanguin, extension de la paroi auriculaire); des agents vasoactifs (l'angiotensine II, les endothélines, l'oxide nitrique, les prostaglandines, l'adrénomédulline); des facteurs neurohumoraux (agents  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques); l'ischémie et l'hypoxie cardiaques; des facteurs hormonaux (CRF, triiodothyronine); l'homéostasie du calcium intracellulaire; la production d'inositol triphosphate; l'activation de la protéine kinase C; l'AMPC; la calmoduline et sa kinase; et d'autres stimuli (Thibault et al., 1999).

### 1.2.2 Le GMPc : ses cibles potentielles dans la cellules cardiaques

Le GMPc est connu comme un second messenger ubiquitaire. Les enzymes qui catalysent la formation de GMPc sont les guanylyl-cyclases et elles se présentent sous formes solubles ou particulaires. Des agents diffusibles tels que le NO (*nitric oxide*) ou le CO (*Carbon monoxide*) vont activer l'enzyme sous forme soluble situé dans le cytoplasme de certaines cellules. Les récepteurs NPR-A et NPR-B des peptides natriurétiques auriculaires sont des exemples des formes particulaires. Le domaine catalytique de la guanylate cyclase qu'ils possèdent dans leur région intracellulaire relie les peptides natriurétiques à la cascade de signalisation du GMPc (Figure 1 p. 10). Il a été décrit que le GMPc exerce des effets inotropiques négatifs sur le cœur (Lohmann et al., 1991) et qu'il pourrait inhiber le besoin en glucose du coeur perfusé (Depre et al., 1998). Par ailleurs, le GMPc active la PKG (*cGMP-dependent protein kinase*) qui pourrait ensuite phosphoryler les protéines cardiaques répertoriées ci-après : LTCC (*L-type Ca<sup>2+</sup> Channel*) (Kirstein et al., 1995), (Mery et al., 1991), (Wahler and Dollinger, 1995) (Jahn et al., 1988) et Lohmann 1997], Connexine 43 (Kwak et al., 1995) et (Kwak and Jongsma, 1996), troponine (Shah et al., 1994), récepteur de la ryanodine (Takasago et al., 1991), (Hohenegger and Suko, 1993), (Willmott et al., 2000) et (Eu et al., 1999), p70 (Wrenn and Kuo, 1981) et I $\kappa$ B $\alpha$  (Guttridge et al., 2000). Cependant, au-delà de ces effets biochimiques, on ne connaît pas encore si le GMPc peut jouer un rôle

régulateur sur des fonctions physiologiques ou si ce rôle s'exerce par l'intermédiaire des protéines énumérées ci-dessus.



### 1.2.3 L'ANF : le peptide et le gène

Les peptides natriurétiques sont produits initialement sous forme de précurseurs peptidiques. L'ANF humaine est synthétisée en tant que prohormone de 126 acides aminés, qui est subséquentement clivée en deux fragments de 96 et 28 acides aminés respectivement. L'enzyme qui clive l'ANF a été récemment clonée (Yan et al., 2000). C'est une sérine-protéase de type II nommée Corin. Il a été démontré que Corin transforme le pro-ANF en ANF et que le clivage s'effectue de façon constante dans une séquence spécifique. Le fragment carboxy-terminal de 28 acides aminés ainsi libéré est le peptide biologiquement actif (Suzuki et al., 2001). L'une des particularités des peptides natriurétiques est la formation d'une structure en anneau induite par la présence d'un pont disulfide entre des résidus conservés. Cette structure tertiaire est nécessaire à la liaison aux récepteurs (Suzuki et al., 2001) .

Le gène du précurseur de l'ANF (*Nppa*) de rat est situé sur la partie distale du chromosome 5 (bande 5q36). Sa séquence codante est interrompue par la présence de deux introns. La longueur sur laquelle s'étendent le promoteur, la séquence codante et les introns jusqu'au site de polyadénylation est d'environ 2 kb. Une région promotrice minimale de 700 paires de bases en amont du gène contient les éléments nécessaires à sa transcription basale et régulée (Argentin et al., 1985). En plus des éléments de régulation de transcription GATA et PORE présents entre les nucléotides -35 et -135 du début du gène de l'ANF, un élément qui semble particulièrement important pour la transcription régulée est le NKE, sur lequel se fixent des membres de la famille de protéines à homéodomains NK2 (Durocher et al., 1996).

### 1.2.4 L'ANF et l'hypertrophie cardiaque

En situation normale, l'ANF est sécrété principalement par les oreillettes du cœur. Par contre, durant l'hypertrophie cardiaque, l'ANF est aussi sécrété au niveau des cardiomyocytes ventriculaires (Thibault et al., 1999). Étant donné la corrélation entre l'augmentation de l'ANF dans le ventricule gauche et l'hypertrophie du ventricule, il a longtemps été supposé qu'un lien de causalité reliait ces deux

conditions. Aujourd'hui, il est de plus en plus clair que l'ANF joue un rôle protecteur contre l'hypertrophie cardiaque. Des études *in vitro* ont démontré que :

- 1) l'ANF endogène inhibe l'hypertrophie des cardiomyocytes de rats en culture (conditions basales et après stimulation à la phényléphrine (PE), et que cette inhibition est un processus qui dépend du cGMP (Horio et al., 2000);
- 2) l'ANF administrée de façon exogène atténue les effets de la norépinéphrine (NE) sur la croissance des cardiomyocytes et des fibroblastes de rats en culture (cGMP-dépendant) (Calderone et al., 1998);
- 3) les peptides natriurétiques inhibent la synthèse d'ADN de fibroblastes cardiaques de rats en culture (Silberbach and Roberts, Jr., 2001).

Des études *in vivo* ont confirmé le rôle protecteur dans l'hypertrophie cardiaque que l'ANF exerce par le biais de l'activation de ses récepteurs :

- 1) l'absence d'un des récepteurs des peptides natriurétiques, le NPR-A, créée par une ablation génique, cause l'hypertension ainsi que l'hypertrophie cardiaque (Oliver et al., 1997), (John et al., 1995);
- 2) la présence du NPR-A est cruciale pour la protection contre l'hypertrophie cardiaque après induction par une constriction aortique transversale (Knowles et al., 2001);
- 3) la surexpression du NPR-A au niveau du cœur réduit le volume des cardiomyocytes chez les souris de type sauvage et chez les souris n'exprimant pas le NPR-A (Kishimoto et al., 2001).

## 1.3 Génétique des traits complexes

### 1.3.1 La masse cardiaque : un trait quantitatif complexe

La distribution de la masse cardiaque dans une population est continue (Chaturvedi et al., 1994) : ceci indique que la masse cardiaque est un phénotype contrôlé à la fois par plusieurs gènes différents (polygénique) et par des facteurs environnementaux, et peut donc être définie comme un trait quantitatif complexe (Schork, 1997).

L'identification des gènes responsables des traits complexes dans une population s'avère une entreprise difficile. Les cinq caractéristiques suivantes de ce type de traits expliquent en partie les difficultés rencontrées (Lander and Schork, 1994):

- 1) l'héritabilité polygénique : pour que le phénotype observé n'atteigne un niveau arbitraire, un individu doit posséder des variantes de plusieurs gènes différents;
- 2) l'hétérogénéité du locus : lorsque différentes variantes génétiques sont responsables d'un phénotype observé;
- 3) l'interaction des gènes : lorsqu'un génotype procure une susceptibilité dépendante de la présence d'un autre génotype;
- 4) les interactions entre le gène et l'environnement;
- 5) les gènes développementaux : qui ont une influence différente selon le stade de développement de l'individu.

Deux stratégies de base permettent l'identification des gènes responsables des traits quantitatifs complexes: l'approche par gènes candidats et l'approche par criblage de génomes entiers (Weeks and Lathrop, 1995). Alors que la première stratégie est très directe mais limitée aux gènes déjà connus, la seconde nécessite l'analyse d'un grand nombre d'individus génétiquement reliés (Schork, 1997). Lors du criblage de génomes entiers, des méthodes statistiques appelées analyses de liaison permettent d'identifier des régions du génome contenant potentiellement des gènes associés au phénotype d'intérêt. Les analyses de liaison s'avèrent puissantes lorsqu'un grand nombre d'individus est étudié, mais elles ne permettent pas toujours de détecter les gènes qui influencent de façon modeste le phénotype d'intérêt dans une population humaine (Risch and Merikangas, 1996). Pour réduire

la complexité génétique du problème, une des alternatives expérimentales est d'effectuer les analyses de liaison sur des croisements de modèles animaux consanguins qui présentent des différences pour le trait d'intérêt. En réalisant un criblage du génome entier des individus issus de la génération F2 de ces croisements, il est possible d'identifier des loci de traits quantitatifs (QTLs) liés au phénotype d'intérêt.

### 1.3.2 Identification de QTLs liés à la masse cardiaque

Certaines études visant à identifier des QTLs liés à la pression artérielle et à la masse cardiaque ont été réalisées sur des croisements de rats à la fois hypertrophiés et hypertendus. Bien que l'utilisation de tels croisements complique la situation pour l'identification de QTLs liés strictement à la masse cardiaque, quelques-unes de ces études ont permis de trouver des QTLs liés à la masse cardiaque indépendamment de l'hypertension.

Par exemple, l'analyse de liaison effectuée sur les rats issus de la génération F2 entre les SHR et les Donryu (normotendus) a permis d'identifier un locus qui est lié à la masse cardiaque sans être lié à la pression artérielle. Ce locus, *Lvm-1*, est situé sur le chromosome 2 des rats SHR (Innes et al., 1998).

Un autre croisement entre les SHR et les Lewis, des rats normotendus, a permis d'identifier un locus lié à la masse cardiaque (indépendamment de la pression artérielle) sur le chromosome 17 (Tsujita et al., 2000).

Enfin, le croisement entre les SHR et les *Brown Norway* (BN) a permis d'identifier un locus (*Drd1a*) lié à la masse cardiaque (indépendamment de la pression artérielle) sur le chromosome 17 (Pravenec et al., 1995).

Étant donné que l'utilisation de croisements de rats à la fois hypertrophiés et hypertendus complique la situation pour l'identification de QTLs liés strictement à la masse cardiaque, il est intéressant de chercher à identifier des déterminants de la masse cardiaque dans des croisements entre deux souches de rats présentant une tension artérielle normale.

Ainsi, dans une étude effectuée par Sebkhii et al., deux souches de rats normotendus et présentant une différence quantitative pour la masse moyenne du ventricule gauche ont été utilisées. L'analyse de liaison effectuée sur les rats issus

de la génération F2 entre les F344 et les WKY a permis d'identifier un QTL sur le chromosome 3 lié à la masse du ventricule gauche. Les auteurs notent que le gène de la prostaglandine synthase1 (Ptgs1) est situé dans cette région du génome (Sebkhi et al., 1999). Ptgs1 constitue un gène candidat intéressant selon eux puisque la prostaglandine synthase est impliquée dans la synthèse des prostaglandines vasoactives (Vane and Botting, 1993), qui elles-mêmes, peuvent induire l'hypertrophie des cardiomyocytes en culture (Lai et al., 1996). Cependant, aucune étude expérimentale n'a été effectuée pour confirmer le rôle possible de ce gène dans le développement de l'hypertrophie cardiaque.

Par ailleurs, une étude dans mon laboratoire d'accueil a utilisé un croisement effectué entre les WKY et les WKHA, deux souches de rats normotendus et présentant une différence quantitative pour la masse cardiaque, et a permis d'identifier des QTLs liés à la masse cardiaque et à l'ANF<sub>v</sub> sur le chromosome 5 (Deschepper et al., 2001).

### 1.3.3 Identification d'un gène candidat

Les cartographies génétiques permettent d'identifier les régions chromosomiques qui tendent à être partagées entre individus génétiquement reliés atteints et qui semblent différer de ceux non-atteints. Une fois ces régions identifiées, il reste encore à trouver le gène situé dans la région ciblée qui est responsable du trait phénotypique observé. Afin de considérer un gène comme candidat sérieux dans une analyse de liaison pour un phénotype, en plus d'être situé dans la région d'intérêt, ce gène doit posséder quelques caractéristiques (Deschepper et al., 2002b) :

- 1) ce gène doit présenter des différences moléculaires entre les deux souches parentales
- 2) les différences moléculaires doivent affecter soit le niveau d'expression, soit la fonction de la protéine produite, et ce, de façon consistante avec le phénotype observé entre les deux souches parentales
- 3) les différences d'expression ou de fonction de la protéine doivent avoir un impact fonctionnel sur le trait quantitatif

Lors de travaux effectués dans le laboratoire d'accueil, le criblage du génome des individus de la génération F2 du croisement entre les rats WKY et WKHA avait permis d'identifier une région d'intérêt sur le chromosome 5 associée à la masse du ventricule gauche. Il s'est avéré que cette région contenait un gène candidat de premier ordre : le gène *Nppa*, du précurseur de l'ANF (Deschepper et al., 2001). Ce gène candidat a pu être identifié puisqu'en plus d'effectuer l'analyse de liaison pour la masse du ventricule gauche, une analyse de liaison avait été effectuée pour l'ANFv et avait permis de détecter la présence d'un QTL pour ce trait sur le chromosome 5, dans la même région que le QTL détecté pour la masse cardiaque (Deschepper et al., 2001). Aussi, il avait précédemment été démontré par analyse de coségrégation qu'une faible ANFv était liée à une masse ventriculaire accrue dans les croisements entre WKY et WKHA (Deschepper et al., 2001).

Il est possible de considérer le gène *Nppa* comme un gène candidat sérieux. Des polymorphismes ont été identifiés dans une région du promoteur précédemment étudié pour son importance dans la transcription régulée du gène (Durocher et al., 1996) et (Deschepper et al., 2001) et ce, dans différentes espèces animales et différentes souches de rats. La figure 2 présente la séquence d'intérêt pour les souches WKY, WKHA et SD (Sprague Dawley), les derniers étant des rats non-consanguins couramment utilisés dans les laboratoires pour divers usages. Puisque ce polymorphisme affecte l'activité transcriptionnelle des promoteurs transfectés dans des cardiomyocytes en culture primaire, il pourrait être trouvé en partie responsable de l'expression différentielle du gène entre les différentes souches de rats (Deschepper et al., 2001).

		NK 2								TAAT-core								
	-94																	-78
SD (publ)	C	C	G	C	A	A	G	T	G	A	C	A	G	A	A	T	G	G
WKHA	C	C	G	C	A	A	G	T	G	A	C	A	G	A	A	T	G	G
WKY	C	T	G	C	A	A	G	T	G	A	C	A	G	A	A	T	G	G
human	C	T	G	C	A	A	G	T	G	A	C	A	G	A	A	T	G	G
mouse	C	T	G	C	A	A	G	T	G	A	C	A	G	A	A	T	G	G
bovine	C	T	G	C	A	A	G	T	G	A	C	A	G	A	A	T	G	G

**Figure 2 : Comparaison et alignements des séquences retrouvées près du polymorphisme C(-93)T dans le promoteur du gène *Nppa* de différentes espèces et diverses souches de rats (Durocher et al., 1996) et (Deschepper et al., 2001).**

Cet exemple illustre bien l'importance d'utiliser une combinaison d'intermédiaires phénotypiques lors de l'identification de gènes candidats après la détection d'un QTL (Deschepper et al., 2002b). Un phénotype intermédiaire (trait X de la figure 3 p. 17) peut être défini comme un trait qui résulte de l'expression d'un ou plusieurs gènes et qui contrôle en partie le trait complexe d'intérêt. L'identification de phénotypes intermédiaires, comme l'ANF dans l'exemple qui nous concerne, permet de réduire la complexité du modèle génétique et de favoriser l'identification de gènes qui contrôlent en partie un trait complexe.



**Figure 3 : Utilisation des phénotypes intermédiaires dans la recherche des déterminants génétiques de traits complexes. Adaptée de (Rapp, 1991).**

Dans le cas de l'étude de notre laboratoire, l'utilisation de la concentration ventriculaire en ANF comme phénotype intermédiaire a mené à l'identification du gène *Nppa* en tant que gène candidat sérieux. Ce résultat constitue le seul cas à ce jour où la détection d'un QTL a mené à l'identification d'un gène candidat sérieux dans la recherche de déterminants génétiques de l'hypertrophie cardiaque à l'aide de croisements animaux.

En effet, dans la recherche de gènes responsables de la variabilité des traits complexes, de multiples QTLs ont été détectés, mais peu de gènes candidats ont été identifiés jusqu'à maintenant (Rapp, 2000). Une analyse de la littérature révèle qu'il existe à ce jour deux exemples de nouveaux gènes clonés suite à la détection d'un QTLs (voir Flint et al., 2001 pour une revue).

- 1) Dans la tomate, le gène *ORFX* a été identifié après le séquençage et le clonage d'une région de 19 kb contenant un QTL précédemment détecté, responsable pour 30% de la variabilité du poids du fruit (Frary et al., 2000).
- 2) Chez la souris, le gène *Nramp1* a été identifié après une analyse de liaison pour associer un gène à l'immunité innée. La production de la carte génétique (Vidal et al., 1992) a précédé la génération d'une carte physique (Vidal et al., 1993) avant de mener à l'identification formelle et la caractérisation du gène candidat nommé *Nramp1* (Vidal et al., 1996).

Par ailleurs, d'autres recherches ont mené à l'identification de gènes qui avaient déjà été identifiés auparavant, ce qui a permis d'envisager leur rôle dans un nouveau phénomène (voir Flint et al., 2001 pour une revue).

- 1) Chez le rat, après la détection d'un QTL sur le chromosome 4 relié à des problèmes dans le métabolisme du glucose et des acides gras (Aitman et al., 1997), le gène *Cd36* (codant pour une translocase d'acides gras) a été impliqué dans les problèmes métaboliques mentionnés (Aitman et al., 1999). L'expression d'un transgène correspondant à l'allèle sauvage du gène *Cd36* dans les rats SHR, présentant les caractéristiques du syndrome humain de résistance à l'insuline, a permis d'améliorer l'état des animaux et ainsi d'apporter des preuves supplémentaires de l'implication de ce gène dans le métabolisme du glucose et des acides gras (Pravenec et al., 2001a).
- 2) Chez le rat, après la détection d'un QTL sur le chromosome 5 relié à l'occurrence d'anévrismes cérébraux, le gène de l'ANF a pu être impliqué dans la pathogenèse de ce phénomène (Rubattu et al., 1999).
- 3) Chez la souris, après la détection d'un QTL situé dans une région de 4cM, l'utilisation de la méthode de complémentation fonctionnelle (surexpression du gène candidat *Pla2g2a* dans un cosmide) a permis de relier ce gène (encodant une phospholipase A2, groupe IIA) au nombre de tumeurs intestinales observées (Cormier et al., 1997).
- 4) Chez un modèle murin pour l'asthme, après la détection de deux QTL situé sur le chromosome 2 liés à l'asthme allergique, une étude du profil d'expression sur tout le génome a permis d'associer le locus C5 (du système du complément) à la maladie (Karp et al., 2000).

### 1.3.4 L'utilisation de rats congéniques pour la dissection génétique de traits complexes

Les cartographies génétiques permettent d'identifier des régions chromosomiques associées à un phénotype, mais ne permettent pas d'établir des preuves de l'identité du QTL au niveau moléculaire (Schork, 1997). Les analyses de liaisons produisent des résultats statistiques seulement qui doivent être confirmés dans un deuxième temps à l'aide de la constitution de cartes physiques des régions d'intérêts. La génération de lignées congéniques permet aussi de raffiner la carte génétique générée par les analyses de liaisons et produire la carte physique nécessaire pour confirmer les résultats obtenus à l'aide de ces analyses. Des sous-lignées congéniques peuvent être ensuite produites pour délimiter encore plus la région qui porte le ou les gènes responsables du trait phénotypique observé. L'obtention d'une région assez petite pour effectuer un clonage positionnel par la suite est l'un des buts recherchés lors de la production de lignées congéniques (Rapp, 2000).

Les lignées congéniques sont obtenues en effectuant une série de croisements en retour entre une souche donneuse qui possède un gène ou une région génomique d'intérêt et une souche receveuse (Green, 1966), (Silver, 1995).

La répétition de plusieurs générations de croisements en retour permet d'obtenir des animaux hétérozygotes pour le locus d'intérêt et qui possèdent 99.90% du génome de la souche receveuse (Green, 1966), (Silver, 1995). Les animaux hétérozygotes ainsi obtenus doivent ensuite être croisés entre eux pour générer les individus homozygotes de la lignée congénique désirée. Une méthode dite rapide permet d'obtenir des lignées congéniques en seulement 5 croisements en retour et est parfois utilisée pour générer ces animaux (Lander and Schork, 1994), (Markel et al., 1997), (Wakeland et al., 1997).

À titre d'exemple, les paragraphes suivants font l'inventaire de plusieurs travaux qui ont utilisé des lignées congéniques pour disséquer le trait complexe qu'est l'hypertension artérielle.

En 1991, une étude à la recherche des gènes exprimés différemment chez les rats SHR et WKY avait permis l'identification d'un gène nommé *Sa* (Iwai and Inagami, 1991). Ce gène (dont la fonction précise est inconnue) présentait toutes

les caractéristiques pour être considéré comme un gène candidat relié à l'hypertension (Iwai and Inagami, 1991), (Patel et al., 1994), (Yang et al., 1996), (Iwai et al., 1992), (Lindpaintner et al., 1993), (Samani et al., 1993), (Harris et al., 1993), (Gu et al., 1996) et (Garrett et al., 1998). La génération de lignées congéniques et sous-congéniques contenant le gène *Sa* situé sur le chromosome 1 a permis de tester cette hypothèse. Les premières lignées générées ont permis de confirmer la présence de QTLs liés à la pression artérielle dans la région du gène *Sa* dans les croisements SHR X WKY (Iwai et al., 1998), (St Lezin et al., 1997) et (Frantz et al., 1998) et Dahl salt-sensitive (S) X Lewis (LEW) (Garrett et al., 1998). Les lignées sous-congéniques présentant une cartographie plus fine de la région ont par la suite exclu le gène *Sa* comme gène candidat pour la pression artérielle dans les croisements SHR X WKY (Frantz et al., 2001); SHRSP (SHR stroke-prone) X WKY (Hubner et al., 1999) et S X LEW (Saad et al., 1999).

L'équipe de recherche du Dr Rapp a utilisé différents croisements de rats pour détecter des QTLs lié à la pression artérielle. Les rats de souche Dahl salt-sensitive (S), Dahl salt-resistant (R), Lewis (LEW) et WKY ont été utilisés pour générer ces divers croisements. Les analyses de liaison effectuées à partir des animaux de la génération F2 de ces croisements a permis d'identifier des QTLs liés à la pression artérielle sur les chromosomes 1, 2, 3, 5, 9, 10 et 17. Des lignées congéniques pour chacun de ces QTLs ont été générées (Garrett et al., 1998), (Rapp et al., 1998) et (Cicila et al., 1999).

Après analyse de la lignée congénique générée à partir du QTL détecté sur le chromosome 1 (S X LEW) et génération de sous-lignées congéniques, l'existence de trois QTLs sur ce chromosome a pu être démontré (Saad et al., 1999) et (Saad et al., 2001). L'hypothèse de départ proposant le gène *Sa* comme gène candidat influençant la pression artérielle dans les croisements entre les rats S et LEW a été infirmée par la génération d'une sous-lignée congénique contenant le gène *Sa* en provenance de la souche WKY mais ne permettant pas de diminuer la pression artérielle de la souche receveuse S (Saad et al., 1999).

L'analyse des animaux générés à partir du QTL détecté sur le chromosome 10 (S X LEW) et la génération de sous-lignées congéniques pour cette région ont permis de démontrer l'existence de deux QTLs liés à la pression artérielle sur ce chromosome. Une analyse comparant les régions d'intérêt chez le rat et des régions de

séquences similaires chez l'humain sur lesquelles un QTL lié à la pression artérielle avait précédemment été identifié, suggère que ces deux QTLs, l'un chez le rat et le second chez l'humain, pourraient correspondre à une même région de synténie (Garrett et al., 2001).

La production d'une carte physique de très haute résolution à l'aide des lignées congéniques générées à partir du QTL détecté sur le chromosome 7 (S X R) a permis d'appuyer l'hypothèse selon laquelle le gène *Cyp11b1*, codant pour la 11 $\beta$ -hydroxylase et contenu dans la région ayant servi à la production des lignées congéniques, est un gène candidat sérieux pour la détermination de la pression artérielle. La génération de lignées sous-congéniques dans ce cas a permis de réduire la région d'intérêt à 0.54cM, qui correspond à 220kb. Cette région est contenue dans un seul *yeast artificial chromosome* (YAC) ce qui permettra des investigations futures afin de déterminer l'identité exacte du gène responsable de la variabilité dans la pression artérielle entre les deux souches de départ (Cicila et al., 2001).

Le croisement de deux lignées congéniques différentes (S X WKY), l'une ayant été générée à partir d'un QTL détecté sur le chromosome 2 et la seconde, à partir d'un QTL détecté sur le chromosome 10, a permis de prouver l'existence d'une interaction épistatique entre les deux QTLs rapportés (Rapp et al., 1998). Une telle interaction survient lorsqu'une variation d'un allèle à un locus influence l'effet d'un autre allèle à un autre locus. Cet exemple illustre l'importance d'étudier non seulement les gènes et les régions du génome impliqués dans un phénotype, mais aussi les interactions existant entre ces divers gènes et région.

