

Université de Montréal

**Le syndrome métabolique chez les congéniques du rat
Dahl: influence de la diète et rôle du récepteur de l'ANP**

par

Valérie Fillion-Forté

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences

en Sciences biomédicales

Option générale

Mars, 2010

© Valérie Fillion-Forté, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Le syndrome métabolique chez les congéniques du rat Dahl: influence de la diète et rôle du récepteur de l'ANP

présenté par :

Valérie Fillion-Forté

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Ashok Srivastava, président-rapporteur

Dre Johanne Tremblay, directrice de recherche

Jolanta Gutkowska, membre du jury

Résumé

L'hypertension artérielle et l'obésité sont deux composantes conjointement reliées du syndrome métabolique. Les récepteurs de l'ANP (GCA) et de l'oxyde nitrique (GCs) ont des propriétés diurétiques, natriurétiques, vasodilatatrices et sont liés au contrôle de la pression. Des études récentes ont démontré leur implication dans l'obésité. **Hypothèse** : Une différence génétique au niveau du gène GCA pourrait contribuer à des différences physiologiques. La composante lipidique et/ou sodique de la diète pourrait influencer la fonction rénale, cardiaque et les valeurs anthropométriques différemment chez les souches congéniques. **Objectifs** : (1) Déterminer l'effet de la composante lipidique et sodique des diètes; (2) Évaluer l'influence de GCA sur la réponse physiologique des souches congéniques; (3) Expliquer les mécanismes physiologiques procurant une réduction de la pression artérielle chez la souche SM9. **Méthodologie** : Des modèles congéniques du rat Dahl (DSS) hypertendu, nourri avec une diète riche en gras (HF) ou normale (NF), ont été utilisés pour démontrer l'impact d'un segment chromosomique d'origine normotendue. **Résultats** : La souche SM9 a une prise de poids plus importante que SM12 et DSS sur diète HF malgré un apport alimentaire équivalent. La souche SM9 présente également un ratio masse adipeuse/masse maigre plus élevé que SM12 et DSS. Nous n'avons observé aucune augmentation de la pression artérielle en réponse à la diète HF pour les 3 souches malgré une augmentation du dommage rénal pour les 3 souches. Le dommage rénal est plus important chez DSS que pour les 2 congéniques. La réponse diurétique à l'ANP est plus élevée chez SM9 et est influencée par le contenu en sel dans la diète. La perte glomérulaire plus importante chez le rat DSS semble compensée par une augmentation de la réponse à l'ANP par les glomérules résiduels. Il y a une corrélation entre l'activité de GCA en réponse à l'ANP, les niveaux d'ARNm et le nombre de répétition du dinucléotide TA dans son promoteur. Le rat DSS présente une hypertrophie cardiaque plus importante que les deux souches congéniques et ceci n'est pas modifié par la diète HF. **Conclusion** : Nos études ont permis de mettre en évidence un effet génétique impliquant le segment chromosomique normotendu contenant GCA dans la réponse à une diète HF chez le rat DSS.

Mots-clés : Hypertension artérielle, récepteur du peptide auriculaire natriurétique, obésité, syndrome métabolique, guanylyl cyclase soluble, sensibilité au sel, oxyde nitrique

Abstract

Hypertension and obesity are two related components of the metabolic syndrome. The ANP receptor (GCA) and nitric oxide receptor (sGC) have diuretic, natriuretic, vasodilatory properties, and are linked to blood pressure control. Furthermore a recent study has demonstrated the implication of GCA and sGC in the development of obesity.