L'équipe du Dr Deng a généré des lignées congéniques à partir des croisements entre les rats S et Milan Normotensive (MNS) pour tenter d'identifier des gènes liés à l'hypertension. L'analyse des valeurs de pression artérielle des animaux issus des sous-lignées congéniques générées a permis d'infirmer l'hypothèse selon laquelle le gène Na-K-ATPase alpha(1)-subunit (*Atp1a1*) aurait pu être lié à l'hypertension (Orlov et al., 2001).

Cette équipe a aussi généré plusieurs lignées et sous-lignées congéniques à partir des croisements entre les rats S et LEW pour tenter de réduire les régions des chromosomes 2, 10 et 16 qui contenaient des QTLs liés à la pression artérielle (Dutil and Deng, 2001a), (Dutil and Deng, 2001b), (Deng et al., 2001) (Moujahidine

et al., 2002). Les lignées générées pour réduire la région sur le chromosome 10 et en produire une carte physique l'ont été à l'aide de la méthode de génération de congéniques dite rapide (Deng et al., 2001). Cet exemple illustre l'applicabilité de cette méthode.

La génération de lignées congéniques par la méthode dite rapide a été utilisée aussi pour tenter d'identifier des gènes reliés à la pression artérielle par un autre groupe. Des lignées congéniques réciproques ont été générées à partir des croisements entre les rats WKY et SHRSP (*stroke-prone spontaneously hypertensive rat*) en introduisant des régions du chromosome 2 sur lequel deux QTLs liés à la pression artérielle avaient été détectés (Clark et al., 1996). Les lignées congéniques ont permis de confirmer la présence des deux QTLs sur le chromosome 2 liés à la pression artérielle (Jefferis et al., 2000).

Le travail effectué dans le laboratoire de recherche du Dr Pravenec avec les lignées congéniques issus de croisements entre les rats SHR et *Brown Norway* (BN) a permis de définir des régions contenant des QTLs liés à la pression artérielle sur les chromosomes 1 (St Lezin et al., 1997), 2 (Pravenec et al., 2001b), 4 (Pravenec et al., 1999) et (Pravenec et al., 2000) et 19 (St Lezin et al., 1999) et (Kren et al., 2000).

C'est avec l'aide des lignées congéniques générées pour la région du chromosome 4 que ce groupe a réussi à prouver que le gène *Cdc36* est impliqué dans les désordres métaboliques du glucose et des acides gras et la résistance à l'insuline chez les rats SHR (Pravenec et al., 2000).

L'équipe du Dr Jacob a développé une variante du système des rats congéniques dans le but d'accélérer les études futures des déterminants génétiques de l'hypertension dans le croisement entre les rats BN et S. Une série de rats consomiques réciproques pour les deux souches mentionnés a été générée : ces rats présentent le fond génétique d'une souche receveuse à l'exception d'un chromosome complet, en provenance de l'autre souche, la souche donneuse. Une fois que les rats consomiques sont générés, une grosse partie du travail est déjà effectué lorsque le but est l'obtention d'une lignée congénique qui concerne une région précise d'intérêt.

L'analyse des différentes lignées consomiques générées a permis de mettre en évidence l'existence d'un ou plusieurs locus sur le chromosome 13 en provenance de la souche BN ayant un effet protecteur contre les effets délétères d'une diète élevée en sel chez les rats S (Cowley, Jr. et al., 2001). Pour identifier la région plus précise contenant le ou les gènes protecteurs, il suffira de quelques croisements qui réduiront le pourcentage du génome en provenance de la souche receveuse sur le chromosome 13.

Les autres lignées consomiques sont maintenues et donc toujours disponibles pour de futures études, subséquentes à la détection d'un QTL lié à un phénotype d'intérêt sur un autre chromosome par exemple.

La génération de lignées de rats congéniques permet donc de définir et préciser les régions du génome associées à un phénotype particulier, régions précédemment détectées à l'aide d'analyses de liaisons sur des animaux issus de croisements F2 entre deux souches de départ présentant une différence quantifiable au niveau du phénotype. Les exemples décrits plus avant illustrent la puissance et la précision de cette méthode appliquée à la recherche des déterminants génétiques de l'hypertension.

## 1.4 Projet de recherche

Le laboratoire de biologie cardiovasculaire expérimentale du Dr Deschepper s'applique notamment à identifier les déterminants génétiques de l'hypertrophie cardiaque. Un QTL présent sur la bande 5q36 du chromosome 5 (associé à la fois à la masse cardiaque et à l'ANFv) a précédemment été détecté à l'aide d'une analyse de liaison sur les animaux mâles issus du croisement F2 entre les WKY et WKHA, deux souches de rats normotendus présentant une différence quantitative au niveau de la masse cardiaque. Un gène situé dans cette région, le *Nppa*, gène du précurseur de l'ANF, possède toutes les caractéristiques pour être considéré comme un gène candidat sérieux expliquant les différences phénotypiques observées entre les deux souches de départ. Pour tester l'hypothèse selon laquelle la région du chromosome 5 contenant le gène candidat *Nppa* est la région responsable pour la différence de masse cardiaque observée entre les rats WKY et WKHA, la génération des lignées congéniques réciproques pour cette région a été entreprise. La taille des cardiomyocytes isolés ainsi que le niveau d'ANFv ont été mesurés chez les mâles et les femelles congéniques et comparés aux valeurs mesurées chez les animaux des souches parentales WKY et WKHA.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Étapes générales pour la dissection d'un trait complexe : justification des méthodes utilisées

La dissection des traits complexes comme l'hypertrophie cardiaque a pour objectif l'identification de ses déterminants génétiques. Plusieurs étapes successives permettent l'atteinte de cet objectif : la production d'une carte génétique, l'identification de gène candidat et la production d'une carte physique de la région arborant le gène candidat.

#### 2.1.1 Production de la carte génétique

En premier lieu, une génération F2 à partir des individus des souches de départ est produite. Ensuite, le génome de ces individus est criblé avec une série dense de marqueurs génétiques. Les analyses de liaison subséquemment effectuées permettent de lier une région précise du génome au phénotype d'intérêt, de détecter un locus lié à la masse cardiaque (QTL).

##### 2.1.1.1 Production de la génération F2

Les modèles animaux utilisés doivent présenter des différences phénotypiques pour le trait étudié. Les rats WKHA présentent une hypertrophie du ventricule gauche et une faible ANF<sub>v</sub> par rapport aux rats WKY.

Une génération F2 à partir des individus WKY (W) et WKHA (A) a précédemment été produite. Le génome des individus de cette génération F2 présente des régions chromosomiques qui proviennent des deux souches parentales, chaque chromosome ayant subi une méiose durant laquelle le processus de recombinaison homologue a produit des réarrangements. Le génotype d'un locus de la génération F2 ne peut donc qu'être homozygote (WW ou AA) comme les souches de départ ou hétérozygote (WA). Pour chaque individus de cette génération (345 mâles et 335 femelles), différents tissus (rate, coeur incluant apex, ventricules droits et gauches)

ont été récupérés lors du sacrifice. Un échantillon d'ADN a pu être extrait de ces tissus; diverses valeurs comme le poids de l'animal et le poids des parties du coeur ont été mesurées.

Cette partie du travail constitue le point de départ du projet de recherche dans lequel s'inscrit mon projet de maîtrise et a été effectué avant mon arrivée au laboratoire.

#### 2.1.1.2 Criblage du génome entier

Le criblage de génome s'effectue à l'aide d'une série de marqueurs. Il existe différents type de marqueurs utilisés lors des études génétiques : les *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), les *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) et les *Simple Sequence Length polymorphism* (SSLP). Les SSLP ont été utilisés pour le projet détaillé ici. Ce sont des séquences de dinucléotides ou de trinucléotides répétés; leur longueur varie entre 100 et 350 paires de base. Ces séquences sont réparties à travers tout le génome et font partie des régions non-codantes de l'ADN. Un même SSLP peut être de longueur différente d'un individu à l'autre : on dit alors que ce marqueur est informatif ou polymorphe pour les individus étudiés. Les SSLP sont les marqueurs les plus fréquemment utilisés pour les études de coségrégation dans les populations F2. Un nombre de plus en plus grand de séquences bordant de part et d'autres les SSLP sur le génome du rat sont rendus disponibles par diverses institutions telles que le *Wellcome Trust for Human Genetics* et *The Whitehead/MIT Center for Genome Research*. Ces séquences servent à développer des paires d'oligonucléotides qui amplifient les SSLP lors une réaction de *polymerase chain reaction* (PCR). Les produits d'amplification de ces réactions de PCR des SSLP sont ensuite analysés sur des gels de séquences suivis d'une autoradiographie s'ils ont été marqués au [<sup>32</sup>P]γ-ATP (radioactif). L'analyse peut aussi être faite à l'aide d'un séquenceur automatique (à capillaires ou à gels) si un fluorochrome approprié a été incorporé aux réactions. Lorsque les paires d'oligonucléotides choisies sont polymorphes entre les souches de départ, ici WKY et WKHA, l'analyse des produits de PCR permet de déterminer la provenance parentale des différentes régions chromosomiques chez les individus de la génération F2 ou génotypes. Les marqueurs utilisés doivent être choisis

judicieusement de façon à couvrir le mieux possible toutes les régions du génome. Idéalement, les marqueurs choisis devraient être espacés de 20 cM (Markel et al., 1997). Cependant, lorsque les souches parentales de départ sont génétiquement très proches, comme c'est le cas pour les rats WKY et WKHA, il est parfois difficile de trouver des marqueurs également répartis sur tous le génome (Gigante et al., 2001). Pour couvrir le génome complet du rat avec des marqueurs espacés de 20cM, il aurait fallu soixante-quinze marqueurs (Steen et al., 1999). Pour l'étude dont il est question ici, cinquante-sept marqueurs hors de la région d'intérêt ont été utilisés (voir Tableau I, p.31) et quatorze marqueurs dans la région d'intérêt du chromosome cinq ont été utilisés (voir Figure 1 du manuscrit 2, p.74)

Un premier criblage du génome des rats mâles issus de la génération F2 entre les WKY et les WKHA avait été effectué avant mon arrivée au laboratoire. J'ai participé à la réalisation d'un second criblage qui portait sur un nombre sélectionné d'animaux de cette génération. Il a été démontré que la sélection des animaux présentant les valeurs phénotypiques extrêmes dans une population (25% supérieur et 25% inférieur) permettait de maximiser les contrastes génétiques et ainsi, de détecter des QTL avec une spécificité et une sensibilité comparable à une détection réalisée sur la population complète (Darvasi and Weller, 1992) et (Innes et al., 1998).

Dans le cadre de démarches visant une plus grande automatisation du processus de criblage de génome à l'aide de marqueurs SSLP, l'utilisation de marqueurs dit "à queue M13" a été optimisée. Ces marqueurs constituent une variante des marqueurs traditionnels : à l'un des deux marqueurs de la paire habituelle est ajouté la séquence M13 de dix-neuf nucléotides (Oetting et al., 1995) et (Steffens et al., 1993) (voir manuscrit 1 p.43). Un troisième marqueur (M13), qui présente la même séquence que celle de la queue M13, est ajouté à la réaction de PCR. C'est ce marqueur M13 qui est marqué soit au [ $^{32}$ P] $\gamma$ -ATP ou avec un fluorochrome.

### 2.1.1.3 Analyses de liaison

Lorsque le génotype des différentes régions du génome (ciblés par des marqueurs SSLP) a été identifié pour un nombre déterminé d'individus de la génération F2, il faut construire des groupes de liaison entre les différents marqueurs et calculer la

distance génétique qui les sépare. Les logiciels comme MapManager ont été développés pour réaliser ces calculs statistiques. Les calculs de distance sont basés sur les taux de recombinaison observés parmi les individus de la génération F2 entre les différents marqueurs utilisés. Plus deux marqueurs sont éloignés l'un de l'autre, plus le taux de recombinaison entre ces deux régions chromosomiques est élevé (et inversement). Un centiMorgan (cM) équivaut à 1% de recombinaison. Le logiciel calcule les distances entre les marqueurs à partir des génotypes fournis par le criblage du génome à l'aide des marqueurs SSLP. Ces calculs de distance permettent de regrouper les divers marqueurs en groupes de liaison et par chromosome. La carte résultante constitue la carte génétique.

Par la suite, il est possible de calculer une statistique de liaison à chaque position du génome pour détecter une liaison entre une région précise du génome et un phénotype d'intérêt. Le logiciel MapManager effectue ce calcul à partir des génotypes et des valeurs des phénotypes d'intérêt (poids des ventricules gauches et ANFv dans notre cas) entrés pour chaque individu de la génération F2. La variable statistique résultante des calculs effectués par Mapmanager est un *Likelihood ratio statistic* (LRS). Il est relié à la variable communément utilisée par les généticiens, le LOD-score, par un facteur de 4,6. Le LOD-score correspond au logarithme du rapport de la probabilité d'une liaison sur la probabilité que cette liaison survienne de façon aléatoire. Le degré de significativité de la liaison entre une région spécifique (QTL) et le phénotype d'intérêt est évalué en fonction de cette variable. On considère que lorsque ce ratio est supérieur à trois (ce qui signifie qu'il existe une chance sur mille que le phénotype observé ne soit pas lié à la région chromosomique en question), la liaison est considérée comme significative (Oetting et al., 1995).

### 2.1.2 Identification d'un gène candidat

La détection d'un QTL lié à un phénotype d'intérêt grâce à une carte génétique constitue le premier jalon du processus qui mène à l'identification d'un gène candidat.

### 2.1.2.1 Identification de SNP : séquençage du promoteur et du gène de l'ANF

Pour être considéré comme un gène candidat sérieux, un gène doit présenter des différences moléculaires entre les souches comparées. Le séquençage du promoteur et du gène *Nppa* chez les deux souches parentales WKY et WKHA a permis l'identification de différences moléculaires qui pourraient expliquer les différences phénotypiques observées entre ces souches (Deschepper et al., 2001).

### 2.1.3 Production de la carte physique

Les cartographies génétiques permettent d'identifier des régions chromosomiques associées à un phénotype, mais ne permettent pas d'établir des preuves de l'identité du QTL au niveau moléculaire (Schork, 1997). Les analyses de liaisons produisent des résultats statistiques seulement qui doivent être confirmés à l'aide de la constitution de cartes physiques des régions d'intérêts.

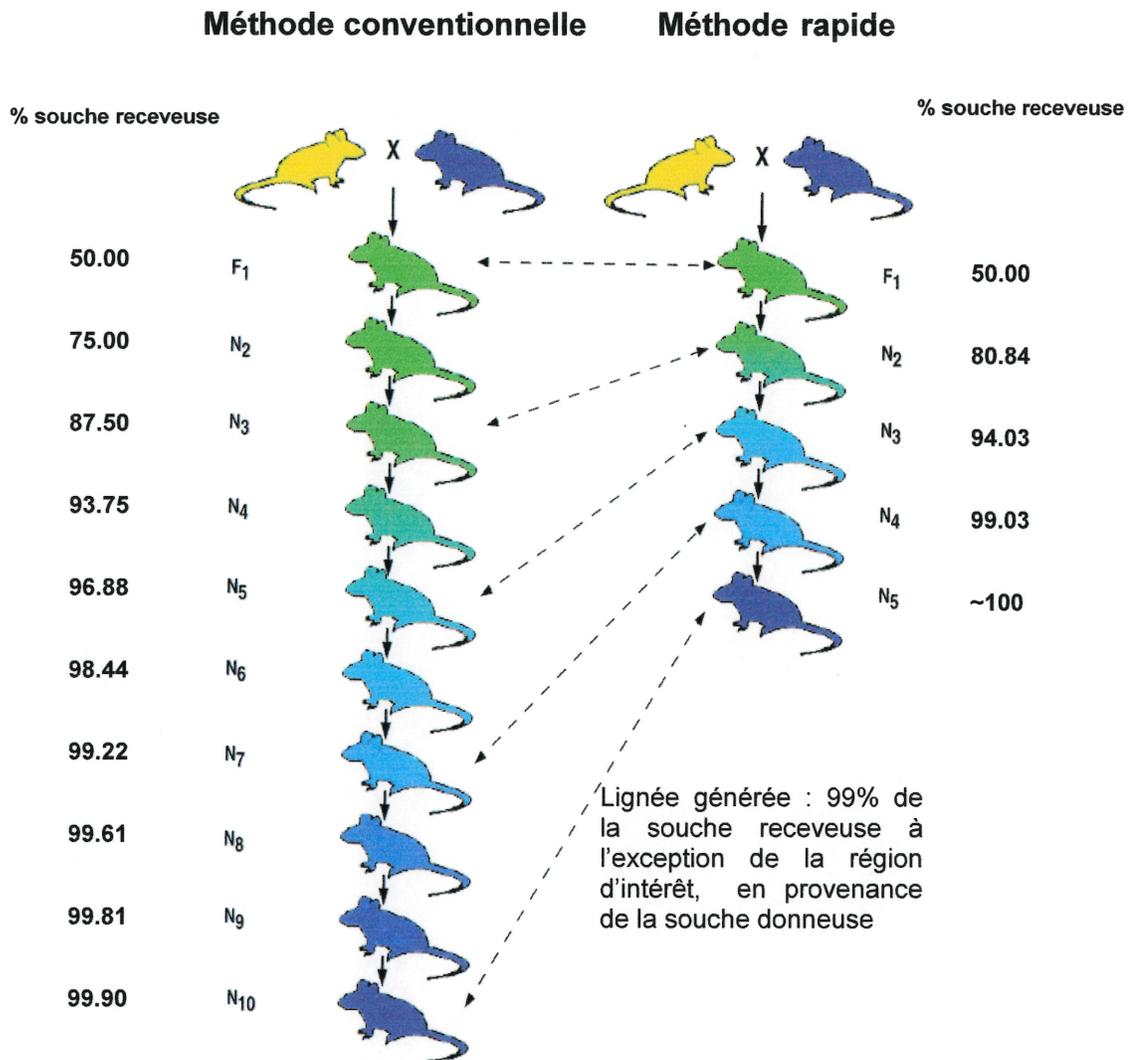
#### 2.1.3.1 Génération de congéniques

La génération de lignées congéniques permet de raffiner la carte génétique générée par les analyses de liaisons et produire la carte physique nécessaire pour confirmer les résultats obtenus à l'aide de ces analyses. Des sous-lignées congéniques peuvent être ensuite produites pour délimiter encore plus la région qui porte le ou les gènes responsables du trait phénotypique observé.

Les lignées congéniques sont obtenues en effectuant une série de croisements en retour entre une souche donneuse qui possède un gène ou une région génomique d'intérêt et une souche receveuse (Green, 1966), (Silver, 1995). Selon les lois de la génétique telles que définies par Mendel, la moitié du matériel génétique restant hors de la région d'intérêt sera transmise à la génération suivante, et cela, à chaque génération. Dix générations de croisements en retour permettent d'obtenir des animaux hétérozygotes pour le locus d'intérêt et qui possèdent 99.90% du génome de la souche receveuse (Green, 1966), (Silver, 1995). Les animaux hétérozygotes

ainsi obtenus doivent être croisés ensemble pour générer les individus homozygotes de la lignée congénique désirée.

Afin de réduire considérablement le temps de génération de telles lignées, il est théoriquement possible de sélectionner à chaque génération le mâle qui présente le plus haut pourcentage de génome en provenance de la souche receveuse (figure 4 p. 30.) (Lander and Schork, 1994).



**Figure 4 : Génération de lignées congéniques : comparaison de la méthode conventionnelle et de la méthode dite rapide (Adapté de (Markel et al., 1997)).**

Au cours de la production des lignées congéniques selon la méthode rapide, les marqueurs SSLP peuvent être utilisés non seulement pour suivre la transmission de la région d'intérêt d'une génération à l'autre, mais aussi pour cribler le génome complet des mâles de chaque génération. Les marqueurs qui ont été utilisés à cette fin dans l'étude dont il est question ici sont détaillés dans le tableau I (p. 31).

Marqueur	Chromosome	Marqueur	Chromosome	Marqueur	Chromosome
D1Mgh13	1	D7rat24	7	IGFBP	14
D1Mgh2	1	D7Rat34	7	D15Mgh2	15
D1Rat745	1	D8Mgh4	8	D15Mgh6	15
D1Rat236	1	D8Rat85	8	D15Rat26	15
D2Mgh10	2	D8Wox4	8	D16Mgh1	16
D2Mgh12	2	D9rat2	9	D16Wox1	16
D2Mgh4	2	D9Rat34	9	D16Wox9	16
D2Mgh14	2	D10Mit1	10	D17Mit3	17
D2Mit5	2	D11Mgh3	11	D17Rat12	17
D3Wox3	3	D11Mit1	11	D17Rat99	17
D3Mit8	3	D12Mgh1	12	D17Wox20	17
D3Wox2	4	D12Rat1	12	D18Rat8	18
ENO2	4	D12rat65	12	D18Mgh1	18
D5Mgh1	5	D12Arb13	12	D19Mit5	19
D5Mgh3	5	D13Mit4	13	D19Mit7	19
D6Rat108	6	D13Wox6	13	D19Rat2	19
D7Mgh10	7	D14Mit5	14	D19Rat20	19
D7Mit10	7	D14Wox15	14	D20Mgh4	20
D7Mit12	7	CSNA	14	D20Rat20	20

**Tableau I : Marqueurs SSLP utilisés pour cribler le génome complet des rats mâles de chaque génération lors de la production des lignées congéniques par la méthode rapide.**

**Cinquante-sept marqueurs hors de la région d'intérêt ont été utilisés.**

L'applicabilité de cette méthode dite rapide, a été démontrée et a permis d'obtenir des lignées congéniques après cinq croisements en retour (Markel et al., 1997) et (Wakeland et al., 1997). Le tableau II (p.32) montre le pourcentage du génome en provenance de la souche receveuse (pourcentage de l'homozygoté du fond génétique) pour les cinq générations de croisement en retour nécessaires. À chaque génération, environ 200 mâles ont été criblés pour déterminer la provenance de la région d'intérêt. Le criblage complet du génome de 20 de ces mâles (ceux qui présentaient la région en provenance de la souche désirée) a été réalisé.

Lignée	Génération	% moyen théorique de l'homozygoté du fond génétique	% moyen obtenu de l'homozygoté du fond génétique	% obtenu de l'homozygoté du meilleur mâle
WKY.WKHA-(D5Rat173-D5Mgh16)	F1	50.00	50.00	50.00
	N2	80.84	78.02	84.21
	N3	94.03	92.05	96.49
	N4	99.03	98.02	100
	N5	~100	100	100
WKHA.WKY-(D5Rat45-D5Rat245)	F1	50.00	50.00	50.00
	N2	80.84	82.40	87.71
	N3	94.03	94.89	100
	N4	99.03	99.98	100
	N5	~100	100	100

**Tableau II : Comparaison des pourcentages moyens de l'homozygoté des fonds génétiques théoriques et obtenus pour chaque génération de lignées congéniques produites.**

Le pourcentage obtenu de l'homozygoté du fond génétique est le pourcentage des marqueurs détaillés dans la table 1 qui étaient homozygotes (souche receveuse). Les pourcentages moyens obtenus sont comparables à ceux théoriques, tel que calculés par Lander et al. (Lander et al., 1987) pour les cinq générations de croisement en retour nécessaires à la génération des quatre lignées congéniques produites. Le « meilleur mâle » est le rat qui présentait le plus haut pourcentage d'homozygoté en provenance de la souche receveuse dans une génération et c'est celui qui a été sélectionné pour devenir le mâle reproducteur de la génération suivante.

## 2.1.4 Observation des phénotypes

Une fois les animaux congéniques obtenus, il est intéressant de comparer les phénotypes d'intérêt avec les phénotypes présentés par les individus des souches de départ. Dans l'étude décrite ici, la ANFv et l'hypertrophie du ventricule gauche (évaluée selon la mesure du ratio largeur/longueur des cardiomyocytes isolés) sont les phénotypes comparés.

### 2.1.4.1 Concentration ventriculaire en ANF

Un radioimmunoessai (RIA) développé précédemment (Gutkowska et al., 1987) permet de mesurer la concentration en ANF dans les tissus cardiaques. L'apex est la partie du cœur choisie pour mesurer l'ANFv puisque c'est la section du ventricule gauche la plus éloignée des oreillettes, sources de contamination probable.

### 2.1.4.2 Cardiomyocytes isolés

L'hypertrophie cardiaque peut résulter d'une augmentation du nombre de cellules dans le cœur ou d'une augmentation du volume des cardiomyocytes. Il a précédemment été démontré que la différence de masse cardiaque observée entre les rats mâles WKY et WKHA était due à une augmentation de la largeur des cardiomyocytes en provenance des cœur de rats WKHA comparé à celle des rats WKY, résultant en un volume cardiaque augmenté chez le WKHA (Deschepper et al., 2001). Ces observations avaient été faites après isolement des cardiomyocytes adultes par une technique qui permet de conserver le volume comparé des cellules (Deschepper et al., 2001).

Des mesures de longueur et de surface permettent de calculer les valeurs de largeur et de volume des cardiomyocytes lorsque l'on tient compte de la forme elliptique de la section transverse caractéristique de ces cellules (Gerdes et al., 1994).