Hypothesis: A genetic difference in GCA gene could contribute to physiological differences. The differential lipid and/or sodium composition of the diet could influence the renal, cardiac and anthropometric values. **Objectives:** (1) To determine the effect of fat and sodium on the physiological parameters; (2) To evaluate the influence of GCA on the physiological response of the congenic rat; (3) To explain the mechanisms of the blood pressure reduction in SM9 rats. **Methodology:** Congenic model of DSS rat, fed with either high fat (HF) or normal (NF) diet, were used to demonstrate the impact of a chromosome segment from normotensive origin on physiological functions. C2SM9 contains GCA and sGC from normotensive origin while C2SM12 harbours only sGC from normotensive origin. **Results:** HF diet had negative feature on body composition, renal damage, creatinine clearance and inhibited the diuretic/natriuretic effect of ANP. The normotensive segment including GCA and sGC has reduced the blood pressure, improve the renal damage and increased the diuretic/natriuretic capacity of SM9 in response to ANP injection when compared to SM12 and DSS. GCA mRNA and the clearance receptor ratio were reduced in SM9 in the renal cortex and retroperitoneal fat. SM12 and SM9, containing the chromosomal segment that includes sGC, improve their lipid profile compared with DSS. **Conclusion:** Our results suggested a compensatory increase in the GCA levels for SM12 and DSS that is insufficient to improve their pathophysiological status as observed in SM9. HF diet increases the metabolic syndrome in those rats.

Keywords : Hypertension, natriuretic peptide receptor, obesity, metabolic syndrome, soluble guanylyl cyclase, salt sensitivity, nitric oxide

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Abréviations et sigles	xii
Remerciements	xvii
1. Introduction	1
1.1 Notions fondamentales.....	1
1.1.1 L'hypertension et le syndrome métabolique... un problème d'actualité.....	1
1.1.2 Le rein est un organe clef pour le contrôle de la pression artérielle	3
1.1.3 Contrôle endocrinien de la pression artérielle.....	3
1.1.4 La sensibilité au sel n'est pas à prendre avec un grain de sel	6
1.2 Dissection génétique de la physiopathologie de l'hypertension	7
1.2.1 Stratégie d'identification des gènes candidats	7
1.2.2 La génétique de l'hypertension	9
1.2.3 Lien génétique entre l'hypertension, l'obésité et le syndrome métabolique.....	11
1.3 Influence de l'environnement sur le développement de l'hypertension et du syndrome métabolique.....	14
1.3.1 Effet d'une diète riche en gras	17
1.3.1.1 Les acides gras et le cholestérol.....	18
1.3.1.2 L'huile d'olive et la diète méditerranéenne	19
1.3.1.3 Le rôle du tissu adipeux	20
1.3.2 Effet du sel	21
1.4 Modèles principaux de l'hypertension artérielle et du syndrome métabolique	22
1.4.1 Le rat spontanément hypertendu (SHR).....	23
1.4.2 Le rat Dahl sensible au sel (DSS, S)	24
1.4.3 Les souches congéniques du chromosome 2.....	25
1.5 Gènes candidats inclus dans le segment chromosomique.....	27
1.5.1 Le récepteur du peptide auriculaire natriurétique (GCA/Npr1/NprA).....	28

1.5.1.1	Importance physiologique de GCA.....	28
1.5.1.2	Effet sur régulation de la pression sanguine et de la volémie	29
1.5.1.3	Effet sur la diurèse et la natriurèse.....	30
1.5.1.4	Effet sur la vasodilatation.....	30
1.5.1.5	Effet sur l’hypertrophie cardiaque et la fibrose.....	31
1.5.1.2	Mécanisme de régulation de GCA	32
1.5.1.2.1	Régulation de l’expression génique de GCA	32
1.5.1.2.2	Régulation au niveau protéique de GCA	33
1.5.1.2.3	Activation de GCA.....	35
1.5.1.2.4	Inhibition de GCA.....	36
1.5.1.2.5	Internalisation et dégradation de GCA.....	37
1.5.1.2.6	Les ligands de GCA	37
1.5.2	Le récepteur GCs.....	38
1.5.2.1	Importance physiologique du système de l’oxyde nitrique	38
1.5.2.2	Stress oxydatif et oxyde nitrique.....	39
1.5.3	Le polypeptide gamma du fibrinogène (fgg)	40
1.5.3.1	Implication de fgg dans les maladies cardiovasculaires	40
1.6	Hypothèses et objectifs de recherche.....	41
2.	Matériel et méthode	43
2.1	Animaux et protocoles expérimentaux.....	43
2.1.1	Protocole Télémétrie	44
2.1.2	Protocole Cages métaboliques	45
2.1.2.1	Composition corporelle.....	45
2.1.2.2	Réponse à l’effet natriurétique et diurétique de l’ANP.....	45
2.1.2.3	Dosages biochimiques des fluides	45
2.1.2.3.1	Cages métaboliques 24 heures	45
2.1.2.3.2	Clairance de la créatinine	46
2.1.2.4	Sacrifice	46
2.1.2.5	Histologie	47
2.1.2.5.1	Histologie du rein.....	47
2.1.2.5.2	Histologie du cœur	47
2.1.2.6	Stimulation des glomérules avec l’ANP	48

2.2 Analyses génétiques.....	49
2.2.1 Extraction d'ARN et RT-PCR en temps réel	49
2.2.2 Séquençage.....	50
2.3 Analyses <i>in silico</i>.....	51
2.3.1 Analyses des gènes dans le segment chromosomique	51
2.3.2 Analyses statistiques	52
3. Résultats et discussion	53
3.1 Paramètres anthropométriques et lipidiques	54
3.1.1 Apport alimentaire et masse corporelle.....	54
3.1.2 Bilan lipidique.....	59
3.1.3 Poids des organes	64
3.2 Pression moyenne	67
3.3 Fonction rénale.....	71
3.3.1 Analyse des fluides corporels	71
3.1.3 Eau libre	76
3.3.2 Analyse histopathologique du rein.....	77
3.3.3 Réponses diurétique et natriurétique à l'ANP.....	80
3.3.4 Stimulation de la guanylate cyclase par l'ANP dans les glomérules	84
3.3.5 Expression de l'ARNm par PCR en temps réel	87
3.3.5.1 Expression de GCA et du récepteur de clairance NprC	87
3.3.5.2 Expression de l'ANP dans les oreillettes et les ventricules	90
3.4 Fonction cardiaque	92
3.4.1 Marqueurs de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose.....	92
3.4.2 Morphométrie comparée du cœur	97
3.4.3 Fibrose.....	102
3.5 Analyses <i>in silico</i>.....	104
3.5.1 Diagramme de Venn	104
3.5.1.1 Différence entre SM9 et SM12 par rapport à DSS	105
3.5.1.1.1 Le récepteur de l'ANP, GCA comme candidat principal	105
3.5.1.1.2 Canal d'hyperpolarisation activé par les nucléotides cycliques.....	106
3.5.1.1.3 Les facteurs de transcription MEF2B et MEF2D	108
3.5.1.1.4 Le récepteur associé au récepteur de l'insuline, InsR	108

3.5.1.1.5 La protéine liant l'apolipoprotéine A-I, APOAIBP	109
3.5.1.1.6 Le récepteur α de l'interleukine 6, IL6ra	109
3.5.1.2 Similarités entre SM9 et SM12 par rapport à DSS	110
3.5.1.2.1 Les sous-unités de GCs: <i>gucy1b3</i> et <i>gucy1a3</i>	110
3.5.1.2.2 Les chaînes <i>fgg/fga/fgb</i> du fibrinogène.....	111
3.5.1.2.3 Récepteur Dear double AngII/ET-1	112
4. Conclusion	112
4.1 Effet de la diète	112
4.2 Effet de la souche	115
4.3 Perspectives	119
Bibliographie	131
ANNEXE : Article en préparation	xviii