## 2.2 Matériel et méthodes détaillés

### 2.2.1 Animaux

Toutes les expérimentations effectuées sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) et ont été menées en suivant les lignes directrices du *Canadian Council on Animal Care*. La nomenclature des lignées et souches suit les recommandations du *International Rat Genetic Nomenclature Committee*. Les rats WKHA/Cfd proviennent d'une colonie gérée à l'IRCM, telle qu'enregistrée au *Institute of Laboratory Animal Resources*. Les rats WKY/Cfd proviennent aussi d'une colonie gérée à l'IRCM et sont les descendants de parents WKY/Cr en provenance de Charles River (St. Constant, Québec, Canada). Les animaux adultes ont été regroupés (2 à 3 par cage); leur accès à l'eau et la nourriture était illimité. Pour cette étude, tous les animaux ont été utilisés lorsqu'ils avaient atteint l'âge de 12 semaines.

### 2.2.2 Expérimentation sur les animaux

Le jour de la récupération des tissus, chaque animal a été pesé pour déterminer son poids corporel. Les rats ont ensuite été tués par décapitation et les cœurs ont été récupérés. Une dissection systématique a permis de séparer les ventricules droits des gauches et de diviser les ventricules gauches en trois sections : l'apex, la partie du ventricule qui contient le septum et celle qui contient la paroi externe du cœur. Chaque partie a été débarrassée du sang résiduel et pesée individuellement. Ces mesures ont permis de dériver un ratio poids du ventricule gauche/poids corporel. Les tissus ont ensuite été congelés dans l'azote liquide et conservés à -70°C pour analyses subséquentes.

### 2.2.3 Croisements génétiques et analyses statistiques

Une génération F2 de 345 mâles et 141 femelles avait précédemment été obtenue par croisement entre les rats WKY et WKHA. Une analyse génétique sur le chromosome 5 (10 marqueurs) avec les échantillons d'ADN des mâles de la génération F2 avait permis de montrer la présence d'un QTL lié à la fois à la masse cardiaque et à l'ANFv. Une analyse génétique sur le chromosome 5 avec les échantillons d'ADN des femelles de la génération F2 a été réalisé. Les cartes génétiques et les analyses de QTL ont été réalisées grâce aux analyses effectuées à l'aide du logiciel Map Manager QTXb15 (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA).

### 2.2.4 Stratégie de croisements pour la génération de lignées congéniques

Des rats mâles WKY (souche receveuse) et femelles WKHA (souche donneuse) ont été accouplés pour produire une génération F1. Quelques mâles de cette génération ont été accouplés avec des femelles WKHA pour produire la première génération de reproducteurs potentiels (N2). Les rats de la génération N2 ont été génotypés avec quatre marqueurs situés dans la région d'intérêt du chromosome 5. Les mâles de cette génération qui étaient hétérozygotes WKY/WKHA pour cette région ont été sélectionnés. Le génome de ces rats a été criblé (57 marqueurs) pour déterminer son pourcentage d'homozygotie en provenance de la souche receveuse. Les rats mâles de la génération N2 qui étaient hétérozygotes WKY/WKHA pour la région d'intérêt et qui présentaient le plus haut pourcentage de la souche receveuse WKY dans le reste de leur génome ont été sélectionnés pour devenir les mâles reproducteurs de la prochaine génération. Ces reproducteurs ont été accouplés avec des femelles de la souche donneuse WKHA et la génération N3 a vu le jour. Les mâles de la génération N3 ont été génotypés de la même façon que ceux de la génération N2. Le processus a été reproduit jusqu'à l'obtention d'une génération N5. Les animaux de cette génération étaient homozygotes WKY/WKY (souche receveuse) à l'exception de la région d'intérêt sur le chromosome 5, pour laquelle ils étaient hétérozygotes WKY/WKHA. Une comparaison entre les pourcentages théoriques d'hétérozygotie attendus pour

chaque génération selon le mode de génération des lignées conventionnel ou rapide est indiquée dans la figure 4.

Pour établir une lignée congénique, les mâles et les femelles de la génération N5 ont dû être accouplés pour générer des individus homozygotes WKHA/WKHA pour la région d'intérêt.

La même stratégie de croisements a été appliquée pour générer la lignée congénique réciproque i.e. des animaux homozygotes WKHA/WKHA (dans ce cas-ci, la souche receveuse) à l'exception de la région d'intérêt sur le chromosome 5, pour laquelle ils étaient homozygotes WKY/WKY (souche donneuse). Quatre lignées congéniques ont ainsi été produites : WKY.WKHA-(D5Rat173-D5Mgh16), WKY.WKHA-(D5Rat45-D5Rat245), WKY.WKHA-(D5Rat28-D5Rat245) et WKHA.WKY-(D5Rat45-D5Mgh16).

### 2.2.5 Analyses à l'aide des marqueurs SSLP

Les analyses à l'aide des marqueurs SSLP ont été effectuées sur les échantillons d'ADN en provenance : des animaux mâles (182) et femelles (141) sélectionnés de la génération F2 issus du croisement des rats consanguins WKY et WKHA; ainsi que des animaux mâles de chaque génération menant à la production des lignées congéniques.

L'ADN génomique de chaque animal a été extrait à partir de bout de queue avec le *QIAamp tissue kit* (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). L'amplification des SSLP polymorphes sur l'ADN génomique a été effectuée par PCR. Dans certains cas, les paires traditionnelles de marqueurs SSLP marqués au [<sup>32</sup>P]γ-ATP ont été utilisés lors de l'amplification; dans d'autres cas, les marqueurs M13 et à queue M13 ont été utilisés.

Pour chaque réaction, 100 ng de l'ADN génomique ont été utilisés. Les réactions ont eu lieu dans des tubes de 200 µL qui contenaient 0.1 U de polymérase d'ADN *Taq* (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, et 0.2 mM de dNTPs dans un volume final de 10 µL.

Lorsque les marqueurs traditionnels ont été utilisés, le marqueur sens a d'abord été marqué au [<sup>32</sup>P]γ-ATP par une réaction avec la T4 polynucléotide kinase (Life

Technologies). Cet oligonucléotide marqué a été incorporé dans la réaction (1.5pmol) avec l'oligonucléotide droit (1.5 pmol).

Dans d'autres réactions, selon la disponibilité de la technologie et l'avancement de l'optimisation des conditions, les marqueurs M13 et à queue M13 ont été utilisés. Les marqueurs M13 auxquels était lié les fluorochromes IRDye700 ou IRDye800 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) ou les fluorochromes WellRED D2, D3, ou D4 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) (1.5 pmol) selon l'appareil utilisé, l'oligonucléotide sens à queue-M13 (0.1 pmol), et l'oligonucléotide antisens (1.5 pmol) (Research genetics, Huntsville, AL, USA) ont été ajoutés à la réaction.

Quels que soient les marqueurs utilisés, les amplifications se sont déroulées au cours de 30 cycles de dénaturation (94°C), d'hybridation (50°C) et d'extension (72°C).

Après l'amplification, l'analyse des produits de PCR a été effectuée de trois façons différentes, selon les marqueurs utilisés au cours de la réaction.

Les produits de PCR marqués au [<sup>32</sup>P]γ-ATP ont été chargés sur des gels de séquence et analysés après une autoradiographie de 24 heures.

Les produits de PCR marqués au fluorochromes WellRED D2, D3, ou D4 (Beckman Coulter) ont été regroupés (jusqu'à neuf différents produits, trois longueurs et trois fluorochromes). Les produits ont dû être déssalés. Les plaques MultiScreen-FB (Millipore, Bedford, MA, USA) utilisées pour ce faire ont été pré-humidifiées avec du tampon d'attachement (guanidine-HCl (7 M) et 2-(N-morpholino) acide éthanesulfonique (200 mM), pH 5.6), les produits de PCR regroupés (mélangés avec du tampon d'attachement selon un ratio 1:1) ont été chargés sur les puits. Une centrifugation à 1000× g de 5 minutes a permis au liquide de traverser la membrane des puits. Les puits ont été lavés deux fois avec de l'éthanol à 80%, et le produits d'ADN a été élué avec 50 µL de tampon TE (0.1 mM EDTA et 10 mM Tris-HCl, pH 8.0). Quinze microlitres de l'éluat ont été mélangés avec 25 µL de formamide déionisée et 0.5 µL de standard de poids moléculaire (Beckman Coulter) marqué avec le fluorochrome WellRED D. Le tout a été chargé et analysé dans les capillaires du séquenceur automatique CEQ. 2000XL (Beckman Coulter).

Les produits de PCR marqués au fluorochromes IRDye700 ou IRDye800 (Li-Cor) ont été regroupés (jusqu'à six différents produits, trois longueurs et deux fluorochromes). À dix microlitres des produits de PCR regroupés, ont été ajoutés dix microlitres de tampon de chargement (Li-Cor); 0.5 microlitres de ce mélange a

été chargé sur le gel du séquenceur automatique *dna sequencer long readir 4200* (Li-Cor). 0.8 microlitres des marqueurs de poids moléculaires 50-350 pb (Li-Cor) ont été ajoutés dans certains puits prédéterminés sur le gel (6 puits de standard de poids moléculaire pour un gel de 64 puits au total). L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel GenElmagIR 4.0 (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA, Canada).

### 2.2.6 Quantification de l'ANF

Les apex des ventricules gauches récupérés ont été réduits en poudre et pesés dans l'azote liquide pour être ensuite bouillis pendant 5 minutes dans 2 mL de 0.2 mol/L d'acide acétique. Ces extraits ont été centrifugés à 30 000g durant 20 minutes. L'ANF<sub>v</sub> a été mesurée dans des aliquots du surnageant de 5 µL lors d'un radioimmunoessai (RIA) (Gutkowska et al., 1987).

Tout d'abord, l'iodation d'une quantité du peptide biologiquement actif de l'ANF (ANF(99-126)-portion C-terminale) de rat a été réalisée. L'iodination s'est déroulée à 4°C. L'ANF (5 µg dans 10µl) a été introduite dans un vial. 20µl de 0.05M tampon phosphate et le Na<sup>125</sup>I (1mCi dans 40µl) ont été ajoutés et mélangés. Ensuite, 20µl de chloramine-T (0.5 mg par ml) (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, USA) ont été ajoutés et mélangés.

Ce mélange a été ajouté à un vial contenant 10mL de tampon phosphate (0.05M) contenant du BSA (0.1%) et 35mg de poudre vycor 7930 (Corning Life Sciences, Acton, MA, USA), utilisée pour l'extraction du peptide marqué. Le tout a été agité durant 10 minutes, et ensuite centrifugé 5 minutes à 3000 rpm. Le surnageant a été aspiré et le culot a été lavé deux fois avec 5 ml d'eau distillée. L'ANF adsorbé a été élué avec 2 ml d'acétone 60% dans du HCL 0.05M.

Le RIA a été réalisé dans le tampon suivant : 0.1M de tampon sodium phosphate, pH 7.4 contenant 0.3% de NaCl, 0.1% de BSA (Serologicals proteins Inc., Kankakee, Illinois, USA) et 0.1% de Triton X-100 (ACP chemicals, Montréal, Québec, Canada).

Une solution mère d'ANF (10 pmol dans 2 ml) a été utilisée pour préparer les standards. Les standards sont une série de dilutions (1 :2) dans du tampon à RIA (3.9 à 3900pg par ml).

Une dilution de l'anticorps 17/12 (1:13 000) a été préparé dans du tampon à RIA juste avant la réalisation de l'essai. Cet anticorps avait été préalablement préparé par le Dr Thibault à partir du peptide actif de l'ANF (ANF(99-126)) de rat par injection dans un lapin et purification sur colonne d'affinité.

100µl des standards ou 100µl des inconnus (5µl et 10µl dans 95µl ou 90µl de tampon à RIA) ont été introduits dans des tubes à compteur gamma. 100µl de l'anticorps 17/12 dilué ont été ajoutés et mélangés. Le mélange a été incubé durant 24 heures à 4°C. 100µl de <sup>125</sup>I-ANF (6000cpm dans du tampon à RIA) ont été ajoutés, mélangés et le tout a été incubé durant 24 heures à 4°C. La précipitation de ce qui était resté lié à l'anticorps 17/12 a été réalisée par l'ajout de 100µl de gamma globuline anti-lapin (1 :50) et de 100µl de NRS (*Normal Rabbit Serum*) (1 :35). Le mélange a été incubé durant 2 heures à 25°C. 1 ml de Carbowax polyéthylène glycol 8000 (6.25%) (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) a été ajouté, mélangé et le tout a été centrifugé durant 20 minutes à 4000rpm. Le surnageant a ensuite été retiré et la quantité de radioactivité contenue dans le culot a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma automatique LKB-Wallac CliniGamma 1272 (Wallac, Oy, Finlande).

L'ANFv mesurée dans l'apex des animaux sacrifiés est exprimée en fmol/mg de tissu.

### 2.2.7 Isolement des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ont été isolés des cœurs de 5 rats mâles et 5 rats femelles de 12 semaines des souches et lignées suivantes : WKHA, WKY, WKY.WKHA-D5Wox10/D5Rat245, WKHA.WKY-D5Rat173/D5Rat245 et WKHA.WKY-D5Wox10/D5Rat245. Les animaux ont été anesthésiés et injectés intrapéritonalement avec 500 U d'héparine sulfate. Les cœurs ont été rapidement enlevés des animaux et les cardiomyocytes Ca<sup>2+</sup>-tolérants en ont été isolés selon la méthode Langendorff (perfusion aortique rétrograde). Les cœur installés sur l'aiguille reliée au système de reperfusion ont été rincés (4 mL/min) pendant 5 minutes dans une solution Krebs-Henseleit (KH) (contenu en mmol/L : NaCl 118; KCl 4.7; CaCl<sub>2</sub> 1.25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25; et dextrose 11) à 37°C. Une solution KH à 37°C sans Ca<sub>2+</sub> a ensuite été utilisée pour arrêter les

battements cardiaques spontanés (5 minutes). Les cœurs ont été perfusés pendant 20 minutes avec du tampon KH à 37°C contenant 0.05% de collagénase (CLS2, Worthington Biochemical Corp, USA) et 0.03% de hyaluronidase. Les ventricules ont ensuite été séparés des oreillettes, émincés et incubés à 37°C avec agitation pendant 10 minutes dans du tampon KH contenant de la trypsin (0.2 mg/mL) et de la DNase I (0.2 mg/mL). La suspension cellulaire a ensuite été filtrée à travers un filtre swinnex-25 (Millipore, Bedford, MA, USA), et centrifugée à 1000g. Les cellules ont été diluées dans une solution de lavage (milieu199/KH, 1:1) et déposées sur 10mL d'un gradient de BSA (*Bovine Serum Albumine*) 6% pour séparer les cardiomyocytes des non-cardiomyocytes.

Les cardiomyocytes ainsi isolés ont été fixés pendant 20 minutes dans un tampon phosphate 0.08 M contenant de la glutaraldéhyde à 1.5%, et lavés avec du tampon phosphate 0.15 M. Les cellules ont été conservées dans ce dernier tampon à 4°C.

#### 2.2.8 Mesure des cardiomyocytes isolés

Des cardiomyocytes fixés ont été déposés dans des pétris contenant du tampon phosphate 0.15 M. Des images de ces cellules ont été examinées avec un microscope Zeiss Axiovert relié à une videocamera. Le logiciel Northern Eclipse version 6.0 à été utilisé pour mesurer la longueur et la surface des cellules (~100 cellules ( $\pm 5$ ) par animaux étudiés). Ces mesures ont permis la détermination d'un ratio largeur/longueur des cardiomyocytes isolés.

## **CHAPITRE 3 : MANUSCRIT 1**

### **3.1 Contribution au manuscrit 1**

Une partie du travail effectué au cours de ma maîtrise a eu comme objectif le développement d'une méthode plus efficace, rapide et peu coûteuse pour réaliser le criblage de génomes. Ce manuscrit 1 fait état des résultats obtenus à l'aide des marqueurs M13.

J'ai effectué la majorité du travail de laboratoire détaillé dans ce manuscrit incluant les amplifications par PCR (marqueurs avec ou sans queues M13), le marquage des marqueurs au [ $^{32}\text{P}$ ] $\gamma$ -ATP, la réalisation des gels de séquences et des autoradiographies. J'ai contribué de façon significative à l'analyse des résultats produits.

Je remercie les co-auteurs du manuscrit pour leur contribution au travail réalisé.

Marco Raposo était au moment de la production de ces résultats le technicien en charge des opérations du service de biologie moléculaire de l'IRCM. Il a, à ce titre, opéré l'appareil permettant l'analyse des échantillons marqués avec les fluorochromes utilisés. Ensemble, nous avons mis au point le génotypage sur cet appareil.

Dr Raymond est la responsable du service de biologie moléculaire; elle a su prodiguer conseils et critiques autant pour le travail de laboratoire réalisé avec les appareils du service que pour la rédaction du manuscrit.

Dr Deschepper, mon directeur de maîtrise, a dirigé les travaux lors de la production de ces résultats. Il a permis la réalisation de ce manuscrit grâce à ses idées originales pour l'utilisation des marqueurs M13, ses suggestions techniques pertinentes et ses analyses des résultats toujours critiques. Il a de plus supervisé la rédaction du texte du manuscrit.

**3.2 M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods.**

**I. B-Ganache, M. Raposo, M. Raymond, and C.F. Deschepper**

*Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, Canada*

Received 5 January 2001; accepted 11 April 2001.

Publié dans : *Biotechniques* 2001 Jul;31(1):24-6, 28.

Microsatellite analysis, also referred to as simple sequence length polymorphism (SSLP) or short tandem repeat polymorphism (STRP), is a widely used technique for genome-wide mapping projects. As the number of primer pairs that become available for an evergreater variety of organisms increases, the usage and applicability of this tool grow. The principle of the technique is to use primer pairs that flank repetitive DNA sequences to amplify samples of genomic DNA and to examine the size of the amplified alleles on a sequencing device. Despite the increasing availability of automatic sequencers in research facilities, a large majority of laboratories still analyze microsatellites "manually". This involves labeling one of the two PCR primers (usually the forward one) with [ $^{32}\text{P}$ ] $\gamma$ -ATP and further analysis of the amplified alleles on acrylamide sequencing gels. The use of an automatic sequencer might greatly increase genotyping output. However, such sequencers require labeling one of the primers of each pair with a dye that is compatible with its laser recognition system. Given the cost of fluorescently labeled primers, it becomes prohibitively expensive to use an automatic sequencer for a project that involves hundreds of markers.

One possible alternative is M13-tailed primers, where every forward primer is 5'-tailed with the M13 sequence 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3' (2,3). The M13-forward primers are used in combination with an M13 primer that has the same sequence but is dye-labeled at its 5' end. The latter primer is the sole source of label and can be used with any M13-forward primer to generate a labeled amplified allele. M13-tailed primers, which can be obtained inexpensively either from vendors or by custom synthesis, have previously been shown to amplify infrared dye-labeled alleles that can be analyzed on an IR2 Automated DNA sequencer (LI-COR, Lincoln, NE, USA) automatic sequencer (2). However, it has not been shown how the pattern of alleles amplified with M13 primers compared to that of untailed primers or whether the technique was applicable to dyes used with other automatic sequencers.

To answer these questions, we first compared the patterns of alleles amplified with primers (with or without M13 tailing) end-labeled with [ $^{32}\text{P}$ ] $\gamma$ -ATP and T4 polynucleotide kinase. For each reaction, we used 125 ng genomic DNA from two separate inbred strains of rats (strains A and B). Reactions were run in 200- $\mu\text{L}$  tubes containing 0.1 U *Taq* DNA polymerase (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 0.2 mM dNTPs in a total volume of 10  $\mu\text{L}$ . In preliminary

experiments, for reactions with M13-tailed primers, we found that a 15:1 molar ratio of labeled M13 primer versus a M13-tailed forward primer was optimal to generate a labeled amplified allele. Thus,  $^{32}\text{P}$ -labeled M13 primer (1.5 pmol), unlabeled M13-tailed forward primer (0.1 pmol), and reverse primer (1.5 pmol) were also added to the reaction tubes. For reactions with untailed primers, each tube contained  $^{32}\text{P}$ -labeled untailed forward primer (1.5 pmol) and reverse primer (1.5 pmol). After 30 cycles of amplification, including denaturing at  $94^\circ\text{C}$ , annealing at  $50^\circ\text{C}$ , and extension at  $72^\circ\text{C}$ , the products of PCR amplification were separated on a 6% acrylamide gel under denaturing conditions and visualized by autoradiography after overnight exposure (Figure 1). Products amplified by M13-tailed primers were matched by equivalent bands in the autoradiograms of products amplified by untailed alleles but were 19 nucleotides longer and, thus, migrated slower. However, the products of amplifications with untailed primers also displayed a much greater abundance of additional artifactual bands than when amplifications were performed with M13-tailed primers. Thus, the addition of the M13 tail resulted in much improved specificity, and this observation held true for more than 40 markers that amplified products containing dinucleotide repeats. As a result, general readability was greatly improved, which makes it much more feasible to do multiplex loading. We have observed that the products of at least three different reactions migrating at three different positions could be routinely loaded on single lanes. These benefits can be harvested even when alleles are analyzed manually on standard sequencing acrylamide gels. The technique has the additional advantage of necessitating the preparation of only one labeled primer that can then be used in combination with any other M13-tailed forward primer.

We then tested whether the method could be extended to analysis on an automatic capillary sequencer. Three M13 primers end-labeled with WellRED fluorescent dyes D2, D3, and D4 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) were ordered from Research Genetics (Huntsville, AL, USA). These primers were used for the amplification of labeled alleles using the same protocol described previously for  $^{32}\text{P}$ -labeled primers. After amplification, the PCR products were pooled (i.e., up to nine different products, three size ranges, and three dyes). For desalting, wells of a MultiScreen.-FB filter plate (Millipore, Bedford, MA, USA) were pre-wetted with binding buffer [7 M guanidine-HCl and 200 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, pH 5.6], the pooled PCR products were then mixed in a 1:1 ratio with binding

buffer and loaded onto individual wells by centrifugation at  $1000\times g$  for 5 min. The wells were then washed twice with 80% ethanol, and the products were eluted with 50  $\mu\text{L}$  TE buffer (0.1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl, pH 8.0). Fifteen microliters of eluate were mixed with 25  $\mu\text{L}$  deionized formamide and 0.5  $\mu\text{L}$  size standards (Beckman Coulter) labeled with WellRED fluorescent dye D, then loaded and analyzed on a CEQ. 2000XL capillary DNA analysis system (Beckman Coulter). Figure 2 shows an analysis of a run containing six multiplexed PCR products. Genomic DNA from strain A amplified by three markers along with M13 primer end-labeled with WellRED fluorescent dye D2 is compared with genomic DNA from strain B amplified with the same markers along with M13 primer end-labeled with fluorescent WellRED dye D3. As observed with  $^{32}\text{P}$ -labeled markers, PCR products migrate as clean-laddered fluorescence peaks without interfering artifactual bands and, thus, allow clear identification of the origin of the alleles. We have obtained similar results when multiplexing was initiated at the level of PCR, by amplifying genomic DNA with several primer combinations simultaneously. It is reasonable to anticipate that this method could be used with dyes designed for other sequencing platforms. For instance, M13 primers labeled with FAM and HEX fluorescent dyes have already been used for other applications involving the analysis of fragments on an ABI PRISM. 377 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (1).

In summary, the use of M13-tailed primers has the potential to facilitate microsatellite analysis, regardless of whether allele sizing is performed on manual gels or on automatic sequencers. The benefits of using M13-tailed primers include the possibility of increasing the genotyping output with greater convenience, reducing costs, and increasing specificity.

## REFERENCES

1. **Boutin, P., E.H. Hani, F. Vasseur, C. Roche, B. Bailleul, J. Hager, and P. Froguel.** 1997. Automated fluorescence-based screening for mutation by SSCP: use of universal M13 dye primers for labeling and detection. *BioTechniques* 23:358-362.

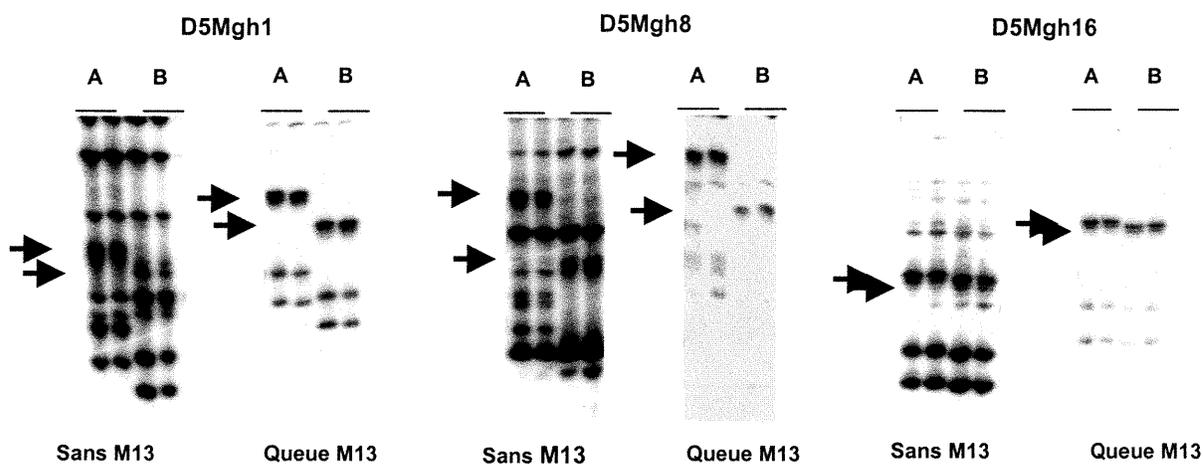
2. **Oetting, W.S., H.K. Lee, D.J. Flanders, G.L. Wiesner, T.A. Sellers, and R.A. King.** 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30:450-458.