Liste des tableaux

Tableau 1 Principaux gènes candidats de l'hypertension essentielle regroupés selon 5 classes de fonctions physiologiques	11
Tableau 2 : Principaux gènes candidats du syndrome métabolique regroupés selon 4 classes de fonctions physiologiques.....	14
Tableau 3 : Information nutritionnelle détaillée des diètes (HFNS, HFLS, NFLS, NFNS) utilisées dans le protocole expérimental	44
Tableau 4 : Séquences, température d'hybridation (T _m) optimale, localisation et référence (accession ou référence #PMID) pour les amorces utilisées pour déterminer l'expression des gènes.....	50
Tableau 5 : Séquences, température d'hybridation (T _m) optimale, localisation et référence pour les amorces utilisées pour le séquençage.....	51
Tableau 6 : Marqueurs génétiques des extrémités des segments chromosomiques des rats congéniques, emplacement et taille du segment d'origine normotendue en mégabases	51
Tableau 7 : Consommation moyenne des différentes composantes nutritionnelles selon la consommation quotidienne et la composition nutritionnelle de chacune des diètes NF/NS, NF/LS, HF/NS et HF/LS.....	61
Tableau 8 : Nombre de répétitions du dinucléotide TA dans le promoteur du gène GCA déterminé par séquençage de la région avec des amorces spécifiques..	88
Tableau 9 : Présence des variantes génétiques dans le gène du Récepteur Dear Dual AngII/ET-1 chez le rat DSS et les souches congéniques déterminées suite au séquençage et comparaison avec la séquence de référence.....	112

Liste des figures

Figure 1 Schéma du système rénal.....	4
Figure 2 Contrôle endocrinien de la pression artérielle.	5
Figure 3 : Illustration de la provenance des principaux gènes candidats dans les souches congéniques SM9 et SM12 et la souche parentale DSS	266
Figure 4 : Schéma d'une coupe histologique du cœur.	488
Figure 5 : Apport alimentaire quotidien (A) des rats DSS congéniques pour chacune des diètes NFNS, NFLS, HFNS ou HFSL ainsi que la masse corporelle (B) après 31 jours de diète.	555
Figure 6 : Variation du rapport de la masse adipeuse sur la masse maigre (A) des rats DSS congéniques (delta) pour chacune des diètes NFNS, NFLS, HFNS ou HFSL ainsi que l'eau libre (B) après 31 jours de diète.	588
Figure 7 : Bilan lipidique sérique des rats DSS congéniques après 31 jours de diète NFNS ou HFSL, indiquant la concentration des triglycérides (A), du cholestérol total (B), des HDL (C) ainsi que des LDL (D) exprimés en mmole/L.....	60
Figure 8 : Poids absolus et relatifs des reins droit et gauche (A, B), du tissu adipeux rétro-péritonéal (C, D), des ventricules droit et gauche (E, F) ainsi que des oreillettes droite et gauche (G, H) des rats DSS congéniques après 31 jours de diète NFNS, NFLS, HFNS ou HFSL.	655
Figure 9 : Pression moyenne (mm Hg), déterminée par radio-télé-métrie, des rats DSS congéniques après 33 jours de diète NF/NS et HF/LS.....	688
Figure 10 : Apport hydrique (A) et diurèse (B) compilés pendant 24 heures dans des cages métaboliques chez les congéniques du rat DSS lors des diètes NFNS, NFLS, HFNS et HFSL.....	70
Figure 11 : Analyse de la natriurie (A), kaliurie (B), du ratio Na/K urinaire (C) et de la protéinurie (D) après une collecte de 24 heures dans des cages métaboliques chez les congéniques du rat DSS lors des diètes NFNS et HFSL.....	722
Figure 12 : Clairance de la créatinine des rats DSS congéniques déterminée à la fin de la diète NFNS, NFLS, HFNS et HFSL.	733
Figure 13 : Natrémie (A), kalémie (B) et aldostérone sérique (C) chez les congéniques du rat DSS déterminés à la fin de la diète NFNS et HFSL..	744