3. **Steffens, D.L., S.L. Sutter, and S.C. Roemer.** 1993. An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. *BioTechniques* 15:580-582.

*This work was supported in part by grant nos. MOP-14086 and MOP-36449 from the Medical Research Council of Canada/Canadian Institutes of Health Research (MRCC/CIHR) and by a grant from the Fondation des Maladies du Coeur du Québec to C.F.D. Address correspondence to Dr. Christian Deschepper, Laboratory Director, Experimental Cardiovascular Biology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110 Pine Ave West, Montréal, QC, Canada, H2W 1R7. e-mail:*

████████████████████

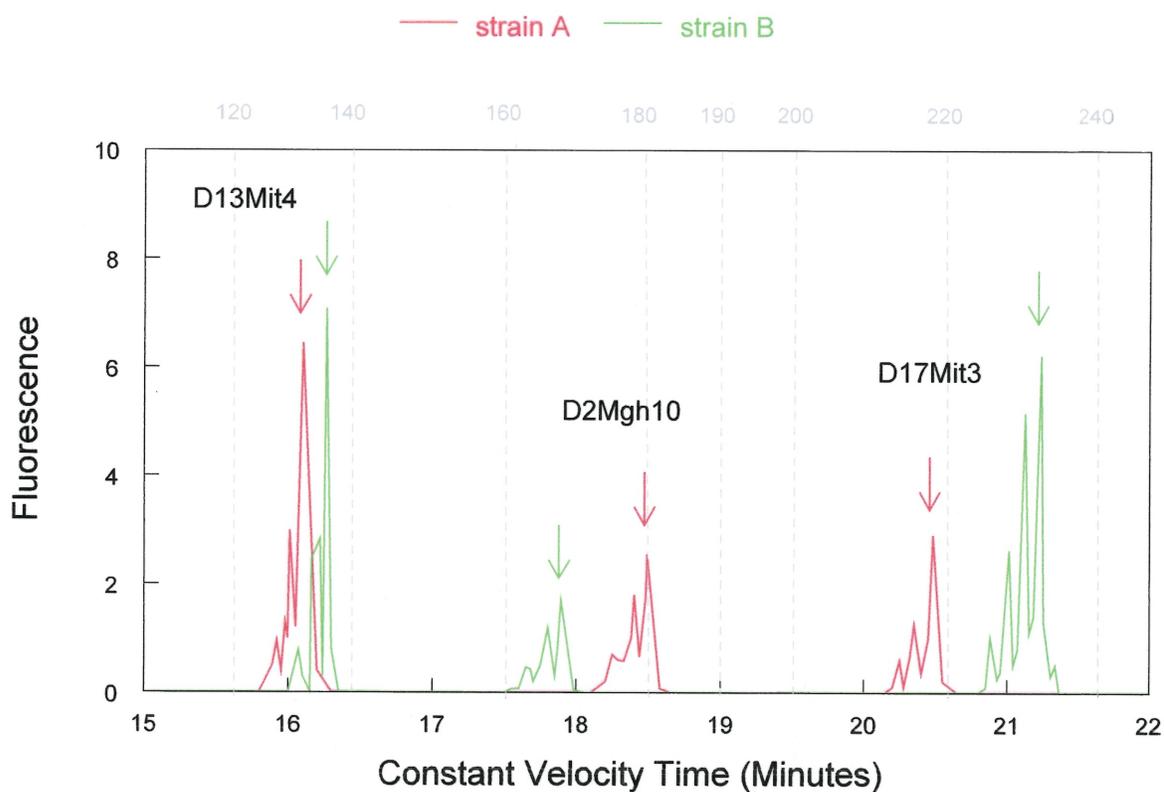
## Figures



**Figure 1 : Representative autoradiograms of PCR amplification performed with  $^{32}\text{P}$  primer pairs where the forward primer was either untailed or tailed with the M13 sequence and analyzed on acrylamide sequencing gels.**

Genomic DNA originated from two different inbred rat strains (A and B).

The names of the markers (i.e., all amplified products containing dinucleotide repeats) were D5Mgh1, D5Mgh8, and D5Mgh16. The arrows point to the migration position of the main polymorphic amplification products for strains A and B, and the accompanying numbers indicate the sizes (bp) of the corresponding DNA fragments.



**Figure 2 : Migration profile of PCR amplification products of genomic DNA from rat strains A and B using M13-tailed primer pairs for three different markers: D13Mit4, D2Mgh10, and D17Mit3.**

The numbers on top (with accompanying dashed lines) correspond to the migration times of corresponding DNA size markers. The red and green arrows correspond to the migration times of the main amplification products for strains A and B, respectively.

## **CHAPITRE 4 : MANUSCRIT 2**

### **4.1 Contribution au manuscrit 2**

J'ai effectué la majorité du travail de laboratoire requis pour la production des résultats qui mèneront à la rédaction du manuscrit 2.

Pour la génération des lignées congéniques, j'ai été responsable de la gestion des croisements entre les animaux.

J'ai effectué le génotypage des mâles de chacune des 5 générations (200 mâles à génotyper avec 5 marqueurs et 20 mâles à génotyper avec +/- 60 marqueurs pour chaque génération) à l'aide des marqueurs avec ou sans queue M13. Pour ce faire, j'ai kinaser les oligonucléotides (lorsque nécessaire), j'ai préparé les réactions de PCR et j'ai mis sur gels de séquence les réactions de PCR lorsque les séquenceurs automatiques n'étaient pas utilisés. J'ai participé aussi au génotypage des mâles et des femelles issus de la génération F2 des croisements entre les WKY et WKHA.

J'ai effectué la plupart des isolement de cardiomyocytes (5 mâles et 5 femelles de chacune des lignées) ainsi que les mesures des cellules (+/-100 cellules par rat) par vidéomicroscopie.

J'ai effectué les radioimmunoessais qui ont permis la mesure de l'ANF<sub>v</sub> chez les animaux des lignées congéniques (10 animaux par lignées).

J'ai contribué de façon significative à l'analyse des résultats produits et j'ai effectué le travail de rédaction du texte du manuscrit.

Je remercie les co-auteurs du manuscrit pour leur contribution au travail réalisé.

Sylvie Picard était, au moment de la production de ces résultats, l'assistante de recherche du laboratoire dans lequel j'ai effectué ma maîtrise. Elle a été responsable de ma formation en laboratoire et a su prodiguer une assistance technique pour chacune des méthodes détaillées, en plus de participer à la production de certains résultats, notamment pour l'isolement des cardiomyocytes de certains rats. Ses précieux conseils m'ont permis de mener à terme les expériences nécessaires à la réalisation du manuscrit.

Dr Christian Deschepper, mon directeur de maîtrise, a dirigé les travaux lors de la production de ces résultats. Il a permis la réalisation de ce manuscrit grâce à sa

vision à long terme du projet dans lequel s'est inscrit mon projet de maîtrise. Je le remercie pour ses conseils concernant les aspects autant théoriques que techniques du projet, ses analyses des résultats toujours critiques, ainsi que la révision du texte à présenter pour publication.

## **4.2 Distinct gene-gender interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently from one another.**

**I. B-Ganache, S. Picard and CF. Deschepper**

Experimental Cardiovascular Biology Research Unit

*Institut de recherche cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, Canada*

A été soumis au mois de septembre 2002

À : *Physiological Genomics*

**Distinct gene-gender interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently from one another.**

*I. Boutin-Ganache, S. Picard and CF. Deschepper*

Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherche cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC, Canada H2W 1R7

**Short title:** Gene-gender interactions and cardiomyocyte shape

**Corresponding author:** Christian F. Deschepper  
IRCM  
110 Pine Ave West  
Montreal (QC) Canada H2W 1R7  
Phone: [REDACTED]  
Fax: (514) 987 5585  
E-mail: [REDACTED]

**Key words:** Hypertrophy - Animal models of human disease - Functional genomics - Genetics of cardiovascular disease - Structure

**Word count:** 5122 words

## Abstract

WKY and WKHA are 2 genetically-related inbred strains of rats that are both normotensive yet exhibit differences in left ventricular mass (LVM). We had shown previously that cardiomyocytes from male WKHA are wider than that of male WKY, and that there was genetic linkage between LVM and a locus on chromosome 5 (RNO5) in the male progeny of a F2 WKHA/WKY cross. We show here that cardiomyocyte width is linked to the same RNO5 locus in male reciprocal congenic rats derived from WKHA and WKY. Contrary to males, we found no genetic linkage between LVM and the RNO5 locus in female rats. However, ventricular hypertrophy in females might be of a different nature, because cardiomyocytes from female WKHA were longer (instead of wider in males) than their WKY counterparts. The RNO5 locus contains that of the Natriuretic Peptide Precursor A (*Nppa*) gene. In male congenic rats, changes in cardiomyocyte width always correlated with reciprocal changes in the LV concentration of atrial natriuretic factor (ANF, i.e. the peptide product of *Nppa*). Taken together with other functional data, the small size of the RNO5 locus (~63 cR) increased the likelihood that both cardiomyocyte width and LV ANF concentration could be linked to only one gene (possibly *Nppa*) in male rats. Moreover, our results support the notion that genes and gender interact to regulate cardiomyocyte width and length independently from one another, with possible distinct functional consequences (**234 words**).

## Introduction

In order to identify genetic factors that regulate cardiac left ventricular mass (LVM) independently of blood pressure, we have previously analyzed the genomes of the male progeny of WKY/WKHA hybrid crosses <sup>1</sup>. Both strains are normotensive but exhibit differences in cardiac mass <sup>2</sup>. By performing a whole-genome scan of the progeny of the cross, we have found that *Rattus Norvegicus* chromosome 5 (RNO5) harbored in males quantitative trait loci (QTL) linked to left ventricular atrial natriuretic factor (LV ANF) and to LV mass (LVM) with highly significant LOD scores <sup>1</sup>. Both QTLs map to the reported position of chromosomal band 5q36 (<http://ratmap.gen.gu.se>), and their 1-LOD support intervals overlap a region that contains the locus of the Natriuretic Peptide Precursor A (*Nppa*) gene (i.e. the gene that governs the synthesis of the ANF precursor). However, because of the inherent statistical imprecision of linkage data, it was not possible to determine on the basis of these data alone whether these QTLs corresponded to one identical locus or to 2 contiguous ones.

To test whether the same QTLs can be detected in female rats, we screened the genomic DNA of the female progeny of our WKY/WKHA hybrid cross with markers linked to RNO5.

Moreover, in order to obtain a physical validation of the statistical linkage data, we generated several congenic rat strains where portions of RNO5 from WKHA were introgressed into the background of WKY rats, and vice-versa. To improve the precision of our phenotypic characterization procedures, we also quantitated the width and length of cardiomyocytes isolated from adult hearts. Indeed, we have shown previously that this procedure made it possible to detect inter-strain

differences that were larger and more reliable than those obtained by just measuring LVM<sup>2</sup>.

## **Material and methods**

### **Animals**

All procedures on animals were approved by the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) Institutional Animal Care Committee and conducted according to guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care. The nomenclature of the strains is in compliance with the recommendations of the International Rat Genetic Nomenclature Committee. The WKHA/Cfd rats originated from a colony maintained at the IRCM, as registered with the Institute of Laboratory Animal Resources. WKY/Cfd rats also originated from a colony maintained at the IRCM and were derived from WKY/Cr parents obtained from Charles River (St. Constant, Québec, Canada). Adult animals were housed 2 to 3 per cage and given unlimited access to standard chow and water. All animals were used at 12 weeks of age for the purpose of these studies.

### **Animals procedures**

On the day of tissue collection, each animal was weighed for determination of whole body weight (BW). The rats were then killed by decapitation, and hearts were collected. Heart ventricles were dissected into right ventricle (without the septal wall) and left ventricle (LV; including the septal wall). Each part was blotted dry and weighed individually. The apex of each LV was then dissected out, frozen in liquid nitrogen and kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  for additional analysis.

### **Genetic Crosses and genomic analyses**

Total progenies of 345 male and 141 females had previously been obtained by F2 WKY/WKHA hybrid crosses. Genomic DNA was obtained from the spleen of each animal, using the DNeasy tissue kit (Qiagen). To generate RNO5 linkage maps in

female rats, the genomic DNA from each member of the progeny was amplified with a total of 14 M13-tailed <sup>32</sup>P-labeled microsatellite markers, as described previously<sup>3</sup>. Construction of linkage maps and QTL interval mapping were performed with the help of the program Map Manager QTXb15 (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA). Significance levels were set as described previously for detection of a QTL for a co-dominant trait in a rat intercross<sup>4</sup>. Linkage maps for the 345 male animals had been performed previously with the help of the MAPMAKER/EXP 3.0 software package. For the sake of consistency, the male dataset was re-analyzed for the current study, using the same microsatellite markers as in females as well as the same computer program (Map Manager).

### **Generation of congenic strains**

Congenic strains were generated using the marker-assisted breeding method (also known as the "speed congenic" method)<sup>5</sup>. For one type of cross, male WKY rats (the receiving strain) and female WKHA rats (the donor strain) were first bred to produce F1 rats (where the Y chromosome originated from WKY). These F1 male rats were then backcrossed to female WKY rats to produce the first backcross generation (N2). N2 male rats were first genotyped for 4 markers (D5Rat173, D5Wox10, D5Rat204 and D5Rat28) delineating a region of interest on RNO5. Those that were heterozygous WKY/WKHA for each marker were selected and further genotyped with 57 additional markers covering the whole genome. From these analyses, we selected the one N2 male rat that was heterozygous WKY/WKHA for the chromosome 5 region but also contained the largest number of markers that were homozygous for WKY alleles on the remaining part of the genome. That optimal breeder was then backcrossed to 20 female WKY rats to produce the N3 progeny. This sequence of procedures was repeated until

generation N5, where the only markers that were detected as heterozygous WKY/WKHA were those delineating 3 different regions on RN05. With the help of genotyping with additional markers mapping to the same region, these regions corresponded to the intervals D5Rat173-D5Mgh16, D5Rat45-D5Rat245 and D5Rat28-D5Rat45 (Fig. 1). At that point, ~ 100% of the genome outside of the introgressed fragment can be considered to originate from the recipient strain<sup>5</sup>. The last step involved the crossing of N5 female to N5 male rats, which yielded (after genotypic selection) rats that were homozygous WKHA/WKHA for the region of interest but homozygous WKY/WKY for the rest of the genome. The 3 corresponding strains were designated WKY.WKHA-(D5Rat173-D5Mgh16), WKY.WKHA-(D5Rat45/D5Rat245) and WKY.WKHA-(D5Rat28-D5Rat45), in compliance with the guidelines issued by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and Rats.

A second type of cross was reciprocal to the first one. It involved the crossing of male WKHA to female WKY rats to generate F1 rats, followed by repeated backcrossings to WKHA female rats. This procedure generated the WKHA.WKY-(D5Rat45-D5Mgh16) strain (Fig. 1).

### **ANF radioimmunoassays**

Fragments of left ventricular apex ( $\pm$  200 mg) were weighed, powdered under liquid nitrogen, and boiled for 5 minutes in a volume of 2 ml of 0.2 mol/L acetic acid. The extracts were then centrifuged at 30 000g for 30 minutes. Aliquots of 5  $\mu$ L of supernatant were assayed, using the same procedures and reagents as described previously<sup>6</sup>. The content of ANF immunoreactivity in LV tissue was expressed as fmol/mg wet weight.

### **Isolated Cardiomyocytes**

Cardiomyocytes were isolated from five male and five female rats from each parental or congenic strain (12 wk of age). The hearts were rapidly removed from anesthetized animals previously injected intraperitoneally with 500 units heparin sulfate, and  $[Ca^{2+}]$ -tolerant cardiomyocytes were isolated by the Langendorff method (cardiac retrograde aortic perfusion), as described previously<sup>2,7</sup>. Cardiocytes were separated from non-cardiomyocytes by sedimentation on a 6% solution of bovine serum albumin, then fixed for 30 min in 0.08 mol/L phosphate buffer containing 1.5% glutaraldehyde and rinsed with 0.15 mol/L phosphate buffer at 4°C. Both solutions have been shown to preserve the volume of fixed cells as compared to unfixed ones<sup>8</sup>. Fixed cardiomyocytes were allowed to settle in Petri dishes containing 0.15 mol/L phosphate buffer and examined with a Zeiss Axiovert microscope connected to a videocamera that allowed capture of the images as electronic files. With the use of Northern Eclipse version 6.0 software, ~ 100 cells from each animal were analyzed for determination of cell length (defined as the longest length parallel to the longitudinal axis of the myocyte) and cell surface (calculated on the basis of the manual contour drawn around the myocyte). Cell width was calculated by dividing the value of surface by that of length.

## Results

Results of the linkage analyses are shown in Fig. 2. By interval mapping, a QTL linked to LV ANF (QTL/ANFv) was found on RNO5 both for female (LOD = 6.6) and for male rats (LOD = 7.1). Similarly to what had been reported previously, a QTL was linked to LV mass (QTL/LVM) was found for males (LOD = 3.7). Both QTLs mapped to the same region of RNO5, since there was partial overlap of their 1-LOD confidence interval. In contrast to our results in males, there was no statistical linkage between LVM and any region of RNO5 in female rats.

Three congenic strains [WKY.WKHA-(*D5Rat173-D5Mgh16*), WKY.WKHA-(*D5Rat45-D5Rat245*) and WKY.WKHA-(*D5Rat28-D5Rat45*)] were generated by introgression of regions of RNO5 into the recipient WKY strain, whereas one reciprocal congenic strain [WKHA.WKY-(*D5Rat45-D5Mgh16*)] was generated by introgression of the region of RNO5 from WKY rats into the recipient WKHA strain (Fig. 1). Table 1 shows the values of LV ANF and of the morphological variables obtained in cardiomyocytes isolated from the hearts of rats from parental or congenic strains. In male rats, the width of cardiomyocytes from WKY is smaller than that of cardiomyocytes from WKHA, whereas there was no difference in length between cells from either strain. Introgression of the (*D5Rat28-D5Rat45*) RNO5 fragment (that layed on RNO5 outside of the QTL as previously defined by statistical linkage) from WKHA into WKY rats resulted in cardiomyocytes whose shape characteristics were not different from that of cells from the receiving WKY strain. The two other WKHA introgressed fragments both contained the QTL previously defined by statistical linkage, but differed in size. Introgression of the larger (*D5Rat173-D5Mgh16*) RNO5 fragment from WKHA into WKY resulted in cardiomyocytes that were statistically larger than that from the receiving strain, but

smaller than that from the donor WKHA strain. Introgression of the smaller (*D5Rat45-D5Rat245*) fragment resulted in cardiomyocytes whose width was as large as that of cells from the donor WKHA strain. Reciprocally, introgression of a the (*D5Rat45-D5Mgh16*) fragment from WKY into WKHA resulted in cardiomyocytes whose width was significantly smaller than that of the receiving WKHA strain, and also smaller than that of the donor WKY strain. All differences in the width of male cardiomyocytes were accompanied by reciprocal changes in the values of LV ANF. All combined, these data define a RNO5 fragment that extends maximally from D5Rat45 (1049 cR) and D5Rat245 (1112 cR) and that is physically associated to both LV ANF and cardiomyocyte width in male rats.

In females, introgression of the (*D5Rat45-D5Rat245*) fragment from WKHA into the WKY background or introgression of the (*D5Rat45-D5Mgh16*) fragment from WKY into the WKHA background correlated well with LV ANF, but had no effect on cardiomyocyte width. Unlike what we had observed in male rats, the width of cardiomyocytes from female WKHA was not different from that from female WKY (Table 2). However, the length of cardiomyocytes from female WKHA was statistically shorter than that from female WKY. Inter-gender comparisons revealed that: 1) the width of cardiomyocytes from female WKY was larger than that of cells from male WKY; 2) the width of female WKHA was narrower than that of cells from male WKHA; but 3) that females from both strains had a higher width/length ratio than corresponding male rats. Altogether, it appeared that the width and length of cardiomyocytes in the various strains varied in a gender- and strain-specific manner.

## Discussion

The data presented herein provide concordant evidence (on the basis of both statistical linkage and physical mapping data) that a region extending maximally between markers D5Rat45 and D5Rat245 is linked to LV ANF, LVM and/or cardiomyocyte width in male rats, but only to LV ANF in female rats. These markers define a maximal region of 63 cR, as defined by the virtual rat radiation hybrid map ([www.rgd.mcw.edu](http://www.rgd.mcw.edu)). Considering that 1 cR equals approximately ~ 155 kb<sup>9</sup>, this corresponds to a fragment of ~10 Mb. The results from congenic WKHA.WKY- (*D5Rat45-D5Mgh16*) indicate that region is potentially smaller, but additional polymorphic markers are needed to elucidate the parental origin of the region between D5Rat45 and D5Rat48. These data provide a physical proof of the statistical linkage data obtained previously in male rats.

The shape and volume of isolated cardiomyocytes represent interesting surrogate end-points for the phenotypic characterization of cardiac hypertrophy. Indeed, cardiomyocyte volume has been shown to change coordinately with cardiac mass over a large variety of conditions, including pressure and volume overload, hyperthyroidism and the post-myocardial infarction period<sup>10-12</sup>. Adult cardiomyocytes have a characteristic cylindrical shape<sup>13</sup>, whose volume is determined in part by their respective length and width. In physiological conditions, the width/length ratio is tightly regulated within a very narrow range, as it remains unchanged in growing rats with body weights ranging from 75 to 750 g<sup>14</sup>. Likewise, the value of this ratio has been shown to be highly conserved in a wide range of mammalian species<sup>15,16</sup>. We have also found that the calculation of the mean width/length ratio of cardiomyocytes provided a more discriminating phenotype to

compare WKHA and WKY hearts, since the mean values of LV mass in the 2 strains were separated by only 1.3 SD, whereas the mean values of the width/length ratio were separated by as much as 6.3 SD<sup>2,17</sup>.

Under certain pathophysiological conditions, the width and/or length of cardiomyocytes may change in a disproportionate fashion. For instance, the width (and/or cross-sectional area) of cardiomyocytes increases disproportionately during pressure overload, whereas their length increases disproportionately in the course of dilated cardiac failure<sup>16</sup>. There are also previous examples where the shape of cardiomyocytes was shown to vary in a strain- and gender-specific manner. Indeed, the cross-sectional area / length ratio has been found to differ between outbred Sprague-Dawley rats from two different colonies<sup>18</sup>. Likewise, the length of cardiomyocytes from Sprague-Dawley rats from one specific outbred colony has been found to be shorter than that of their male counterparts<sup>19</sup>. Each of these shape-related changes may be associated with specific functional consequences. Indeed, increases in the width of cardiomyocytes correspond to the addition of sarcomeres in parallel, which may lead to increased contractility because of the increased density of contractile units per unit of muscle tissue<sup>20</sup>. Conversely, it has been shown that increased cell length correlates closely with ventricular dilation and/or impaired mechanical performance in hearts during progression towards failure<sup>21,22</sup>

Contrary to males, cardiomyocytes from female WKHA and WKY differed in length and not in width. However, the relative width of female cardiomyocytes (when normalized to length) was larger than in males. Of note, the progression from hypertrophy to failure is more rapid in males than in females in SHHF rats, which

correlates well with the shorter length of female cardiomyocytes<sup>23</sup>. Furthermore, the contractility of cardiac papillary muscles from Wistar rats has been shown to be greater in females than in males<sup>24</sup>, which may correlate with the greater relative width of female cardiomyocytes. These gender-specific differences in shape and/or function may be due in part to differences in sex hormones, since gonadectomy has been shown to alter the contractile performance of hearts from both males and females<sup>25</sup>.

We had reported previously that a QTL on the 5q36 band of RNO5 was responsible for ~ 19% of the total variance of LVM<sup>1</sup>. In the current study, we have observed that introgression of the same QTL region increased the width of cardiomyocytes in congenic WKY-recipients up to a value that was as high as that of WKHA rats. Of note, the fact that the effect of a QTL appears to be greater in a congenic than in its parental strain is not an uncommon observation. In this particular case, it may be due to the fact that the genetic effects of the introgressed WKHA fragment are amplified by the absence in the WKY background of other WKHA genes that have opposite effects. Our observation that introgression of a larger fragment from WKHA RNO5 has less effect on cardiomyocyte width than the more restricted fragment is consistent with this interpretation. Likewise, we observed that the width of cardiomyocytes from WKHA.WKY-(D5Rat45-D5Mgh16) congenics was even smaller than that of cardiomyocytes from the donor WKY strain.