- Figure 14:** Dommages rénaux déterminés par une étude histopathologique externe à l'aveugle à la fin de la diète NF/NS et HF/LS. Les glomérules, tubules, pelvis et fornix, vaisseaux et l'espace interstitiel ont été examinés (A) pour un total de 21 paramètres, un score total de dommages a été déterminé (B) et des photos représentatives des dommages tubulaires sont montrées (C).....79
- Figure 15 :** Réponse diurétique (A), natriurétique (B) et niveaux de GMPc urinaire (C) après stimulation par l'injection d'ANP suite à un gavage des rats DSS congéniques sur les diètes NF/NS, NF/LS, HF/NS et HF/LS. 81
- Figure 16 :** Stimulation de la guanylate cyclase par l'ANP sur la diète NF/NS (A) et HF/LS (B) dans les glomérules isolés des rats DSS congéniques. 855
- Figure 17 :** Expression relative de l'ARNm de GCA et du ratio GCA/NprC sur la diète NF/NS et HF/LS dans le cortex glomérulaire (A, B) et dans le tissu adipeux rétro-péritonéal (C, D) des rats DSS congéniques..... 879
- Figure 18 :** Expression relative de l'ARNm du pré-pro-ANP dans les oreillettes (A) et les ventricules (B) des rats congéniques lors de la diète NF/NS et HF/LS.....91
- Figure 19 :** Expression relative de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque (A, B) et de la fibrose (C) dans les ventricules sur la diète NF/NS et HF/LS. 955
- Figure 20 :** Morphométrie cardiaque (A) et aire de surface des myocytes du subendocarde et du subépicarde (B) et schéma des coupes de coeur (C) chez les rats congéniques lors de la diète NF/NS et HF/LS..... 979
- Figure 21 :** Fibrose cardiaque déterminée d'après une coloration Trichrome de Masson dans le tissu subendocardique, subépicardique et midmyocardique par quantification avec photoshop chez les rats congéniques lors de la diète NF/NS et HF/LS..**Erreur ! Signet non défini.**03
- Figure 22 :** Diagramme de Venn montrant les gènes normotendus (A) et hypertendus (B) communs entre les souches congéniques et la souche parentale DSS. 10707

Abréviations et sigles

µm	Micromètre
α, β, γ, ω	Alpha, bêta, gamma, omega
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACSL5	Synthétase 5 de l'acyl CoA
ACV	Accident vasculaire cérébral
ADD	Adducine
ADH	Hormone anti-diurétique ou vasopressine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGT	Angiotensinogène
AHA	American Heart Association
Ala	Alanine
ANOVA	Analyse de variance
ANP	Peptide auriculaire natriurétique
Apo-A1	Apolipoprotéine de type A1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AS	Anti-sens
AT1	Récepteur de l'angiotensine de type I
ATP	Adénosine triphosphate
BKCa	Canal potassique activé par le calcium
β-MHC	Chaîne lourde bêta de la myosine
BNP	Peptide natriurétique du cerveau (ou de type B)
Ca	Calcium
CaMK	Protéine kinase Ca ²⁺ -calmoduline dépendante
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux
CCR	Clairance de la créatinine
CD36	Transporteur d'acide gras CD36
CIPA	Comité institutionnel de protection des animaux
Cl	Chlore

CNP	Peptide natriurétique de type C
CNV	Variation dans le nombre de copies
Cys	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
Dahl/DSS/S	Rat Dahl hypertendu
Dear	Récepteur Dear double AngII/ET-1
DR	Dahl résistant
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
eNOS	Synthétase d'oxyde nitrique
fga	Gène de la chaîne alpha du fibrinogène
fgb	Gène de la chaîne bêta du fibrinogène
fgg	Gène de la chaîne gamma du fibrinogène
GCA/Npr1	Récepteur du peptide auriculaire natriurétique
GCB	Guanylyl cyclase B
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Forme cyclique de la guanosine monophosphate
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GTP	Guanosine triphosphate
HCN	Canal d'hyperpolarisation activé par les nucléotides cycliques
HDL	Lipoprotéine de haute densité, High-density-lipoprotein
HF	Diète riche en gras "High Fat"
HF/LS	Diète riche en gras et faible en sel
HF/NS	Diète riche en gras et sel normal
HSD11B2	Bêta-déshydrogénase du corticostéroïde 11, isozyme 2
Hsp	Protéines de stress
IDF	International Diabetes Federation
IGF	Facteur de croissance de l'insuline
IL-6	Interleukine 6
InsR	Récepteur associé au récepteur de l'insuline
Insrr	Récepteur-Connexe de la protéine insuline
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate

IRIC	Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie de l'Université de Montréal
K	Potassium
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogramme
L	Litre
LDL	Lipoprotéine de basse densité , Low-density-lipoprotein
LDLR	Récepteur du LDL
MB	Mégabase
MCP-1	Protéine « chimio-attractant » des monocytes
MEF2	Facteur de transcription "myocyte enhancer factor"
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
MLCP	Phosphatase des chaînes légères de la myosine
mM	Millimolaire
mm Hg	Millimètre de mercure
MNS	Rat Milan normotendu
Na	Sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NCEP	National Cholesterol Education Program
NEP	Endopeptidase neutre
NF	Diète normale "Normal Fat"
NF/LS	Diète normale en gras, faible en sel
NF/NS	Diète normale en gras et en sel
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
NO	Oxyde nitrique
NOS	NO synthétase
NprC	Récepteur du peptide natriurétique C
PAD	Pression diastolique
PAS	Pression systolique

pb	paire de base
PDGF	Facteur de croissance plaquettaire
PECH	Programme Éducatif Canadien sur l'Hypertension
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase dépendante du GMPc
PN	Peptide natriurétique
PPAR	Récepteur γ activable par les proliférateurs du peroxyosome
PWA	Études d'association pangénomique
QTL	Loci de caractère quantitatif
RAAS	Système rénine-angiotensine-aldostérone
Ren	Rénine
SERCA	Canal calcique du réticulum sarcoplasmique
SHR	Rat spontanément hypertendu
siRNA	Petit ARN interférent
SNP	Polymorphisme pour un nucléotide
TBP	TATA binding protein
TGF- β 1	Facteur de croissance transformant bêta 1
T _m	Température d'hybridation optimale
TNF α	Facteur nécrosant des tumeurs
WHO/OMS	World health organisation, Organisation mondiale de la santé
WNK	Sérine-thréonine kinase "with no lysine"
WTCCC	Consortium Wellcome Trust case-Control

« Si l'on considérait une théorie comme parfaite et si l'on cessait de la vérifier par l'expérience scientifique, elle deviendrait une doctrine. »

Citation de Claude Bernard –médecin et physiologiste (1813-1878), père fondateur de la médecine expérimentale

Remerciements

Je remercie, tout spécialement ma directrice de recherche, Dre Johanne Tremblay, pour l'optimisme conservée tout au long de ce projet de maîtrise et pour ses conseils judicieux qui m'ont permis de voir, à maintes reprises les résultats sous une autre perspective. Je souhaite remercier Dr Pavel Hamet pour les discussions enrichissantes et son point de vue clinique sur le projet.

J'aimerais adresser des remerciements à toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à ce projet. Merci à Suzanne Cossette pour son assistance technique au laboratoire ainsi que pour les corrections et les commentaires qu'elle a fait sur mon mémoire. Merci à Dr Hiroyuki Matsuda et Guy Martel pour leur support technique et leurs encouragements. Merci également à Dr Junzheng Peng et Catherine Michel pour leur aide précieuse à l'animalerie. Merci à Evelyne Morin qui a été disponible pour permettre la bonne transition du projet. Merci à Andrée Levesque pour son travail efficace en tant qu'adjointe administrative. Merci à Dr Alan Deng et Julie Roy pour la conception des souches de rats congéniques.

Je tiens à remercier les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), le Centre de recherche du CHUM (CRCHUM) et la société québécoise d'hypertension artérielle (SQHA) pour le soutien financier au cours de mes études de deuxième cycle.

J'exprime également ma grande reconnaissance à Claude Forté, mon père et à Chantal Fillion, ma mère qui ont toujours été fiers de moi et qui m'ont supporté tout au long de mes études universitaires.

Par dessus tout, je remercie Pascal, mon conjoint, pour sa vision optimiste, son soutien et ses encouragements constants.