All changes in cardiomyocyte width in males correlated well with inverse changes in LV concentration of ANF (whose *Nppa* gene is contained within the introgressed fragment) in the same strains. Interestingly, there is evidence that ANF may be functionally linked to LVM since: 1) mice lacking the genes for either *Nppa* or *Npr1*

[coding for natriuretic peptide receptor A (NPRA), a cGMP-coupled ANF receptor] show an increase in cardiac mass that is exaggerated in the context of the very modest increase in blood pressure seen in the same animals<sup>26-28</sup>; 2) *in vitro*, ANF and/or analogs of cGMP attenuate the hypertrophic effects of norepinephrine on cultured neonatal rat cardiomyocytes<sup>29,30</sup>, whereas an ANF antagonist enhances these effects<sup>31</sup>; and 3) transgenic mice overexpressing constitutive guanylate cyclase in a heart specific manner are protected against catecholamine-induced hypertrophy<sup>32</sup>. Altogether, it is therefore possible that changes in the width of cardiomyocyte from male rats may be due to changes in LV ANF and/or of its second messenger cGMP. Although a 63 cR locus should be expected to contain a few hundreds of genes, the fact *Nppa* (that physically maps to the locus) can also be functionally linked to LVM makes it a strong candidate for linkage to differences in LVM.

In females, the RNO5 locus was linked to LV ANF, but not to LVM. However, ventricular hypertrophy in females might be of a different nature, because cardiomyocytes from female WKHA were longer (instead of wider in males) than their WKY counterparts. Accordingly, the RNO5 locus was linked to LV ANF concentration in congenic females, but not to cardiomyocyte width (which was not different in the female parental strains to start with). One possible explanation for the lack of effect of the RNO5 locus on the width of female cardiomyocytes is that ANF could activate in males a mechanism that is already activated in females, and hence will have no additional effects. Consistent with this interpretation, it has been shown that the production of nitric oxide synthase (and thus presumably of cGMP) is increased in the heart of female and/or estrogen-treated rats<sup>33,34</sup>. Regardless of why cardiomyocyte width is not affected by the RNO5 QTL in females, one might

expect that further genome scanning will reveal other QTL(s) specifically linked to cardiomyocyte length in female rats, since this is the feature that differentiates female cardiomyocytes from both strains. This might be consistent with the hypothesis that different genes and/or molecular pathways regulate the length and the width of cardiomyocytes differentially, along with different functional consequences<sup>16</sup>. Given the possible functional and separate consequences of each dimension change, these effects may be pertinent to the reduced incidence of cardiovascular disease in premenopausal women<sup>35</sup>.

In summary, our data show that a region on the 5q36 band of RNO5 that contains the *Nppa* gene and whose length is ~63 cR is linked to both cardiomyocyte width and to LV ANF in male rats. Taken together with other functional data, this increases the probability that alterations of a single gene within that locus (possibly *Nppa*) are linked to both cardiovascular phenotypes in male rats. Our data also illustrate how genes and gender may interact to regulate cardiomyocyte width and length independently from one another.

### **Acknowledgments**

This work was supported by CIHR grants MOP-36449 and MOP-14086, by a CIHR Group Grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, and by a grant from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

### **References**

1. Deschepper CF, Masciotra S, Zahabi A, Boutin-Ganache I, Picard S, Reudelhuber T. Functional alterations of the *Nppa* promoter are linked to

- cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ.Res.* 2001;88:222-227.
2. Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, Rouleau JL. Characterization of left ventricular myocardium, isolated cardiomyocytes and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am.J.Physiol.* 2002;82:H149-H155.
  3. Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M, Deschepper CF. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques.* 2001.
  4. Lander ES, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet.* 1995;11:241-247.
  5. Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genet.* 1997;17:280-284.
  6. Gutkowska J, Genest J, Thibault G, Garcia R, Laroche P, Cusson JR, Kuchel O, Hamet P, De Léan A, Cantin M. Circulating forms and radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. *Endocrinol.Metab.Clin.North Am.* 1987;16:183-198.
  7. Touyz RM, Fareh J, Thibault G, Schiffrin EL. Intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes and fibroblasts from hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1996;28:797-805.
  8. Gerdes AM, Kriseman J, Bishop SP. Morphometric study of cardiac muscle. The problem of tissue shrinkage. *Lab.Invest.* 2001;46:271-274.
  9. Steen RG, Kwitek-Black AE, Glenn C, Gullings-Handley J, Van Etten W, Atkinson OS, Appel D, Twigger S, Muir M, Mull T, Granados M, Kissebah M, Russo K, Crane R, Popp M, Peden M, Matise T, Brown DM, Lu J, Kingsmore S, Tonellato PJ, Rozen S, Slonim D, Young P, Knoblauch M, Jacob HJ. A high-density integrated genetic linkage and radiation hybrid map of the laboratory rat. *Genome Research.* 1999;9:1-8.

10. Zierhut W, Zimmer HG, Gerdes AM. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Circ.Res.* 1991;69:609-617.
11. Kellerman S, Moore JA, Zierhut W, Zimmer HG, Campbell J, Gerdes AM. Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 1992;24:497-505.
12. Gerdes AM, Kriseman J, Bishop SP. Changes in myocardial cell size and number during the development and reversal of hyperthyroidisms in neonatal rats. *Lab.Invest.* 1983;48:598-602.
13. Gerdes AM, Kellerman SE, Malec KB, Schocken DD. Transverse shape characteristics of cardiac myocytes from rats and humans. *Cardioscience.* 1994;5:31-36.
14. Schwartz K, Carrier L, Guicheney P, Komadja M. Molecular basis of familial cardiomyopathies. *Circulation.* 1995;91:532-540.
15. Campbell SE, Gerdes AM, Smith TD. Comparison of regional differences in cardiac myocyte dimensions in rats, hamsters, and guinea pigs. *Anat.Rec.* 1987;219:53-59.
16. Gerdes AM, Capasso JM. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 1995;27:849-856.
17. Deschepper CF, Boutin-Ganache I, Zahabi A, Jiao S. In search of cardiovascular genes. Interactions between phenotypes and genotypes. *Hypertension.* 2002;39 [part 2]:332-336.
18. Campbell AM, Gerdes AM. Regional differences in cardiac myocyte dimensions and number in Sprague-Dawley rats from different suppliers. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1987;186:211-217.
19. Bai S, Campbell SE, Moore JA, Morales MC, Gerdes AM. Influence of age, growth, and sex on cardiac myocyte size and numbers in rats. *Anat.Rec.* 1990;226:207-212.

20. Bing OHL, Wiegner AW, Brooks WW, Fishbein MC, Pfeffer JM. Papillary muscle structure-function relations in the aging spontaneously hypertensive rat. *Clin.Exp.Hypertens.[A]*. 1988;10:37-58.
21. Kramer CM, Rogers WJ, Park CS, Seibel S, Shaffer A, Theobald TM, Reichel N, Onodera T, Gerdes AM. Regional myocyte hypertrophy parallels regional myocardial dysfunction during post-infarct remodeling. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 1998;30:1773-1778.
22. Tamura T, Onodera T, Said S, Gerdes AM. Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 1998;30:2175-2181.
23. Tamura T, Suleman S, Gerdes AM. Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension.* 1999;33:676-680.
24. Capasso JM, Remily RM, Smith RH, Sonnenblick EH. Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res.Cardiol.* 1983;78:156-171.
25. Schaible TF, Malhotra A, Ciambone G, Scheuer J. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. *Circ.Res.* 1984;54:38-49.
26. John SWM, Krege JH, Oliver PM, Hagaman JR, Hodgins JB, Pang SC, Flynn TG, Smithies O. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science.* 1995;267:679-681.
27. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim H-S, Reddick RL, Pandey KN, Milgram KN, Smithies O, Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1997;94:14730-14735.
28. Chusho H, Ogawa Y, Tamura N, Suda M, Yasoda A, Miyazawa T, Kishimoto I, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Garbers DL, Nakao K. Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology.* 2000;141:3807-3813.

29. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DLF, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J.Clin.Invest.* 1998;101:812-818.
30. Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, Stork PJS, Steyger PS, Roberts CTJr. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J.Biol.Chem.* 1999;274:24858-24864.
31. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension.* 2000;35:19-24.
32. Zahabi, A., Picard, S., Reudelhuber, T., and Deschepper, C. F. Transgenic animals overexpressing constitutive guanylate cyclase in cardiomyocytes are protected against catecholamine-induced hypertrophy. *The Physiologist* 2002;45:79.
33. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IA, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1994;91:5212-5216.
34. Morschl E, Bretus I, Nemcsik J, Laszlo F, Pavo I. Estrogen-mediated up-regulation of the Ca-dependent constitutive nitric oxide synthase in the rat aorta and heart. *Life Sci.* 2000;68:49-55.
35. Skafar DF, Xu R, Morales J, Ram J, Sowers J. Female sex hormones and cardiovascular disease in women. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1997;82:3913-3918.

**Table 1: Inter-strain comparisons**

Gender	Strain	Length ( $\mu\text{m}$ )	Width ( $\mu\text{m}$ )	W/L	LV ANF (fmole/mg)	Stat. group
Male	WKY (receiving strain)	130 $\pm$ 2	23.3 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 0.5	0.184 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 0.007	643 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 63	a
	WKY.WKHA-(D5Rat28-D5Rat45)	131.7 $\pm$ 3.2	22.4 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 0.4	0.175 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 0.007	629 <sup>c,d,e</sup> $\pm$ 69	b
	WKY.WKHA-(D5Rat173-D5Mgh16)	127.7 $\pm$ 0.7	26.9 <sup>a,b,d,e</sup> $\pm$ 0.2	0.218 <sup>a,b,d</sup> $\pm$ 0.003	217 <sup>a,b</sup> $\pm$ 15	c
	WKY.WKHA-(D5Rat45-D5Rat245)	128.6 $\pm$ 0.3	29.6 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 0.4	0.242 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 0.003	209 <sup>a,b</sup> $\pm$ 30	d
	WKHA (donor strain)	128.8 $\pm$ 1.14	28.8 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 0.5	0.233 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0.004	185 <sup>a,b</sup> $\pm$ 15	e
Male	WKHA (receiving strain)	128.8 $\pm$ 1.14	28.8 <sup>a,f</sup> $\pm$ 0.5	0.233 <sup>a,f</sup> $\pm$ 0.004	185 <sup>a,f</sup> $\pm$ 15	e
	WKHA.WKY-(D5Rat45-D5Mgh16)	129.3 $\pm$ 1.15	20.8 <sup>a,e</sup> $\pm$ 0.5	0.165 <sup>a,e</sup> $\pm$ 0.004	582 <sup>e</sup> $\pm$ 54	f
	WKY (donor strain)	130 $\pm$ 2	23.3 <sup>e,f</sup> $\pm$ 0.5	0.184 <sup>e,f</sup> $\pm$ 0.007	643 <sup>e</sup> $\pm$ 63	a
Female	WKY	116 <sup>l,j</sup> $\pm$ 2.8	26.1 $\pm$ 0.26	0.234 <sup>l,j</sup> $\pm$ 0.008	604 <sup>h,j</sup> $\pm$ 62	g
	WKY.WKHA-( D5Rat45-D5Rat245)	115.8 <sup>l,j</sup> $\pm$ 2	26.1 $\pm$ 0.5	0.234 <sup>l,j</sup> $\pm$ 0.008	195 <sup>g,i</sup> $\pm$ 30	h
	WKHA.WKY-( D5Rat45-D5Mgh16)	107.7 <sup>g,h</sup> $\pm$ 1.1	27.46 $\pm$ 0.3	0.264 <sup>g,h</sup> $\pm$ 0.003	638 <sup>h,j</sup> $\pm$ 58	i
	WKHA	107.4 <sup>g,h</sup> $\pm$ 3	26.8 $\pm$ 0.3	0.261 <sup>g,h</sup> $\pm$ 0.008	268 <sup>g,i</sup> $\pm$ 28	j

Values of length, of width and of width/length ratio of isolated adult cardiomyocytes and concentrations of ANF in LV from several strains. Numbers represent average  $\pm$  SE (n = 5 for cardiomyocyte values; n = 6-10 for LV ANF values). The 3 groups of values represent those that were used for statistical comparisons between strains (ANOVA followed by Fisher's LSD test) The superscript letters represent the groups whose variables are statistically different (P < 0.01) from the labeled variable. The shaded areas indicate variables whose values are modified (as compared to that in the receiving strain) by introgression of a chromosome fragment from the donor strain.

**Table 2: Intra- and inter-gender comparisons of cardiomyocytes from parental strains**

Strain	Gender	Length ( $\mu\text{m}$ )	Width ( $\mu\text{m}$ )	W/L	Stat. group
WKY	Male	130 <sup>g,j</sup> $\pm$ 2	23.3 <sup>g,e,j</sup> $\pm$ 0.5	0.184 <sup>g,e,j</sup> $\pm$ 0.007	<i>a</i>
	Female	116 <sup>a,e,j</sup> $\pm$ 2.8	26.1 <sup>a,e</sup> $\pm$ 0.26	0.234 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.008	<i>g</i>
WKHA	Male	128.8 <sup>g,j</sup> $\pm$ 1.14	28.8 <sup>a,g,j</sup> $\pm$ 0.5	0.233 <sup>aj</sup> $\pm$ 0.004	<i>e</i>
	Female	107.4 <sup>a,e,g</sup> $\pm$ 3	26.8 <sup>a,e</sup> $\pm$ 0.3	0.261 <sup>a,e,g</sup> $\pm$ 0.008	<i>j</i>

Values of length, of width and of width/length ratio of isolated adult cardiomyocytes WKHA and WKY rats. The values (average  $\pm$  SE, n = 5) are identical as those presented in Table 1, but statistical comparisons (ANOVA followed by Fisher's LSD test) are made between male and female rats from each parental strain. The superscript letters represent the groups whose variables are statistically different ( $P < 0.01$ ) from the labeled variable.

### Figure legends:

**Fig. 1:** Physical map of RNO5 from each congenic strain. WKY.WKHA-(D5)a, b and c correspond to WKY.WKHA-(D5Rat173-D5Mgh16), WKY.WKHA-(D5Rat45-D5Rat245) and WKY.WKHA-(D5Rat28-D5Rat45), respectively. WKHA.WKY-(D5) corresponds to WKHA.WKY-(D5Rat45-D5Mgh16). The position of each marker is indicated on the left, with distances indicated either in cR (from radiation hybrid maps) or in cM (from genetic maps). White bars represent regions originating from WKY, black bars represent regions originating from WKHA, and hatched bars represent regions whose origin could not be determined because of the absence of polymorphic markers within the intervals.

**Fig. 2:** QTL LOD plots of chromosome 5 for ln(LV ANF) and LVM in the female and male F2 progeny from WKY/WKHA rat crosses. Numbers on the x axis represent distances in cM. Lines have been positioned at the LOD threshold values for statistical linkage of codominant traits in a rat intercross. The hatched boxes represent the 1-LOD support intervals for either QTL/LV ANF or QTL/LVM. Dotted lines indicate the position of the *D5Wox10* locus, which coincides with that of the *Nppa* gene.

Fig. 1:

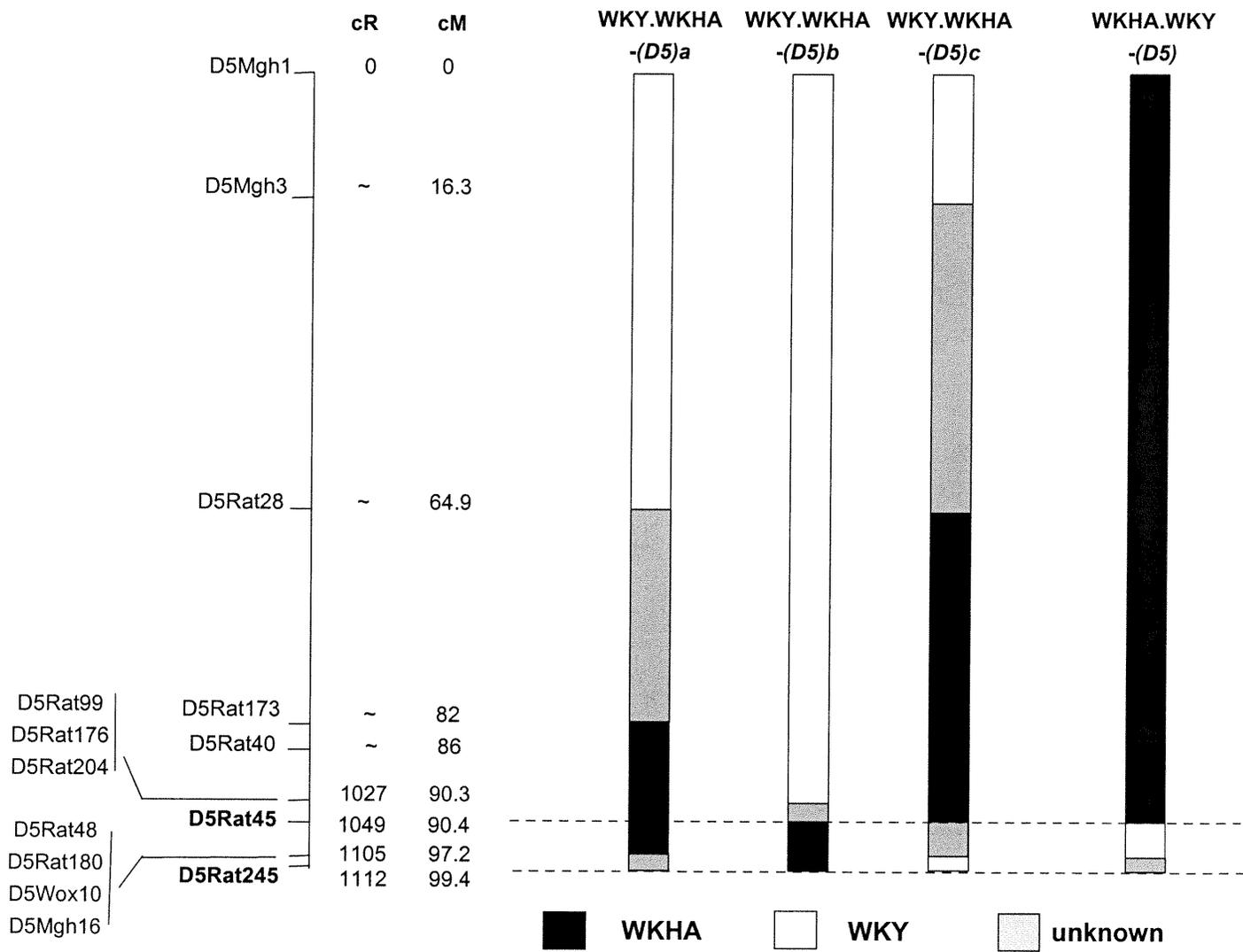
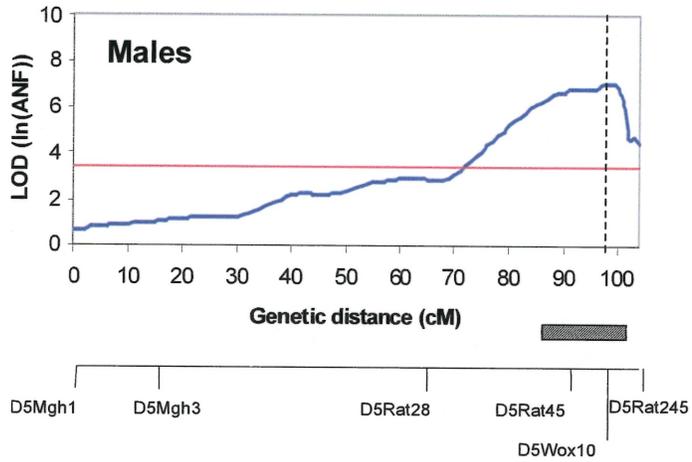
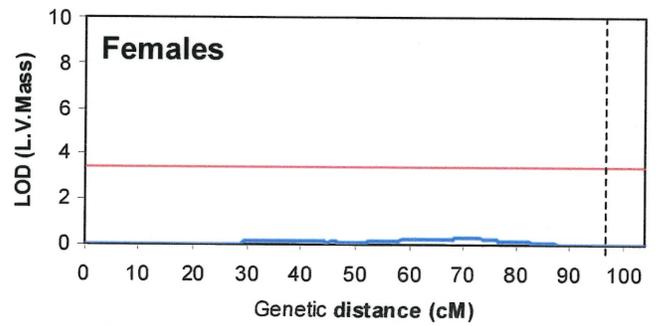
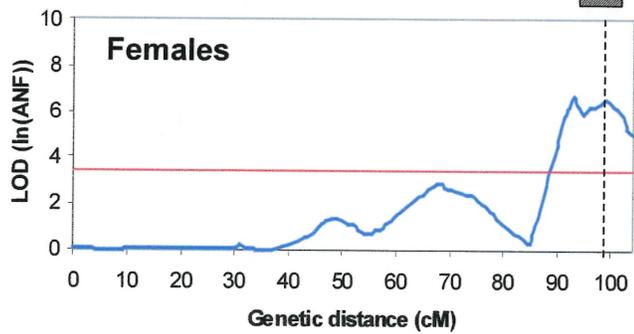
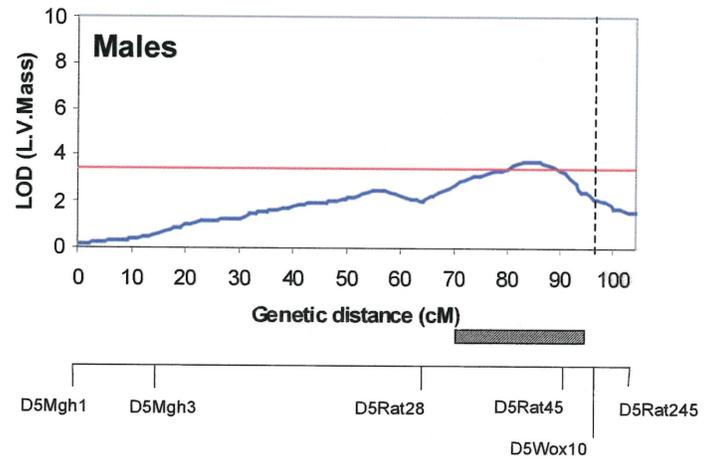


Fig. 2

## LOD plot for LV ANF



## LOD plot for LVM



## CHAPITRE 5 : DISCUSSION

### 5.1 Cartes génétique et physique

Les analyses de liaisons permettent d'associer des régions précises du génome au phénotype d'intérêt. Cependant, ces analyses ne permettent pas de déterminer le nombre de QTLs ou de gènes dans les régions en question et responsables des différences phénotypiques observées entre les souches parentales de départ. Comme dans certaines des études détaillées dans l'introduction ((Saad et al., 1999), (Saad et al., 2001) et (Garrett et al., 2001)), il n'est pas exclu que la région du chromosome 5 associée de façon statistique à l'hypertrophie cardiaque et à l'ANFv contienne plus d'un QTL. La génération de lignées congéniques dans cette étude a permis d'obtenir des informations plus précises sur le (ou les) QTL détecté sur le chromosome 5 ainsi que sur leur rôle dans les phénotypes d'ANFv et de masse cardiaque chez les individus mâles. Chez les mâles des lignées congéniques, la région en provenance de la souche donneuse minimale introduite dans la souche receveuse qui permet de faire varier le phénotype de la souche receveuse est de 63 cR, ce qui correspond à 10MB. En effet, chez les mâles de la lignée WKY.WKHA-(D5Rat45-D5Rat245), l'introduction dans le fond génétique des WKY du fragment D5Rat45-D5Rat245 (région minimale) en provenance de la souche WKHA est suffisant pour ramener les valeurs d'ANFv et de largeur des cardiomyocytes aux niveaux observés chez les rats WKHA. Chez les mâles de la lignée WKY.WKHA-(D5Rat173-D5Mgh16), le fragment plus grand D5Rat173-D5Mgh16 en provenance de la souche WKHA résulte en des cardiomyocytes plus larges que ceux de la souche receveuse mais moins larges que ceux de la souche donneuse. Cette différence entre la région minimale D5Rat45-D5Rat245 et la région plus grande D5Rat173-D5Mgh16 pourrait être expliquée par la présence d'un QTL avec un effet contraire à l'effet du principal QTL détecté qui serait situé dans le fragment D5Rat173-D5Mgh16 mais hors du fragment minimal D5Rat45-D5Rat245. La validité de la méthode de génération de lignée congénique utilisée est confirmée par le fait que le fragment D5Rat28-D5Rat45 de la lignée WKY.WKHA-(D5Rat28-D5Rat45) ne fait pas varier les valeurs des phénotypes par rapport à celles de la

## CHAPITRE 5 : DISCUSSION

### 5.1 Cartes génétique et physique

Les analyses de liaisons permettent d'associer des régions précises du génome au phénotype d'intérêt. Cependant, ces analyses ne permettent pas de déterminer le nombre de QTLs ou de gènes dans les régions en question et responsables des différences phénotypiques observées entre les souches parentales de départ. Comme dans certaines des études détaillées dans l'introduction ((Saad et al., 1999), (Saad et al., 2001) et (Garrett et al., 2001)), il n'est pas exclu que la région du chromosome 5 associée de façon statistique à l'hypertrophie cardiaque et à l'ANFv contienne plus d'un QTL. La génération de lignées congéniques dans cette étude a permis d'obtenir des informations plus précises sur le (ou les) QTL détecté sur le chromosome 5 ainsi que sur leur rôle dans les phénotypes d'ANFv et de masse cardiaque chez les individus mâles. Chez les mâles des lignées congéniques, la région en provenance de la souche donneuse minimale introduite dans la souche receveuse qui permet de faire varier le phénotype de la souche receveuse est de 63 cR, ce qui correspond à 10MB. En effet, chez les mâles de la lignée WKY.WKHA-(*D5Rat45-D5Rat245*), l'introduction dans le fond génétique des WKY du fragment *D5Rat45-D5Rat245* (région minimale) en provenance de la souche WKHA est suffisant pour ramener les valeurs d'ANFv et de largeur des cardiomyocytes aux niveaux observés chez les rats WKHA. Chez les mâles de la lignée WKY.WKHA-(*D5Rat173-D5Mgh16*), le fragment plus grand *D5Rat173-D5Mgh16* en provenance de la souche WKHA résulte en des cardiomyocytes plus larges que ceux de la souche receveuse mais moins larges que ceux de la souche donneuse. Cette différence entre la région minimale *D5Rat45-D5Rat245* et la région plus grande *D5Rat173-D5Mgh16* pourrait être expliquée par la présence d'un QTL avec un effet contraire à l'effet du principal QTL détecté qui serait situé dans le fragment *D5Rat173-D5Mgh16* mais hors du fragment minimal *D5Rat45-D5Rat245*. La validité de la méthode de génération de lignée congénique utilisée est confirmée par le fait que le fragment *D5Rat28-D5Rat45* de la lignée WKY.WKHA-(*D5Rat28-D5Rat45*) ne fait pas varier les valeurs des phénotypes par rapport à celles de la

souche receveuse WKY. Cette lignée constitue un contrôle : elle a été générée durant le même processus que les lignées WKY.WKHA-(D5Rat173-D5Mgh16) et WKY.WKHA-(D5Rat45-D5Rat245) et il est donc supposé que les éventuelles régions du génome en provenance de la souche donneuse restantes dans le fond génétique des lignées congéniques finales n'affectent pas les valeurs des phénotypes. Ce contrôle permet d'avoir confiance dans les résultats obtenus avec les autres lignées et ce, malgré le relativement faible nombre (57 : voir tableau I p.31) de marqueurs utilisés pour cribler le génome des rats durant le processus de génération.