1. Introduction

1.1 Notions fondamentales

1.1.1 L'hypertension et le syndrome métabolique... Un problème d'actualité

La prévalence de l'obésité et de l'hypertension n'a pas cessé d'augmenter au cours des dernières années à un point tel que désormais approximativement 26% de la population mondiale est hypertendue [1]. Il semble y avoir un lien étroit entre une combinaison de facteurs de risque et les maladies cardiovasculaires. Le terme syndrome métabolique est couramment employé pour faire référence à ces facteurs de risque qui comprennent : l'hypertension artérielle, l'obésité, un mauvais bilan lipidique sanguin, des signes de dommages rénaux et la résistance à l'insuline. Malgré que l'utilisation de l'expression syndrome métabolique soit controversée en médecine car le terme syndrome impliquerait une synergie de ces facteurs, il semble bel et bien exister un lien entre ces facteurs et la prévalence des incidents cardiovasculaires. Actuellement, selon l'*American Diabetes Association* et l'*Association européenne pour l'étude du diabète*, les évidences ne supportent pas qu'un effet cumulatif des facteurs de risque soit plus important que leur effet individuel. La majorité des cas d'hypertension sont dits de type essentiels c'est-à-dire multifactoriels et polygéniques. Il est estimé que le syndrome métabolique affecte 25% de la population et que la moitié de celle-ci soit hypertendue [2].

Par définition, l'hypertension est l'augmentation anormale et non contrôlée de la pression qu'exerce le sang sur la paroi des vaisseaux sanguins. La pression artérielle est exprimée en millimètre de mercure (mm Hg) selon un rapport de la pression systolique (PAS) sur la pression diastolique (PAD). Selon le Programme Éducatif Canadien sur l'Hypertension

2008 (PECH) la situation d'un patient devient critique lorsque la PAS est ≥ 140 mm Hg. D'autre part chez les patients normaux (sans diabète ou autres troubles cardiovasculaires), lorsque la PAS est ≥ 130 mm Hg et/ou que la PAD est ≥ 85 mm Hg, un suivi annuel est recommandé pour suivre l'évolution (PECH 2008). En général, les canadiens ont tendance à être plus fréquemment hypertendus (16% contre 13%) que les canadiennes et près du quart d'entre-eux (26%) ignoraient qu'ils étaient hypertendus [3].

L'hypertension artérielle mène à de nombreuses complications cardiaques, neurologiques et rénales incluant entre autres l'infarctus du myocarde, l'hypertrophie du ventricule gauche, l'athérosclérose, l'accident vasculaire cérébral (ACV) et l'insuffisance rénale. La diversification des conditions pathologiques a mené au développement de nombreux types de traitements pouvant être regroupés en cinq classes : les diurétiques, les bêta-bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), les bloqueurs du récepteur de l'angiotensine II et les bloqueurs des canaux calciques. Pour atteindre une cible optimale de pression artérielle, une combinaison de médicaments est souvent nécessaire. En effet, le quart des patients hypertendus ont besoin de deux médicaments alors que 16% en ont besoin de plus de trois et ces chiffres sont encore plus élevés si le sujet est diabétique ou qu'il a des troubles rénaux. Certains individus demeurent résistants aux traitements. La résistance peut provenir entre autres de la prise de la mesure de la pression artérielle (syndrome du sarrau blanc), du patient lui-même (adhérence aux médicaments, prise de drogue ou d'alcool, obésité, régime à teneur élevée en sodium) et même du médecin (mauvais dosage ou combinaison de médicaments).

1.1.2 Le rein est un organe clef pour le contrôle de la pression artérielle

Les reins filtrent le sang et contribuent à l'homéostasie du corps humain. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein qui comprend le glomérule et le système tubulaire pour aboutir au tube collecteur. Au niveau du cortex, le glomérule filtre le sang pour former l'ultra-filtrat qui sera réabsorbé au niveau des tubules afin de déterminer la composition de l'urine. L'essentiel de la réabsorption se fait dans le tube contourné proximal. La réabsorption peut également être stimulée par des hormones. C'est par le contrôle sur la volémie que le rein exerce sa plus grande influence sur la pression artérielle. La figure 1 illustre les principales composantes anatomiques du système rénal.