De façon réciproque, chez les mâles de la lignée WKHA.WKY-(D5Rat45-D5Mgh16), le fragment D5Rat45-D5Mgh16 en provenance de la souche donneuse WKY introduite dans le fond génétique WKHA résulte en des cardiomyocytes beaucoup moins larges que ceux de la souche receveuse WKHA et un peu moins larges que ceux de la souche donneuse. Ces résultats sont toujours consistants avec la présence d'un QTL ayant un effet contraire à l'effet du principal QTL détecté et qui serait situé hors du fragment D5Rat45-D5Mgh16.

Ces observations rappellent l'importance du fond génétique pour l'expression d'un QTL : il est par exemple possible qu'un QTL ne soit effectif que dans un fond génétique précis et que celui-ci ne puisse s'exprimer en dehors d'un certain contexte génétique. Les interactions épistatiques telles qu'observées dans certains modèles développés pour étudier l'hypertension (Rapp et al., 1998) et (Kreutz et al., 1996) sont aux nombres des phénomènes d'interactions entre un QTL et d'autres QTLs, situés dans d'autres régions. Des effets additifs ou de dominance peuvent aussi être en cause. Des méthodes statistiques ont été développées pour tenir compte de ces différentes sortes d'interactions entre plusieurs QTLs (Yi and Xu, 2002) et (Carlborg and Andersson, 2002). Les analyses de liaisons effectuées au cours de l'étude détaillée ici ont permis de détecter des QTL liés à l'hypertrophie cardiaque dans d'autres régions du génome, sur les chromosomes 12 et 17. La confirmation des valeurs obtenues dans les analyses préliminaires est encore en cours au moment de la rédaction de ce mémoire. Il est à noter que les analyses statistiques sont tributaires du nombre et de la sélection des animaux testés (Innes et al., 1998), (Darvasi and Weller, 1992), (Lander and Botstein, 1989) (résumé dans (Darvasi, 1997) ainsi que du nombre et de la répartition sur le génome des marqueurs utilisés (Darvasi et al., 1993) et (Darvasi and Soller, 1994). De plus, la

puissance de détection de QTL est liée à l'importance du QTL dans le développement du phénotype étudié (Darvasi et al., 1993). Des lignées congéniques réciproques pour le QTL détecté sur le chromosome 12 ont été générés, mais la mesure du ratio largeur/longueur des cardiomyocytes n'a pu confirmer l'implication d'un gène situé sur le chromosome 12 dans le développement de l'hypertrophie des cardiomyocytes. Il serait possible de vérifier si le nombre de cellules, à défaut de leur taille, pourrait être affecté par cette région. Il faut garder en tête que les analyses de liaison produisent des résultats statistiques qui doivent être confirmés : de là l'intérêt de produire une carte physique des régions identifiées lors de la production de la carte génétique.

Les résultats obtenus avec les rats des lignées congéniques permettent de conclure que bien que plusieurs gènes connus et inconnus sont situés dans la région d'intérêt, il serait peu probable que deux gènes différents, hypothétiquement responsables des deux phénotypes qui nous intéressent, aient coségrégé dans cette région lors de la génération des lignées congéniques. Cependant, cette hypothèse, bien que peu plausible, doit être encore considérée.

### 5.1.2 Marqueurs M13 vs traditionnels

Les marqueurs M13 possèdent quelques avantages par rapport aux marqueurs traditionnels. La possibilité de les utiliser avec des séquenceurs automatiques a précédemment été montrée (Boutin et al., 1997), (Oetting et al., 1995) et (Steffens et al., 1993). En plus de diminuer le coût d'un projet qui prévoit le criblage de génomes à l'aide de marqueurs marqués avec un fluorochrome détectés par certains séquenceurs automatiques, nous avons démontré que l'utilisation des marqueurs M13 permet l'obtention de produits de PCR plus propres. Il semble que ceci pourrait être dû à la faible quantité du marqueur droit auquel est ajouté la queue M13 par rapport aux autres oligonucléotides (1:15) utilisé dans la réaction de PCR. Une telle quantité d'oligonucléotide réduirait les possibilités d'interactions non-spécifiques avec la matrice d'ADN et ainsi, l'apparition des bandes parasites normalement observés pour des réactions avec la paire de marqueurs traditionnels.

## 5.2 Identification d'un gène candidat

Le séquençage du promoteur du gène *Nppa* a mené à l'identification d'un SNP. Ce SNP est situé dans une région du promoteur qui a précédemment été démontré comme importante pour la régulation de la transcription du gène (Durocher et al., 1996). Les résultats obtenus à l'aide de la transfection des différentes formes de promoteurs associés à un gène rapporteur dans des cardiomyocytes en culture (Deschepper et al., 2001) laissent croire que cette différence moléculaire pourrait être celle responsable de la différence d'ANF<sub>v</sub> entre les deux souches parentales de départ, différence qui serait responsable pour les variations de masse cardiaque observées. Ces résultats se résument ainsi : la forme du promoteur minimal du gène *Nppa* retrouvée chez les rats WKY, lorsque transfectée dans les cardiocytes, présentait une activité transcriptionnelle plus élevée que la forme du même promoteur retrouvée chez les WKHA. Ces résultats laissent croire que le niveau de transcription du gène *Nppa* est différent entre les souches de rats WKY et WKHA. Cependant, il ne faut pas négliger la possibilité que d'autres polymorphismes présents dans ce gène puissent expliquer les différences de phénotypes observés entre les souches parentales. Le séquençage du gène *Nppa* effectué précédemment avait permis de montrer l'existence d'un autre SNP situé en 3'UTR (*Untranslated region*) de ce gène. En effet, il n'est pas exclu que les différences d'ANF<sub>v</sub> ne soient pas dues à des différences dans la transcription du gène *Nppa*, mais bien à des différences dans la stabilité de son acide ribonucléique messager (ARNm). Il est connu que les régions situées en 3'UTR sont parfois responsables de cette stabilité de l'ARNm et donc de la quantité finale de protéine produite. Cependant, nous n'avons pas vérifié cette possibilité de façon expérimentale. La stabilité de la protéine pourrait aussi être affectée par une différence d'une paire de base dans la séquence du gène. Dans le cas où une paire de base serait modifiée dans la région codante de l'ADN et que cette substitution change l'acide aminé codé en bout de ligne, la structure tridimensionnelle de la protéine produite pourrait être modifiée et sa stabilité, affectée. Cette hypothèse est peu plausible à la lumière des résultats obtenus qui ont permis de démontrer que la quantité d'ARNm de l'ANF ventriculaire est plus élevée chez les WKY que chez les WKHA (Masciotra et al., 1999).

Par ailleurs, il existe de nombreuses autres régions capables de réguler la transcription de l'ANF en amont et en aval des régions étudiées ici.

L'hypothèse selon laquelle les différences moléculaires observés dans le gène *Nppa* entre les deux souches de départ expliqueraient les différences phénotypiques (ANF<sub>v</sub> et masse cardiaque) est intéressante et a été fortement renforcée par la faible longueur de la région d'intérêt lors le génération de lignées congéniques. Par ailleurs, il existe beaucoup d'évidences fonctionnelles reliant le gène *Nppa* (et d'autres gènes associés) à l'hypertrophie du ventricule gauche : les souris qui ont subi une ablation génique des gènes *Nppa* ou *Npr1* (codant pour le NPRA) montrent une augmentation de la masse cardiaque non proportionnelle à l'augmentation de la pression artérielle observée (John et al., 1995), (Oliver et al., 1997), (Chusho et al., 2000); l'ANF ou un analogue du GMPc atténuent les effets hypertrophiques de la norépinéphrine sur des cardiomyocytes de rats néonataux en culture (Calderone et al., 1998), (Silberbach et al., 1999) alors qu'un antagoniste de l'ANF amplifie ces effets (Horio et al., 2000); des souris transgéniques qui surexpriment de façon constitutive la guanylate cyclase dans le coeur sont protégées contre les effets hypertrophiques de la catécholamine (Deschepper et al., 2002b). Cependant, il faut garder en tête que les résultats présentés ici ne permettent pas l'identification formelle du (ou des) gène responsable de ces différences. À la lumière des résultats obtenus précédemment concernant l'effet du SNP sur le niveau de transcription d'un gène rapporteur dans des cardiomyocytes (Masciotra et al., 1999), il est raisonnable de penser que les différences moléculaires observées dans le gène *Nppa* sont responsables des différences d'ANF<sub>v</sub> observées entre les deux souches de départ. Les résultats présentés ici avec les congéniques renforcent les résultats précédemment obtenus de l'analyse de liaison qui avait permis de détecter un QTL lié à la fois à la masse cardiaque et à l'ANF<sub>v</sub>. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle un seul QTL est responsable des deux phénotypes. Cependant, ces résultats ne prouvent pas que les différences observés dans le gène responsable de la différence d'ANF<sub>v</sub> sont aussi responsables des différences de masse cardiaque. D'autres études impliquant directement le gène *Nppa* et le SNP soupçonné dans la détermination de la masse cardiaque restent encore à faire. L'hypothèse de l'existence de deux gènes situés dans cette région et expliquant les deux phénotypes ne peut être excluse.

À titre d'exemple, il faut se rappeler les résultats concernant le gène *Sa* (voir introduction) qui avaient tout d'abord associé ce gène à l'hypertension, pour par la suite exclure son implication dans le développement de cette affection (pour un résumé sur ce sujet voir (Rapp, 1998)).

Les résultats obtenus grâce à la génération de congéniques ne permettent pas d'identifier formellement le gène responsable des différences phénotypiques observées entre les deux souches et encore moins, de conclure à l'importance de l'un des SNP décrits dans le développement de l'hypertrophie cardiaque.

Ces résultats permettent de renforcer l'hypothèse selon laquelle la région située sur le chromosome 5 et qui contient le gène *Nppa* est celle responsable des différences phénotypiques observées entre les deux souches.

### 5.3 Différences observées entre les individus mâles et femelles dans les déterminants de la taille des cardiomyocytes

Malgré des valeurs d'ANF<sub>v</sub> comparables, les différences de largeur des cardiomyocytes observés chez les mâles des lignées congéniques (par rapport aux valeurs mesurées chez les mâles des souches receveuses) ne sont pas remarquées chez les femelles. Ceci n'est pas surprenant puisque contrairement aux cardiomyocytes isolés chez les mâles des souches de départ, les cardiomyocytes isolés chez les femelles WKHA et WKY diffèrent en longueur et non pas en largeur : l'hypertrophie cardiaque observée chez les femelles WKHA pourrait être d'une nature différente comparée à celle observée chez les mâles de la même souche et donc soumis à l'influence de gènes différents. Il est conclu que la région du chromosome 5 (contenant le gène *Nppa*) responsable des différences d'ANF<sub>v</sub> et de largeur et donc de taille des cardiomyocytes isolés observées chez les mâles entre les souches de départ n'est pas responsable de la différence de taille des cardiomyocytes, mais seulement des différences d'ANF<sub>v</sub> chez les femelles.

Chez l'humain, plusieurs évidences laissent croire que certains déterminants génétiques de la masse cardiaque chez les hommes et les femmes diffèrent (voir introduction).

Les oestrogènes, hormones sexuelles sécrétées par la femme avant la ménopause, sont reconnues pour jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires. Voici quelques observations qui ont supporté cette hypothèse .

Les risques cardiovasculaires augmentent substantiellement chez la femme après sa ménopause (Grodstein et al., 1996) et (Barrett-Connor and Bush, 1991).

Une augmentation des accidents cardiovasculaires a été observée chez les jeunes femmes qui ont subi une chirurgie ayant provoquée une ménopause prématurée. Une sous-population de ces femmes, dont le traitement suivant la chirurgie comprenait la prise d'hormones de remplacement, a vu ses risques d'accidents cardiovasculaires diminuer de moitié (Stampfer et al., 1991), (Stampfer and Colditz, 1991) et (Belchetz, 1994).

Aussi, une série d'études cliniques ont démontré les effets protecteurs des oestrogènes contre les maladies cardiovasculaires (Farhat et al., 1996), (Reis, 1994).

Plus précisément reliée au phénotype de la masse cardiaque, quelques observations montrent des différences reliées au sexe pour ce phénotype et l'implication possible des oestrogènes dans ces différences.

Une hypertension modérée résulte chez des femmes pré-ménopausées en une masse du ventricule gauche plus faible que chez des hommes avec la même condition (Garavaglia et al., 1989).

Des études de populations ont montré que la masse cardiaque de femmes en bonne santé et normotendues augmentait avec l'âge alors que ce n'était pas le cas chez les hommes (Dannenbergh et al., 1989).

Une étude clinique a démontré qu'un substitut d'oestrogène associé à un antihypertenseur donné comme traitement à des femmes postménopausées souffrant d'hypertension permettait de réduire la masse de leur ventricule gauche de façon significative (Modena et al., 1999a) et (Modena et al., 1999b).

Une autre étude a suivie pendant plus de 10 ans des femmes post-ménoposées qui avaient recours à une thérapie de remplacement d'hormones. Les résultats de cette étude ont montré que la thérapie de remplacement prévenait l'augmentation de l'épaississement des parois septales et postérieures du cœur des patientes qui y avaient recours (Lim et al., 1999).

Des études effectuées chez les rats ont montrées que des différences aux niveaux de la taille et de la forme des cardiomyocytes pouvaient être observées entre des individus mâles et des femelles d'une même souche (Tamura et al., 1999). Des différences selon le sexe dans la fonction contractile ont aussi été notées (Capasso et al., 1983). Les résultats obtenus au cours de l'étude en cours vont dans ce sens. La morphologie des cardiomyocytes isolés à partir de coeur de rats mâles est différente de celle des cardiomyocytes isolés à partir des coeurs des femelles. Ce qui laisse supposer des caractéristiques physiologiques (de base et en réponse à divers stimuli) différentes chez les mâles et les femelles. Cependant, il est encore impossible d'expliquer ces différences au niveau cellulaire. À ce jour, les variations de longueur et de largeur des cardiomyocytes adultes n'ont pratiquement été étudiées que du point de vue morphologique. On n'en connaît donc que très peu concernant la régulation des variables cellulaires. Il a été documenté qu'un réseau de protéines du cytosquelette attache le noyau au sarcolème (Terracio et al., 1988).

Mais, aucune altération du cytosquelette ou des protéines de la matrice extracellulaire n'a pu être corrélée avec des changements de forme des cardiomyocytes (Gerdes et al., 1995). La possibilité de pouvoir lier certains gènes à ces variables permettra peut-être d'élucider les rôles de certains processus cellulaires.

D'autres études effectuées chez les animaux montrent des différences au niveau du développement de l'hypertrophie cardiaque en réponse à divers stimuli entre les mâles et les femelles et mettent en évidence le rôle possible des oestrogènes dans ces différences, comme observé chez l'humain (Résumé dans (Schwartzbauer and Robbins, 2001) (Babiker et al., 2002)).

Après une surcharge de pression maintenue durant plusieurs semaines, il a été observé que les rats Fisher mâles entraient en insuffisance cardiaque plus rapidement que les femelles (Tamura et al., 1999) et (Douglas et al., 1998).

Chez les rats Wistar, il a été démontré que les oestrogènes peuvent influencer l'expression des gènes cardiaques durant une surcharge de pression (Weinberg et al., 1999). Notamment dans cette étude, le cœur des femelles hypertrophiées exprimait moins d'ARNm de  $\beta$ -MHC que le cœur des rats mâles hypertrophiés.

Dans un modèle de souris, il a été démontré qu'une thérapie de remplacement au  $17\beta$ -estradiol donnée à des souris ovariectomisées permettait de prévenir l'hypertrophie cardiaque en réponse à une surcharge de pression (van Eickels et al., 2001).

Une étude *in vitro* a démontré qu'un prétraitement avec du  $17\beta$ -estradiol sur des cardiomyocytes de rats en culture protégeait les cellules en provenance des femelles seulement contre les effets négatifs d'une hypoxie (Jovanovic et al., 2000).

Les oestrogènes médient leurs actions via l'augmentation de la production de NO. En plus d'avoir des effets de vasodilatation, des études récentes montrent que les oestrogènes peuvent avoir des effets directs sur les cardiomyocytes. Des récepteurs de l'oestrogène ont été observés sur les cardiomyocytes (Grohe et al., 1997). Le récepteur ER $\beta$  serait responsable de l'activation par l'oestrogène des NO synthases dans des cardiomyocytes néonataux de rats en culture (Nuedling et al., 2001).

Une équipe de recherche a montré que le  $17\beta$ -estradiol stimule l'expression des NO synthases dans des cardiomyocytes néonataux et adultes de rats isolés. Cette équipe a aussi mesuré la quantité de protéine des NO synthases et démontré que cette quantité était plus petite chez des femelles WKY ovariectomisées que chez les femelles contrôles (Nuedling et al., 1999).

Le NO est un activateur de la forme soluble de la guanylate cyclase et permet donc d'augmenter le niveau de cGMP dans la cellule (voir introduction). Le cGMP est le second messager de l'ANF et médie ses actions.

Je rappelle que la région du chromosome 5 (contenant le gène *Nppa*) est responsable des différences de l'ANF<sub>v</sub> et de taille des cardiomyocytes chez les mâles, alors que cette région est responsable des différences de l'ANF<sub>v</sub> seulement chez les femelles. Admettons que les différences moléculaires observées dans le gène *Nppa* entre les rats WKY et WKHA expliquent les différences d'ANF<sub>v</sub>, de taille des cardiomyocytes et de masse cardiaque chez les mâles. Pour expliquer que les différences observées chez les mâles ne sont pas observées chez les femelles, il serait possible de poser l'hypothèse suivante. On pourrait penser qu'un taux plus élevé de GMPc dans les cardiomyocytes des femelles (expliqué par la production de NO synthase induite par les oestrogènes) protège déjà les individus femelles contre l'hypertrophie cardiaque. Une plus grande concentration de GMPc (causée par une plus grande ANF<sub>v</sub>, comme chez les rats WKY) ne pourrait protéger d'avantage les cellules contre une augmentation de taille. D'autres facteurs devraient alors être en cause pour expliquer les différences de masse cardiaque observées entre les femelles des deux souches. Évidemment, cette hypothèse devra être testée : les rats congéniques pourraient permettre d'y arriver.

## 5.4 Expérimentations futures

### 5.4.1 Réduction de la longueur du segment introduit dans la souche receveuse

La réduction de la région du chromosome 5 étudiée chez les rats des lignées congéniques devra être réalisée en effectuant un croisement en retour entre un mâle de chacune des lignées congéniques et plusieurs femelles de la souche receveuse. Des individus présentant différents fragments en provenance de la souche donneuse devraient être générés et pourront subséquemment être croisés entre eux pour obtenir des individus homozygotes. Les marqueurs situés dans la région d'intérêt seront utilisés pour déterminer la provenance parentale des régions bordant le QTL. Les mesures de la taille des cardiomyocytes et de l'ANFv sur les individus ainsi générés permettront de déterminer quelle région du chromosome porte le QTL d'intérêt. Ces informations mèneront à la réduction de la longueur de cette région (jusqu'à 0.53cM dans l'étude de l'équipe du Dr Rapp (Cicila et al., 2001)) (voir figure 5, p. 87).

La production de lignées sous-congéniques arborant de plus petites régions en provenance de la souche donneuse pourraient permettre de supporter ou d'exclure la possibilité de la présence d'un seul QTL dans cette région qui serait responsable des deux phénotypes observés. De tels résultats futurs pourraient mener à l'identification formelle du gène en cause et ainsi confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle le gène candidat *Nppa* est impliqué dans la détermination de la masse cardiaque dans le modèle utilisé.

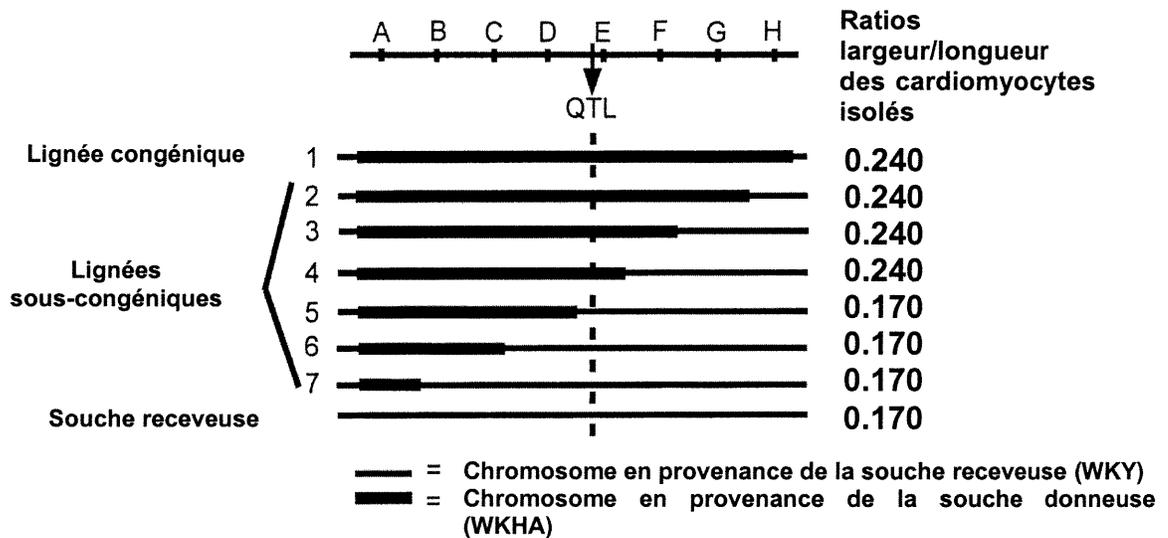


Figure 5 : Génération de lignées sous-congéniques.

Le diagramme présente l'introduction d'une région d'un chromosome (par exemple le chromosome 5) en provenance de la souche donneuse WKHA dans le fond génétique de la souche receveuse WKY. Il est supposé qu'une série de marqueurs connus bordent le QTL lié à la taille des cardiomyocytes détecté grâce à l'analyse de liaison préalable, QTL hypothétiquement situé entre les marqueurs D et E. La lignée 1 correspond à une lignée congénique pour laquelle la région entre les marqueurs A et H en provenance de la souche donneuse a été introduite. Cette région en provenance de la souche WKHA est responsable de l'augmentation de la taille des cardiomyocytes par comparaison à ceux de la souche receveuse WKY. Les lignées 2 à 6 sont des lignées sous-congéniques qui présentent différentes régions en provenance de la souche donneuse, générées pour cibler la région qui contient le QTL en réduisant sa longueur. (Adapté de (Rapp and Deng, 1995) et (Rapp, 2000)).

#### 5.4.2 Association du SNP détecté dans le promoteur du gène *Nppa* et de la masse cardiaque chez d'autres souches de rats et d'autres espèces

Une autre approche pourrait permettre d'identifier formellement le gène *Nppa* comme responsable du développement des deux phénotypes étudiés : l'association du SNP détecté dans le promoteur du gène avec ces phénotypes dans d'autres souches de rats. En effet, si le C observé chez les WKHA corrèle significativement avec une taille élevée des cardiomyocytes isolés et que le T observé chez les WKY corrèle significativement avec une faible taille des cardiomyocytes isolés chez plusieurs souches de rats, ceci constituerait une preuve supplémentaire de l'importance de ce SNP et du gène *Nppa* dans la détermination du trait complexe qu'est la masse cardiaque chez le rat.

Une variante de cette approche vérifiera l'association du SNP avec les phénotypes d'intérêt dans une population non-consanguine de rats présentant les deux variantes décrites du SNP en question.

Il pourrait être pertinent de séquencer le gène *Nppa* chez l'humain, d'identifier des SNP dans diverses régions codantes et non-codantes du gène et de vérifier les associations de variantes du gène avec la masse cardiaque et les ANFv. La détection d'une corrélation permettrait de conclure à l'importance du gène *Nppa* et des ANFv dans le développement de l'hypertrophie cardiaque chez l'humain.

Ce type d'étude est couramment effectué chez l'humain dans le but d'associer un SNP avec divers phénotypes. Voici des exemples qui concernent le gène de l'ANF ou l'hypertrophie cardiaque.

Une variante du gène de l'ANF (G664A) a été associée à une susceptibilité aux accidents cérébraux vasculaires dans un modèle animal. Deux équipes de recherche ont voulu vérifier si le phénomène était aussi observé chez l'humain. Ils ont montré que ce polymorphisme n'était pas retrouvé plus souvent dans un groupe de patients ayant subi des accidents cérébraux comparé aux individus contrôles. Ce polymorphisme ne semble pas être un facteur de risque important pour les accidents cérébraux vasculaires chez cette population (Hassan et al., 2001).

Une variante génétique du gène *GNB3* (C825T) codant pour la sous-unité beta(3) de la protéine G est responsable d'une augmentation de l'activité de la protéine G et de la croissance cellulaire. Une équipe de recherche a montré l'association entre le

polymorphisme 825T et l'Hypertrophie du ventricule gauche (HVG) chez une population de personnes hypertendues (Poch et al., 2000).

#### 5.4.3 Effet protecteur de l'œstrogène contre l'hypertrophie cardiaque

Les lignées congéniques générées permettront de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'ANFv n'affecte pas la taille des cardiomyocytes isolés chez les femelles, parce que d'autres facteurs sont prédominants dans cette population.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, l'une des études planifiées est l'observation de la variation de la taille des cardiomyocytes chez les femelles congéniques ovariectomisées. Les oestrogènes sont soupçonnées de jouer un rôle protecteur dans le développement des maladies cardiovasculaires et l'hypertrophie cardiaque dans différents modèles de rats et chez l'humain (Résumé dans (Schwartzbauer and Robbins, 2001) et (Babiker et al., 2002)). L'absence d'oestrogènes, conséquence de l'ovariectomisation de femelles, pourrait permettre d'observer l'effet de la région du chromosome 5 contenant le gène *Nppa* (effet observé chez les mâles) dans la population femelle.

#### 5.4.4 Analyses de liaison chez les femelles et dans d'autres croisements de rats

Il sera intéressant de compléter l'analyse de liaison débutée dans la population femelle des rats de la génération F2 issus du croisement entre les WKY et les WKHA. Les résultats comparés des analyses sur le chromosome 5 chez la population mâle et femelle a permis de constater que les déterminants génétiques de l'hypertrophie cardiaque diffèrent entre les deux populations dans les modèles étudiés. Plusieurs évidences laissent supposer que ces différences sont aussi observables chez l'humain.

La détection d'autres QTLs, spécifiques à la population femelle, est à espérer. Quelques études effectuées précédemment sur des populations femelles de divers croisements ont déjà permis la détection de QTLs liés à l'hypertension et

spécifiques aux femelles (Kloting et al., 2001), (Jeffer et al., 2000), (Yagil et al., 1999), (Yagil et al., 1998) et (Clark et al., 1996).

Une analyse de liaison à effectuer sur les individus de la génération F2 issus d'un croisement entre les rats WKY et LEW est envisagé au laboratoire. Ces rats présentent une différence quantitative pour la masse cardiaque et sont génétiquement éloignés, ce qui permet d'espérer la détection de QTLs liés à la masse cardiaque différents de ceux détectés précédemment (WKY X WKHA) et en plus grand nombre. En effet, plus les rats sont éloignés génétiquement, plus le nombre de gènes impliqués dans la présence des différences phénotypiques observées sera grand. Cependant les QTLs détectés risquent d'avoir une plus faible importance dans le développement des phénotypes d'intérêt. Il sera donc important de cribler le génome des individus avec une série assez dense de marqueurs (10cM), ce qui sera facilité par le grand nombre de marqueurs polymorphes entre les deux souches (Darvasi et al., 1993).

#### 5.4.5 Approches alternatives complémentaires

Dans la recherche des déterminants génétique de l'hypertrophie cardiaque, différentes approches alternatives et complémentaires devraient être utilisées. L'étude du profil d'expression des gènes au niveau du génome dans son ensemble est une méthode assez nouvelle et prometteuse pour l'identification de gènes candidats. Cette méthode a déjà permis l'association du facteur du complément C5 à l'asthme allergique (Cormier et al., 1997).

Cette méthode appliquée sur les animaux congéniques générés serait toute indiquée pour identifier formellement le gène responsable des différences de masse cardiaque observées entre les rats WKY et WKHA. En effet, ces animaux devraient présenter un profil d'expression de gènes très semblable. Les gènes différentiellement exprimées (région du chromosome 5) devraient être en nombre réduit, ce qui pourrait en faciliter l'identification. Une telle étude avec des animaux congéniques a déjà menée à l'identification d'un gène responsable du métabolisme anormal chez des rats hypertendus (Aitman et al., 1999).

Il serait aussi possible de mettre à profit la protéomique. L'observation des protéines différentiellement exprimées entre les rats WKY et WKHA et entre les diverses souches de congéniques pourraient permettre l'identification des déterminants du phénotype étudié.

## 5.5 Conclusion

L'analyse de liaison précédemment effectuée sur les individus mâles issus du croisement F2 entre les souches de rats WKY et WKHA, normotendues et présentant une différence quantitative pour la masse cardiaque, a permis d'établir que le chromosome 5 contenait un locus lié à la fois à la masse cardiaque et à l'ANFv. Il existe de fortes évidences génétiques et moléculaires pour que les différences phénotypiques observées entre les souches parentales de départ puissent être expliquées par des différences au niveau du gène codant pour le précurseur de l'ANF (*Nppa*), situé sur le chromosome 5 (Deschepper et al., 2001). L'analyse de liaison effectuée chez les individus femelles issus du même croisement a permis de déterminer que le locus sur le chromosome 5 contenant le gène *Nppa* n'est pas lié à la masse cardiaque bien qu'il soit lié à l'ANFv dans cette population.

Les mesures d'ANFv et de taille des cardiomyocytes isolés des coeurs de rats congéniques WKY.WKHA-(*D5Rat45-D5Rat245*) et WKHA.WKY-(*D5Rat45-D5Mgh16*) ont permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle la région du chromosome 5 qui contient le gène *Nppa* est responsable des différences phénotypiques observées entre les mâles des souches parentales de départ WKY et WKHA.

Cependant, les résultats phénotypiques observés chez les individus femelles issues de ces lignées ont prouvé que la provenance parentale du fragment d'intérêt ne détermine que la valeur d'ANFv dans cette population.

Ces résultats permettent d'appuyer l'hypothèse selon laquelle l'état du gène *Nppa* situé dans cette région du chromosome 5 pourrait être responsable des différences d'ANFv et de la masse cardiaque observées entre les individus mâles des deux souches WKY et WKHA, mais pas chez les individus femelles de ces souches.

Des différences dans les déterminants génétiques de l'hypertrophie cardiaque en fonction du sexe ont été mis en évidence dans ce modèle. Il sera intéressant d'identifier des déterminants de la masse cardiaque spécifiques aux femelles et de tester l'hypothèse de l'effet protecteur des oestrogènes sur ce phénotype.

## BIBLIOGRAPHIE

Aitman,T.J., Glazier,A.M., Wallace,C.A., Cooper,L.D., Norsworthy,P.J., Wahid,F.N., Al Majali,K.M., Trembling,P.M., Mann,C.J. , Shoulders,C.C., Graf,D., St Lezin,E., Kurtz,T.W., Kren,V., Pravenec,M., Ibrahimi,A., Abumrad,N.A., Stanton,L.W., and Scott,J. (1999). Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat. Genet.* *21*, 76-83.

Aitman,T.J., Gotoda,T., Evans,A.L., Imrie,H., Heath,K.E., Trembling,P.M., Truman,H., Wallace,C.A., Rahman,A., Dore,C., Flint,J., Kren,V., Zidek,V., Kurtz,T.W., Pravenec,M., and Scott,J. (1997). Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat. Genet.* *16*, 197-201.

Amann,K., Rychlik,I., Miltenberger-Milteny,G., and Ritz,E. (1998). Left ventricular hypertrophy in renal failure. *Kidney Int. Suppl* *68*, S78-S85 .

Anan,R., Greve,G., Thierfelder,L., Watkins,H., McKenna,W.J., Solomon,S., Vecchio,C., Shono,H., Nakao,S., Tanaka,H., and . (1994). Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin. Invest* *93*, 280-285.

Anversa,P., Capasso,J.M., Olivetti,G., and Sonnenblick,E.H. (1992). Cellular basis of ventricular remodeling in hypertensive cardiomyopathy. *Am J Hypertens* *5*, 758-770.

Argentin,S., Nemer,M., Drouin,J., Scott,G.K., Kennedy,B.P., and Davies,P.L. (1985). The gene for rat atrial natriuretic factor. *J Biol. Chem.* *260*, 4568-4571.

Aurigemma,G.P. and Gaasch,W.H. (1995). Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology* *86*, 310-317.

Babiker,F.A., De Windt,L.J., van Eickels,M., Grohe,C., Meyer,R., and Doevendans,P.A. (2002). Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc. Res.* 53, 709-719.

Barrett-Connor,E. and Bush,T.L. (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 265, 1861-1867.

Belchetz,P.E. (1994). Hormonal treatment of postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 330, 1062-1071.

Benetos,A., Rudnichi,A., Thomas,F., Safar,M., and Guize,L. (1999). Influence of heart rate on mortality in a French population: role of age, gender, and blood pressure. *Hypertension* 33, 44-52.

Boutin,P., Hani,E.H., Vasseur,F., Roche,C., Bailleul,B., Hager,J., and Froguel,P. (1997). Automated fluorescence-based screening for mutation by SSCP: use of universal M13 dye primers for labeling and detection. *Biotechniques* 23, 358-362.

Brodde,O.E. (1991). *Be. Pharmacol. Rev.* 43, 203-242.

Brooksby,P., Levi,A.J., and Jones,J.V. (1992). Contractile properties of ventricular myocytes isolated from spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.* 10, 521-527.

Brooksby,P., Levi,A.J., and Jones,J.V. (1993). The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 11, 611-622.

Brown,L., Sernia,C., Newling,R., and Fletcher,P. (1992). Cardiac responses after norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in rats. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 20, 316-323.

Calderone,A., Takahashi,N., Izzo,N.J., Jr., Thaik,C.M., and Colucci,W.S. (1995). *Pres. Circulation* 92, 2385-2390.

Calderone,A., Thaik,C.M., Takahashi,N., Chang,D.L., and Colucci,W.S. (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin. Invest* 101, 812-818.

Capasso,J.M., Remily,R.M., Smith,R.H., and Sonnenblick,E.H. (1983). Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res. Cardiol.* 78, 156-171.

Carlborg,O. and Andersson,L. (2002). Use of randomization testing to detect multiple epistatic QTLs. *Genet. Res.* 79, 175-184.

Chang,M.S., Lowe,D.G., Lewis,M., Hellmiss,R., Chen,E., and Goeddel,D.V. (1989). Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 341, 68-72.

Chapman,D., Weber,K.T., and Eghbali,M. (1990). Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ. Res.* 67, 787-794.

Chaturvedi,N., Athanassopoulos,G., McKeigue,P.M., Marmot,M.G., and Nihoyannopoulos,P. (1994). Echocardiographic measures of left ventricular structure and their relation with rest and ambulatory blood pressure in blacks and whites in the United Kingdom. *J Am Coll. Cardiol.* 24, 1499-1505.

Chevalier,B., Mansier,P., Callens-el Amrani,F., and Swynghedauw,B. (1989). Beta-adrenergic system is modified in compensatory pressure cardiac overload in rats: physiological and biochemical evidence. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 13, 412-420.

Chinkers,M., Garbers,D.L., Chang,M.S., Lowe,D.G., Chin,H.M., Goeddel,D.V., and Schulz,S. (1989). A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 338, 78-83.

Chusho,H., Ogawa,Y., Tamura,N., Suda,M., Yasoda,A., Miyazawa,T., Kishimoto,I., Komatsu,Y., Itoh,H., Tanaka,K., Saito,Y., Garbers,D.L., and Nakao,K. (2000). Genetic models reveal that brain natriuretic peptide can signal through different tissue-specific receptor-mediated pathways. *Endocrinology* 141, 3807-3813.

Cicila,G.T., Choi,C., Dene,H., Lee,S.J., and Rapp,J.P. (1999). Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on chromosome 3 in Dahl rats. *Mamm. Genome* 10, 112-116.

Cicila,G.T., Garrett,M.R., Lee,S.J., Liu,J., Dene,H. , and Rapp,J.P. (2001). High-resolution mapping of the blood pressure QTL on chromosome 7 using Dahl rat congenic strains. *Genomics* 72, 51-60.

Clark,J.S., Jeffs,B., Davidson,A.O., Lee,W.K., Anderson,N.H., Bihoreau,M.T., Brosnan,M.J., Devlin,A.M., Kelman,A.W., Lindpaintner,K., and Dominiczak,A.F. (1996). Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension* 28, 898-906.

Cohn,J.N., Levine,T.B., Olivari,M.T., Garberg,V., Lura,D., Francis,G.S., Simon,A.B., and Rector,T. (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N. Engl. J Med.* 311, 819-823.

Cormier,R.T., Hong,K.H., Halberg,R.B., Hawkins,T.L., Richardson,P., Mulherkar,R., Dove,W.F., Lander,E.S. (1997). Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nature Genet.* 17, 88-91.

Cowley,A.W., Jr., Roman,R.J., Kaldunski,M.L., Dumas,P., Dickhout,J.G., Greene,A.S., and Jacob,H.J. (2001). Brown Norway chromosome 13 confers protection from high salt to consomic Dahl S rat. *Hypertension* 37, 456-461.

Cutilletta,A.F., Dowell,R.T., Rudnik,M., Arcilla,R.A., and Zak,R. (1975). Regression of myocardial hypertrophy. I. Experimental model, changes in heart weight, nucleic acids and collagen. *J. Mol. Cell Cardiol.* 7, 761-780.

Dannenberga,A.L., Levy,D., and Garrison,R.J. (1989). Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study). *Am. J. Cardiol.* 64, 1066-1068.

Darvasi,A. (1997). The effect of selective genotyping on QTL mapping accuracy. *Mamm. Genome* 8, 67-68.

Darvasi,A. and Soller,M. (1994). Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics* 138, 1365-1373.

Darvasi,A., Weinreb,A., Minke,V., Weller,J.I., and Soller,M. (1993). Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134, 943-951.

Darvasi,A. and Weller,J.I. (1992). On the use of the moments method of estimation to obtain approximate maximum likelihood estimates of linkage between a genetic marker and a quantitative locus. *Heredity* 68 ( Pt 1), 43-46.

de Simone,G., Devereux,R.B., Daniels,S.R., and Meyer,R.A. (1995). Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension* 26, 979-983.

Deng,A.Y., Dutil,J., and Sivo,Z. (2001). Utilization of marker-assisted congenics to map two blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats. *Mamm. Genome*12, 612-616.

Depre,C., Gaussin,V., Ponchaut,S., Fischer,Y., Vanoverschelde,J.L., and Hue,L. (1998). Inhibition of myocardial glucose uptake by cGMP. *Am J Physiol*274, H1443-H1449.

Deschepper,C.F., Boutin-Ganache,I., Zahabi,A., and Jiang,Z. (2002b). In search of cardiovascular candidate genes: interactions between phenotypes and genotypes. *Hypertension* 39, 332-336.

Deschepper,C.F., Masciotra,S., Zahabi,A., Boutin-Ganache,I., Picard,S., and Reudelhuber,T.L. (2001). Functional alterations of the Nppa promoter are linked to cardiac ventricular hypertrophy in WKY/WKHA rat crosses. *Circ. Res.* 88, 223-228.

Deschepper,C.F., Picard,S., Thibault,G., Touyz,R., and Rouleau,J.L. (2002a). Characterization of myocardium, isolated cardiomyocytes, and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 282, H149-H155.

Devereux,R.B., Casale,P.N., Hammond,I.W., Savage,D.D., Alderman,M.H., Campo,E., Alonso,D.R., and Laragh,J.H. (1987). Echocardiographic detection of pressure-overload left ventricular hypertrophy: effect of criteria and patient population. *J. Clin. Hypertens.* 3, 66-78.

Devereux,R.B., de Simone,G., Ganau,A., and Roman,M.J. (1994). Left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in hypertension: stimuli, functional consequences and prognostic implications. *J. Hypertens. Suppl* 12, S117-S127.

Douglas,P.S., Katz,S.E., Weinberg,E.O., Chen,M.H., Bishop,S.P., and Lorell,B.H. (1998). Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* 32, 1118-1125.

Durocher,D., Chen,C.Y., Ardati,A., Schwartz,R.J., and Nemer,M. (1996). The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol. Cell Biol.* 16, 4648-4655.

Dutil,J. and Deng,A.Y. (2001a). Further chromosomal mapping of a blood pressure QTL in Dahl rats on chromosome 2 using congenic strains. *Physiol Genomics* 6, 3-9.

Dutil,J. and Deng,A.Y. (2001b). Mapping a blood pressure quantitative trait locus to a 5.7-cM region in Dahl salt-sensitive rats. *Mamm. Genome* 12, 362-365.

Eu,J.P., Xu,L., Stamler,J.S., and Meissner,G. (1999). Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species. *Biochem. Pharmacol.* 57, 1079-1084.

Farhat,M.Y., Lavigne,M.C., and Ramwell,P.W. (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 10, 615-624.

Farivar,R.S., Crawford,D.C., Chobanian,A.V., and Brecher,P. (1995). Effect of angiotensin II blockade on the fibroproliferative response to phenylephrine in the rat heart. *Hypertension* 25, 809-813.

Flint,J., Mott,R. (2001). Finding the molecular basis of quantitative traits : success and pitfalls. *Nature Rev. Genet.* 2, 437-445.

Foster,K.A., Hock,C.E., and Reibel,D.K. (1991). Altered responsiveness of hypertrophied rat hearts to a. *J Mol. Cell Cardiol.* 23, 91-101.

Frantz,S., Clemitson,J.R., Bihoreau,M.T., Gauguier,D., and Samani,N.J. (2001). Genetic dissection of region around the Sa gene on rat chromosome 1: evidence for multiple loci affecting blood pressure. *Hypertension* 38, 216-221.

Frantz,S.A., Kaiser,M., Gardiner,S.M., Gauguier,D., Vincent,M., Thompson,J.R., Bennett,T., and Samani,N.J. (1998). Successful isolation of a rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus in reciprocal congenic strains. *Hypertension* 32, 639-646.

Frary,A., Nesbitt,T.C., Grandillo,S., Knaap,E., Cong,B., Liu,J., Meller,J., Elber,R., Alpert,K.B., and Tanksley,S.D. (2000). fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289, 85-88.

Frohlich,E.D. (1991). Is reversal of left ventricular hypertrophy in hypertension beneficial? *Hypertension* 18, 1133-1138.

Fuller,F., Porter,J.G., Arfsten,A.E., Miller,J., Schilling,J.W., Scarborough,R.M., Lewicki,J.A., and Schenk,D.B. (1988). Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol. Chem.* 263, 9395-9401.

Garavaglia,G.E., Messerli,F.H., Schmieder,R.E., Nunez,B.D., and Oren,S. (1989). Sex differences in cardiac adaptation to essential hypertension. *Eur. Heart J.* 10, 1110-1114.

Garbers,D.L. (1991), Guanylyl cyclase-linked receptors. *Pharmac. Ther.* 50, 337-345.

Gardin,J.M., Wagenknecht,L.E., Anton-Culver,H., Flack,J., Gidding,S., Kurosaki,T., Wong,N.D., and Manolio,T.A. (1995). Relationship of cardiovascular risk factors to echocardiographic left ventricular mass in healthy young black and white adult men and women. The CARDIA study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Circulation* 92, 380-387.

Garner,C., Lecomte,E., Visvikis,S., Abergel,E., Lathrop,M., and Soubrier,F. (2000). Genetic and environmental influences on left ventricular mass. A family study. *Hypertension* 36, 740-746.

Garrett,M.R., Dene,H., Walder,R., Zhang,Q.Y., Cicila,G.T., Assadnia,S., Deng,A.Y., and Rapp,J.P. (1998). Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res.* 8, 711-723.

Garrett,M.R., Zhang,X., Dukhanina,O.I., Deng,A.Y., and Rapp,J.P. (2001). Two linked blood pressure quantitative trait loci on chromosome 10 defined by dahl rat congenic strains. *Hypertension* 38, 779-785.

Gerdes,A.M., Capasso,J.M. (1995). Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in hearth failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 849-856.

Gerdes,A.M., Kellerman,S.E., Malec,K.B., and Schocken,D.D. (1994). Transverse shape characteristics of cardiac myocytes from rats and humans. *Cardioscience* 5, 31-36.

Gerdes,A.M., Kriseman,J., and Bishop,S.P. (1983). Changes in myocardial cell size and number during the development and reversal of hyperthyroidism in neonatal rats. *Lab Invest* 48, 598-602.

Gigante,B., Rubattu,S., Zee,R.Y., Volpe,M., and Lindpaintner,K. (2001). Non-random chromosomal distribution of SSLPs: systematic assessment using a novel genetic linkage map between two closely related rat strains. *Cytogenet. Cell Genet.* 95, 64-72.

Greaves,S.C., Roche,A.H., Neutze,J.M., Whitlock,R.M., and Veale,A.M. (1987). Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy: a cross sectional and M mode echocardiographic study of 50 families. *Br. Heart J* 58, 259-266.

Green,EL (1966). *Biology of the laboratory mouse*. New York: MacGraw-Hill Book Company.

Grodstein,F., Stampfer,M.J., Manson,J.E., Colditz,G.A., Willett,W.C., Rosner,B., Speizer,F.E., and Hennekens,C.H. (1996). Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 335, 453-461.

Grohe,C., Kahlert,S., Lobbert,K., Stimpel,M., Karas,R.H., Vetter,H., and Neyses,L. (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* 416, 107-112.

Grossman,W., Jones,D., and McLaurin,L.P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin. Invest* 56, 56-64.

Gu,L., Dene,H., Deng,A.Y., Hoebee,B., Bihoreau,M.T., James,M., and Rapp,J.P. (1996). Genetic mapping of two blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 1. *J. Clin. Invest* 97, 777-788.

Gutkowska,J., Genest,J., Thibault,G., Garcia,R., Larochelle,P., Cusson,J.R., Kichel,O., Hamet,P., De Lean,A., and Cantin,M. (1987). Circulating forms and radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 16, 183-198.

Guttridge,D.C., Mayo,M.W., Madrid,L.V., Wang,C.Y., and Baldwin,A.S., Jr. (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 289, 2363-2366.

Hamet,P., Richard,L., Dam,T.V., Teiger,E., Orlov,S.N., Gaboury,L., Gossard,F., and Tremblay,J. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26, 642-648.

Harris,E.L., Dene,H., and Rapp,J.P. (1993). SA gene and blood pressure cosegregation using Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 6, 330-334.

Harshfield,G.A., Grim,C.E., Hwang,C., Savage,D.D., and Anderson,S.J. (1990). Genetic and environmental influences on echocardiographically determined left ventricular mass in black twins . *Am. J. Hypertens.* 3, 538-543.

Hasenfuss,G. (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 39, 60-76.

Hassan,A., Ali,N., Dong,Y., Carter,N.D., and Markus,H.S. (2001). Atrial natriuretic peptide gene G664A polymorphism and the risk of ischemic cerebrovascular disease. *Neurology* 57, 1726-1728.

Hohenegger,M. and Suko,J. (1993). Phosphorylation of the purified cardiac ryanodine receptor by exogenous and endogenous protein kinases. *Biochem. J* 296 ( Pt 2), 303-308.

Horio,T., Nishikimi,T., Yoshihara,F., Matsuo,H., Takishita,S., and Kangawa,K. (2000). Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 35, 19-24.

Hubner,N., Lee,Y.A., Lindpaintner,K., Ganten,D., and Kreutz,R. (1999). Congenic substitution mapping excludes Sa as a candidate gene locus for a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1. *Hypertension* 34, 643-648.

Imamura,S., Matsuoka,R., Hiratsuka,E., Kimura,M., Nakanishi,T., Nishikawa,T., Furutani,Y., and Takao,A. (1991). Adaptational changes of MHC gene expression and isozyme transition in cardiac overloading. *Am J Physiol* 260, H73-H79.

Innes,B.A., McLaughlin,M.G., Kapuscinski,M.K., Jacob,H.J., and Harrap,S.B. (1998). Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* 31, 741-746.

Ito,N., Nitta,Y., Ohtani,H., Ooshima,A., and Isoyama,S. (1994). Remodelling of microvessels by coronary hypertension or cardiac hypertrophy in rats. *J Mol. Cell Cardiol.* 26, 49-59.

Iwai,N. and Inagami,T. (1991). Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension* 17, 161-169.

Iwai,N., Kurtz,T.W., and Inagami,T. (1992). Further evidence of the SA gene as a candidate gene contributing to the hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 64-69.

Iwai,N., Tsujita,Y., and Kinoshita,M. (1998). Isolation of a chromosome 1 region that contributes to high blood pressure and salt sensitivity. *Hypertension* 32, 636-638.

Izumo,S., Nadal-Ginard,B., and Mahdavi,V. (1988). Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 339-343.

Jahn,H., Nastainczyk,W., Rohrkasten,A., Schneider,T., and Hofmann,F. (1988). Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by. *Eur. J Biochem.* 178, 535-542.

Jefferis, B., Negrin, C.D., Graham, D., Clark, J.S., Anderson, N.H., Gauguier, D., and Dominiczak, A.F. (2000). Applicability of a "speed" congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 2. *Hypertension* 35, 179-187.

John, S.W., Krege, J.H., Oliver, P.M., Hagaman, J.R., Hodgins, J.B., Pang, S.C., Flynn, T.G., and Smithies, O. (1995). Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 267, 679-681.

Jovanovic, S., Jovanovic, A., Shen, W.K., and Terzic, A. (2000). Low concentrations of 17beta-estradiol protect single cardiac cells against metabolic stress-induced Ca<sup>2+</sup> loading. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 948-952.

Karp, C.L., Grupe, A., Schadt, E., Ewart, S.L., Keane-Moore, M., Cuomo, P.J., Kohl, J., Wahl, L., Kuperman, D., Germer, S., Aud, D., Peltz, G., Wills-Karp, M. (2000). Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nature Immunol.* 1, 221-226.

Kim, S., Ohta, K., Hamaguchi, A., Yukimura, T., Miura, K., and Iwao, H. (1995). Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension* 25, 1252-1259.

Kimura, A., Harada, H., Park, J.E., Nishi, H., Satoh, M., Takahashi, M., Hiroi, S., Sasaoka, T., Ohbuchi, N., Nakamura, T., Koyanagi, T., Hwang, T.H., Choo, J.A., Chung, K.S., Hasegawa, A., Nagai, R., Okazaki, O., Nakamura, H., Matsuzaki, M., Sakamoto, T., Toshima, H., Koga, Y., Imaizumi, T., and Sasazuki, T. (1997). Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* 16, 379-382.

Kirstein, M., Rivet-Bastide, M., Hatem, S., Benardeau, A., Mercadier, J.J., and Fischmeister, R. (1995). Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin. Invest* 95, 794-802.

Kishimoto, I., Rossi, K., and Garbers, D.L. (2001). A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2703-2706.

Kloting,I., Kovacs,P., and van den,B.J. (2001). Quantitative trait loci for body weight, blood pressure, blood glucose, and serum lipids: linkage analysis with wild rats (*Rattus norvegicus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 1126-1133.

Knowles,J.W., Esposito,G., Mao,L., Hagaman,J.R., Fox,J.E., Smithies,O., Rockman,H.A., and Maeda,N. (2001). Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin. Invest* 107, 975-984.

Kren,V., Simakova,M., Musilova,A., Zidek,V., and Pravenec,M. (2000). SHR.BN-congenic strains for genetic analysis of multifactorially determined traits. *Folia Biol. (Praha)* 46, 25-29.

Kreutz,R., Stock,P., Struk,B., and Lindpaintner,K. (1996). The Y chromosome. Epistatic and ecogenetic interactions in genetic hypertension. *Hypertension* 28, 895-897.

Kuno,T., Andresen,J.W., Kamisaki,Y., Waldman,S.A., Chang,L.Y., Saheki,S., Leitman,D.C., Nakane,M., and Murad,F. (1986). Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J Biol. Chem.* 261, 5817-5823.

Kwak,B.R. and Jongsma,H.J. (1996). Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol. Cell Biochem.* 157, 93-99.

Kwak,B.R., Saez,J.C., Wilders,R., Chanson,M., Fishman,G.I., Hertzberg,E.L., Spray,D.C. , and Jongsma,H.J. (1995). Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *Pflugers Arch.* 430, 770-778.

Lai,J., Jin,H., Yang,R., Winer,J., Li,W., Yen,R., King,K.L., Zeigler,F., Ko,A., Cheng,J., Bunting,S., and Paoni,N.F. (1996). Prostaglandin F2 alpha induces cardiac myocyte hypertrophy in vitro and cardiac growth in vivo. *Am. J. Physiol* 271, H2197-H2208.

Lander,E.S. and Botstein,D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121 , 185-199.

Lander,E.S., Green,P., Abrahamson,J., Barlow,A., Daly,M.J., Lincoln,S.E., and Newburg,L. (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.

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

Lattion,A.L., Michel,J.B., Arnaud,E., Corvol,P., and Soubrier,F. (1986). Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am J Physiol* 251, H890-H896.

Lauer,M.S., Anderson,K.M., Larson,M.G., and Levy,D. (1994). A new method for indexing left ventricular mass for differences in body size. *Am J Cardiol.* 74, 487-491.

Levy,D. (1988). Left ventricular hypertrophy. Epidemiological insights from the Framingham Heart Study. *Drugs* 35 *Suppl* 5, 1-5.

Levy,D., Garrison,R.J., Savage,D.D., Kannel,W.B., and Castelli,W.P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 322, 1561-1566.

Li,P., Zhang,X., Capasso,J.M., Meggs,L.G., Sonnenblick,E.H., and Anversa,P. (1993). Myocyte loss and left ventricular failure characterise the long term effects of coronary artery narrowing or renal hypertension in rats. *Cardiovasc. Res.* 27, 1066-1075.

Lim,S.C., Caballero,A.E., Arora,S., Smakowski,P., Bashoff,E.M., Brown,F.M., Logerfo,F.W. , Horton,E.S., and Veves,A. (1999). The effect of hormonal replacement therapy on the vascular reactivity and endothelial function of healthy individuals and individuals with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84, 4159-4164.

Lind,L., Andersson,P.E., Andren,B., Hanni,A., and Lithell,H.O. (1995). Left ventricular hypertrophy in hypertension is associated with the insulin resistance metabolic syndrome. *J Hypertens* 13, 433-438.

Lindpaintner,K., Hilbert,P., Ganten,D., Nadal-Ginard,B., Inagami,T., and Iwai,N. (1993). Molecular genetics of the SA-gene: cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. *J. Hypertens.* 11, 19-23.

Lohmann,S.M., Fischmeister,R., and Walter,U. (1991). Signal transduction by cGMP in heart. *Basic Res. Cardiol.* 86, 503-514.

Maack,T., Suzuki,M., Almeida,F.A., Nussenzveig,D., Scarborough,R.M., McEnroe,G.A., and Lewicki,J.A. (1987). Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238, 675-678.

Marcus,R., Krause,L., Weder,A.B., Dominguez-Meja,A., Schork,N.J., and Julius,S. (1994). Sex-specific determinants of increased left ventricular mass in the Tecumseh Blood Pressure Study. *Circulation* 90, 928-936.

Markel,P., Shu,P., Ebeling,C., Carlson,G.A., Nagle,D.L., Smutko,J.S., and Moore,K.J. (1997). Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat. Genet.* 17, 280-284.

Maron,B.J., Nichols,P.F., III, Pickle,L.W., Wesley,Y.E., and Mulvihill,J.J. (1984). Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol.* 53, 1087-1094.

Masciotra,S., Picard,S., and Deschepper,C.F. (1999). Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circ. Res.* 84, 1453-1458.

Mende,U., Eschenhagen,T., Geertz,B., Schmitz,W., Scholz,H., Schulte am,E.J., Sempell,R., and Steinfath,M. (1992). Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 345, 44-50.

Mercadier,J.J., Lompre,A.M., Wisnewsky,C., Samuel,J.L., Bercovici,J., Swynghedauw,B., and Schwartz,K. (1981). Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 49, 525-532.

Mery,P.F., Lohmann,S.M., Walter,U., and Fischmeister,R. (1991). Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 1197-1201.

Michel,J.B., Salzmann,J.L., Ossondo,N.M., Bruneval,P., Barres,D., and Camilleri,J.P. (1986). Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res. Cardiol.* 81, 142-154.

Mitchell,G.F., Pfeffer,J.M., and Pfeffer,M.A. (1997). The transition to failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 10, 120S-126S.

Modena,M.G., Molinari,R., Muia,N., Jr., Castelli,A., Pala,F., and Rossi,R. (1999b). Double-blind randomized placebo-controlled study of transdermal estrogen replacement therapy on hypertensive postmenopausal women. *Am. J. Hypertens.* 12, 1000-1008.

Modena,M.G., Muia,N., Jr., Aveta,P., Molinari,R., and Rossi,R. (1999a). Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension* 34, 1041-1046.

Mogensen,J., Klausen,I.C., Pedersen,A.K., Egeblad,H., Bross,P., Kruse,T.A., Gregersen,N., Hansen,P.S., Baandrup,U., and Borglum,A.D. (1999). Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin. Invest* 103, R39-R43.

Morganroth,J., Maron,B.J., Henry,W.L., and Epstein,S.E. (1975). Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann. Intern. Med.* 82, 521-524.

Moujahidine,M., Dutil,J., Hamet,P., and Deng,A.Y. (2002). Congenic mapping of a blood pressure QTL on Chromosome 16 of Dahl rats. *Mamm. Genome* 13, 153-156.

Nuedling,S., Kahlert,S., Loebbert,K., Doevendans,P.A., Meyer,R., Vetter,H., and Grohe,C. (1999). 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc. Res.* 43, 666-674.

Nuedling,S., Karas,R.H., Mendelsohn,M.E., Katzenellenbogen,J.A., Katzenellenbogen,B.S., Meyer,R., Vetter,H., and Grohe,C. (2001). Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett.* 502, 103-108.

Nunez,D.J., Clifford,C.P., al Mahdawi,S., and Dutka,D. (1996). Hypertensive cardiac hypertrophy--is genetic variance the missing link? *Br. J Clin. Pharmacol.* 42, 107-117.

Oetting,W.S., Lee,H.K., Flanders,D.J., Wiesner,G.L., Sellers,T.A., and King,R.A. (1995). Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30, 450-458.

Oliver,P.M., Fox,J.E., Kim,R., Rockman,H.A., Kim,H.S., Reddick,R.L., Pandey,K.N., Milgram,S.L., Smithies,O., and Maeda,N. (1997). Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 14730-14735.

Omura,T., Kim,S., Takeuchi,K., Iwao,H., and Takeda,T. (1994). Transforming growth factor beta 1 and extracellular matrix gene expression in isoprenaline induced cardiac hypertrophy: effects of inhibition of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc. Res.* 28, 1835-1842.

Orlov,S.N., Dutil,J., Hamet,P., and Deng,A.Y. (2001). Replacement of (alpha)1-Na-K-ATPase of Dahl rats by Milan rats lowers blood pressure but does not affect its activity. *Physiol Genomics* 7, 171-177.

Oscai,L.B., Mole,P.A., and Holloszy,J.O. (1971). Effects of exercise on cardiac weight and mitochondria in male and female rats. *Am. J. Physiol* 220, 1944-1948.

Patel,H.R., Thiara,A.S., West,K.P., Lodwick,D., and Samani,N.J. (1994). Increased expression of the SA gene in the kidney of the spontaneously hypertensive rat is localized to the proximal tubule. *J. Hypertens.* 12, 1347-1352.

Poch,E., Gonzalez,D., Gomez-Angelats,E., Enjuto,M., Pare,J.C., Rivera,F., and de La,S.A. (2000). G-Protein beta(3) subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension* 35, 214-218.

Post,W.S., Larson,M.G., Myers,R.H., Galderisi,M., and Levy,D. (1997). Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 30, 1025-1028.

Potter,L.R. and Hunter,T. (2001). Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol. Chem.* 276, 6057-6060.

Pravenec,M., Gauguier,D., Schott,J.J., Buard,J., Kren,V., Bila,V., Szpirer,C., Szpirer,J., Wang,J.M., Huang,H., and . (1995). Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J. Clin. Invest* 96, 1973-1978.

Pravenec,M., Krenova,D., Kren,V., Zidek,V., Simakova,M., Musilova,A., Bottger,A., van Zutphen,B.F., St Lezin,E., and Kurtz,T.W. (1999). Congenic strains for genetic analysis of hypertension and dyslipidemia in the spontaneously hypertensive rat. *Transplant. Proc.* 31, 1555-1556.

Pravenec,M., Landa,V., Zidek,V., Musilova,A., Kren,V., Kazdova,L., Aitman,T.J., Glazier,A.M., Ibrahimi,A., Abumrad,N.A., Qi,N., Wang,J.M., St Lezin,E.M., and Kurtz,T.W. (2001a). Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat. Genet.* 27, 156-158.

Pravenec,M., Zidek,V., Landa,V., Kostka,V., Musilova,A., Kazdova,L., Fucikova,A., Krenova,D., Bila,V., and Kren,V. (2000). Genetic analysis of cardiovascular risk factor clustering in spontaneous hypertension. *Folia Biol. (Praha)* 46, 233-240.

Pravenec,M., Zidek,V., Musilova,A., Vorlicek,J., Kren,V., St Lezin,E., and Kurtz,T.W. (2001b). Genetic isolation of a blood pressure quantitative trait locus on chromosome 2 in the spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.* 19, 1061-1064.

Rapp,J. (1998). The Sa gene: what does it mean? *Hypertension* 32, 647-648.

Rapp,J.P. (1991). Dissecting the primary causes of genetic hypertension in rats. *Hypertension* 18, 118-128.

Rapp,J.P. (2000). Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev.* 80, 135-172.

Rapp,J.P. and Deng,A.Y. (1995). Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? Identifying the genes for genetic hypertension. *Hypertension* 25, 1121-1128.

Rapp,J.P., Garrett,M.R., Dene,H., Meng,H., Hoebee,B. , and Lathrop,G.M. (1998). Linkage analysis and construction of a congenic strain for a blood pressure QTL on rat chromosome 9. *Genomics* 51, 191-196.

Reis,S.E. (1994). Oestrogens attenuate abnormal coronary vasoreactivity in postmenopausal women. *Ann. Med.* 26, 387-388.

Risch,N. and Merikangas,K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516-1517.

Rosenbaum,J.S., Billingham,M.E., Ginsburg,R., Tsujimoto,G., Lurie,K.G., and Hoffman,B.B. (1988). Cardiomyopathy in a rat model of pheochromocytoma. Morphological and functional alterations. *Am J Cardiovasc. Pathol.* 1, 389-399.

Rubattu,S., Lee-Kirsch,M.A., DePaolis,P., Giliberti,R., Gigante,B., Lombardi,A., Volpe,M., and Lindpaintner,K. (1999). Altered structure, regulation, and function of the gene encoding the atrial natriuretic peptide in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Circ. Res.* 85, 900-905.

Saad,Y., Garrett,M.R., Lee,S.J., Dene,H., and Rapp,J.P. (1999). Localization of a blood pressure QTL on rat chromosome 1 using Dahl rat congenic strains. *Physiol Genomics* 1, 119-125.

Saad,Y., Garrett,M.R., and Rapp,J.P. (2001). Multiple blood pressure QTL on rat chromosome 1 defined by Dahl rat congenic strains. *Physiol Genomics* 4, 201-214.

Sahai,A., Weiser,S.J., and Ganguly,P.K. (1993). Renal  $Ca^{2+}$  +  $Mg^{2+}$  ATPase in congestive heart failure due to diabetes. *Angiology* 44, 769-775.

Samani,N.J., Lodwick,D., Vincent,M., Dubay,C., Kaiser,M.A., Kelly,M.P., Lo,M., Harris,J., Sassard,J., Lathrop,M., and . (1993). A gene differentially expressed in the kidney of the spontaneously hypertensive rat cosegregates with increased blood pressure. *J. Clin. Invest* 92, 1099-1103.

- Sarsero,D. and Molenaar,P. (1995). Effects of chronic infusion of (-)-isoprenaline on rat cardiac muscarinic (M2)-cholinoceptors and be. *J Auton. Pharmacol.* 15, 239-255.
- Satoh,M., Takahashi,M., Sakamoto,T., Hiroe,M., Marumo,F., and Kimura,A. (1999). Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 411-417.
- Schenk,D.B., Phelps,M.N., Porter,J.G., Fuller,F., Cordell,B., and Lewicki,J.A. (1987). Purification and subunit composition of atrial natriuretic peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 1521-1525.
- Scheuer,J. and Tipton,C.M. (1977). Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu. Rev. Physiol* 39, 221-251.
- Schork,N.J. (1997). Genetics of complex disease: approaches, problems, and solutions. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 156, S103-S109 .
- Schwartz,K. (1995). Familial hypertrophic cardiomyopathy. Nonsense versus missense mutations. *Circulation* 91, 2865-2867.
- Schwartz,K., de la,B.D., Bouveret,P., Oliviero,P., Alonso,S., and Buckingham,M. (1986). Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ. Res.* 59, 551-555.
- Schwartzbauer,G. and Robbins,J. (2001). Matters of sex: sex matters. *Circulation* 104, 1333-1335.
- Sebkhia,A., Zhao,L., Lu,L., Haley,C.S., Nunez,D.J., and Wilkins,M.R. (1999). Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats: results from an F344xWKY cross. *Hypertension* 33, 949-953.
- Seidman,C.E. and Seidman,J.G. (1991). Mutations in cardiac myosin heavy chain genes cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol. Biol. Med.* 8, 159-166.
- Shah,A.M., Spurgeon,H.A., Sollott,S.J., Talo,A., and Lakatta,E.G. (1994). 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.* 74, 970-978.

Shimonaka,M., Saheki,T., Hagiwara,H., Ishido,M., Nogi,A., Fujita,T., Wakita,K., Inada,Y., Kondo,J., and Hirose,S. (1987). Purification of atrial natriuretic peptide receptor from bovine lung. Evidence for a disulfide-linked subunit structure. *J Biol. Chem.* 262, 5510-5514.

Silberbach,M., Gorenc,T., Hershberger,R.E., Stork,P.J., Steyger,P.S., and Roberts,C.T., Jr. (1999). Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol. Chem.* 274, 24858-24864.

Silberbach,M. and Roberts,C.T., Jr. (2001). Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal.* 13, 221-231.

Silver,LM (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications.*

Steen,R.G., Kwitek-Black,A.E., Glenn,C., Gullings-Handley,J., Van Etten,W., Atkinson,O.S., Appel,D., Twigger,S., Muir,M., Mull,T., Granados,M., Kissebah,M., Russo,K., Crane,R., Popp,M., Peden,M., Matise,T., Brown,D.M., Lu,J., Kingsmore,S., Tonellato,P.J., Rozen,S., Slonim,D., Young,P., Jacob,H.J., et al. (1999). A high-density integrated genetic linkage and radiation hybrid map of the laboratory rat. *Genome Res.* 9, AP1-8.

St Lezin,E., Liu,W., Wang,J.M., Wang,N., Kren,V., Krenova,D., Musilova,A., Zdobinska,M., Zidek,V., Lau,D., and Pravenec,M. (1997). Genetic isolation of a chromosome 1 region affecting blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 30, 854-859.

St Lezin,E., Zhang,L., Yang,Y., Wang,J.M., Wang,N., Qi,N., Steadman,J.S., Liu,W., Kren,V., Zidek,V., Krenova,D., Churchill,P.C., Churchill,M.C., and Pravenec,M. (1999). Effect of chromosome 19 transfer on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 33, 256-260.

Stampfer,M.J. and Colditz,G.A. (1991). Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 20, 47-63.

Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Manson, J.E., Rosner, B., Speizer, F.E., and Hennekens, C.H. (1991). Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N. Engl. J. Med.* 325, 756-762.

Steffens, D.L., Sutter, S.L., and Roemer, S.C. (1993). An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. *Biotechniques* 15, 580, 582.

Susic, D., Nunez, E., Frohlich, E.D., and Prakash, O. (1996). Angiotensin II increases left ventricular mass without affecting myosin isoform mRNAs. *Hypertension* 28, 265-268.

Suzuki, T., Yamazaki, T., and Yazaki, Y. (2001). The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 51, 489-494.

Takasago, T., Imagawa, T., Furukawa, K., Ogurusu, T., and Shigekawa, M. (1991). Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biochem. (Tokyo)* 109, 163-170.

Tamura, T., Said, S., and Gerdes, A.M. (1999). Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension* 33, 676-680.

Teerlink, J.R., Pfeffer, J.M., and Pfeffer, M.A. (1994). Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ. Res.* 75, 105-113.

Teiger, E., Than, V.D., Richard, L., Wisniewsky, C., Tea, B.S., Gaboury, L., Tremblay, J., Schwartz, K., and Hamet, P. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin. Invest* 97, 2891-2897.

Terracio, L., Borg, T.K. (1988). Factors affecting cardiac cell shape. *Hearth Failure* 4, 114-124.

Thibault, G., Amiri, F., and Garcia, R. (1999). Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart. *Annu. Rev. Physiol* 61, 193-217.

Thierfelder,L., Watkins,H., MacRae,C., Lamas,R., McKenna,W., Vosberg,H.P., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. (1994). Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77, 701-712.

Toffolo,R.L. and Ianuzzo,C.D. (1994). Myofibrillar adaptations during cardiac hypertrophy. *Mol. Cell Biochem.* 131, 141-149.

Tsujita,Y., Iwai,N., Tamaki,S., Nakamura,Y., Nishimura,M., and Kinoshita,M. (2000). Genetic mapping of quantitative trait loci influencing left ventricular mass in rats . *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H2062-H2067.

van Eickels,M., Grohe,C., Cleutjens,J.P., Janssen,B.J., Wellens,H.J., and Doevendans,P.A. (2001). 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 104, 1419-1423.

Vane,J.R. and Botting,R.M. (1993). Formation by the endothelium of prostacyclin, nitric oxide and endothelin. *J. Lipid Mediat.* 6, 395-404.

Verhaaren,H.A., Schieken,R.M., Mosteller,M., Hewitt,J.K., Eaves,L.J., and Nance,W.E. (1991). Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am J Cardiol.* 68, 661-668.

Vidal,S.M., Epstein,D.J., Malo,D., Weith,A., Vekemans,M., and Gros,P. (1992). Identification and mapping of six microdissected genomic DNA probes to the proximal region of mouse chromosome 1. *Genomics* 14, 32-37.

Vidal,S.M., Malo,D., Vogan,K., Skamene,E., and Gros,P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73, 469-485.

Vidal,S.M., Pinner,E., Lepage,P., Gauthier,S., and Gros,P. (1996). Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J. Immunol.* 157, 3559-3568.

Vikstrom,K.L. and Leinwand,L.A. (1996). Contractile protein mutations and heart disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 97-105.

Villarreal,F.J. and Dillmann,W.H. (1992). Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 262, H1861-H1866.

Vriz,O., Lu,H., Visentin,P., Nicolosi,L., Mos,L., and Palatini,P. (1997). Gender differences in the relationship between left ventricular size and ambulatory blood pressure in borderline hypertension. The HARVEST Study. *Eur. Heart J.* 18, 664-670.

Wahler,G.M. and Dollinger,S.J. (1995). Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 268, C45-C54.

Wakeland,E., Morel,L., Achey,K., Yui,M., and Longmate,J. (1997). Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol. Today* 18, 472-477.

Weeks,D.E. and Lathrop,G.M. (1995). Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends Genet.* 11, 513-519.

Weinberg,E.O., Thienelt,C.D., Katz,S.E., Bartunek,J., Tajima,M., Rohrbach,S., Douglas,P.S., and Lorell,B.H. (1999). Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34, 264-273.

Willmott,N.J., Wong,K., and Strong,A.J. (2000). A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca(2+) waves in glia. *J Neurosci.* 20, 1767-1779.

Wrenn,R.W. and Kuo,J.F. (1981). Cyclic GMP-dependent phosphorylation of an endogenous protein from rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1274-1280.

Yagil,C., Sapojnikov,M., Kreutz,R., Katni,G., Lindpaintner,K., Ganten,D., and Yagil,Y. (1998). Salt susceptibility maps to chromosomes 1 and 17 with sex specificity in the Sabra rat model of hypertension. *Hypertension* 31, 119-124.

Yagil,C., Sapojnikov,M., Kreutz,R., Zurcher,H., Ganten,D., and Yagil,Y. (1999). Role of chromosome X in the Sabra rat model of salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 33, 261-265.

Yan,W., Wu,F., Morser,J., and Wu,Q. (2000). Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8525-8529.

Yang,T., Hassan,S.A., Singh,I., Smart,A., Brosius,F.C., Holzman,L.B., Schnermann,J.B. , and Briggs,J.P. (1996). SA gene expression in the proximal tubule of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 27, 541-551.

Yi,N. and Xu,S. (2002). Mapping quantitative trait loci with epistatic effects. *Genet. Res.* 79, 185-198.

Zierhut,W., Zimmer,H.G., and Gerdes,A.M. (1991). Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Circ. Res.* 69, 609-617.