1.1.3 Contrôle endocrinien de la pression artérielle

De manière plus générale, la pression artérielle est soigneusement régulée par le système nerveux et le système endocrinien qui agissent respectivement à court et moyen terme. En premier lieu, la stimulation du nerf vague ralentit la fréquence cardiaque ce qui provoque une vasodilatation. Ensuite la vasopressine, l'aldostérone, le peptide auriculaire natriurétique (ANP) et l'oxyde nitrique (NO) sont quatre hormones qui jouent un rôle considérable au niveau de la régulation de la pression artérielle (Figure 2). La vasopressine, également nommée hormone anti-diurétique (ADH) permet la réabsorption d'eau par le tube collecteur. La synthèse de pro-rénine par l'appareil juxta-glomérulaire du rein en réponse à : 1) une baisse de la pression artérielle; 2) une hyponatrémie (faible taux de sodium dans le sang); ou 3) une hyperkaliémie déclenche le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS). La sécrétion d'aldostérone, finement régulée, permet la

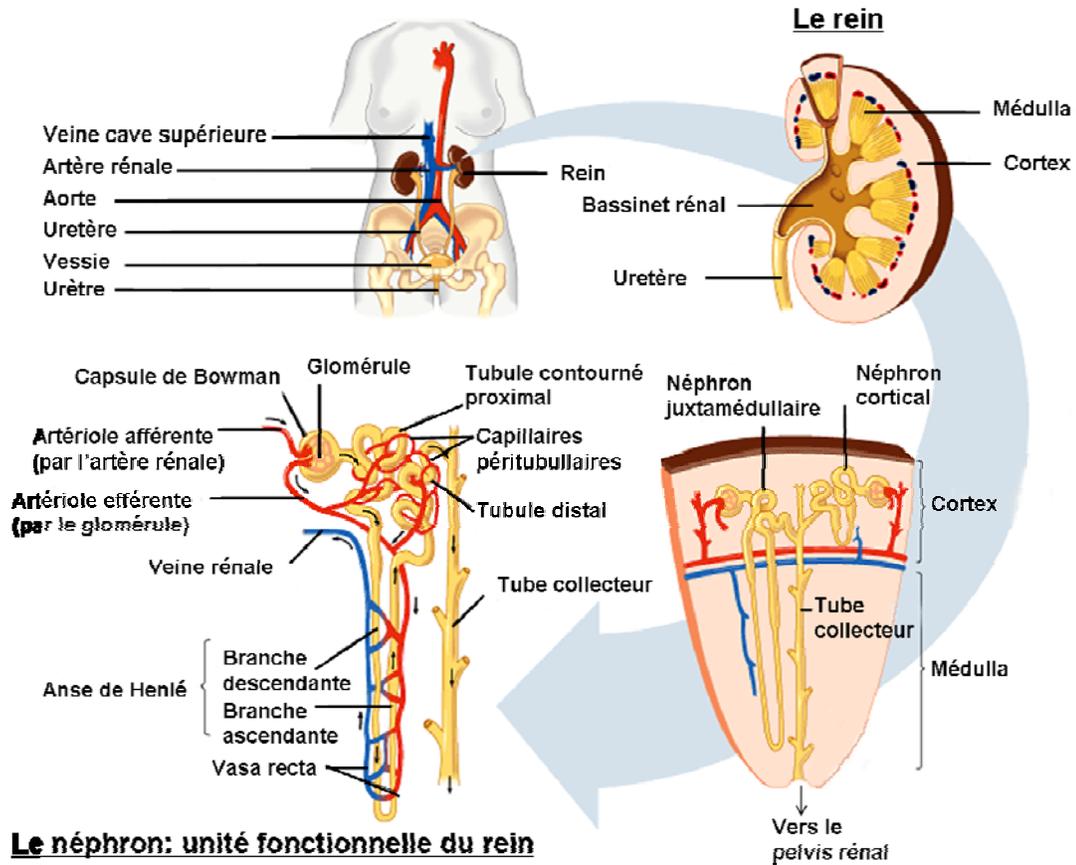


Figure 1 Schéma du système rénal. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Le sang est filtré dans le glomérule, ce qui produit l'ultra-filtrat dont la composition est ajustée dans les tubules par réabsorption ou sécrétion des électrolytes ou autres déchets métaboliques. (Adapté du site web <http://www.nephrohus.org/s/spip.php?article84>)

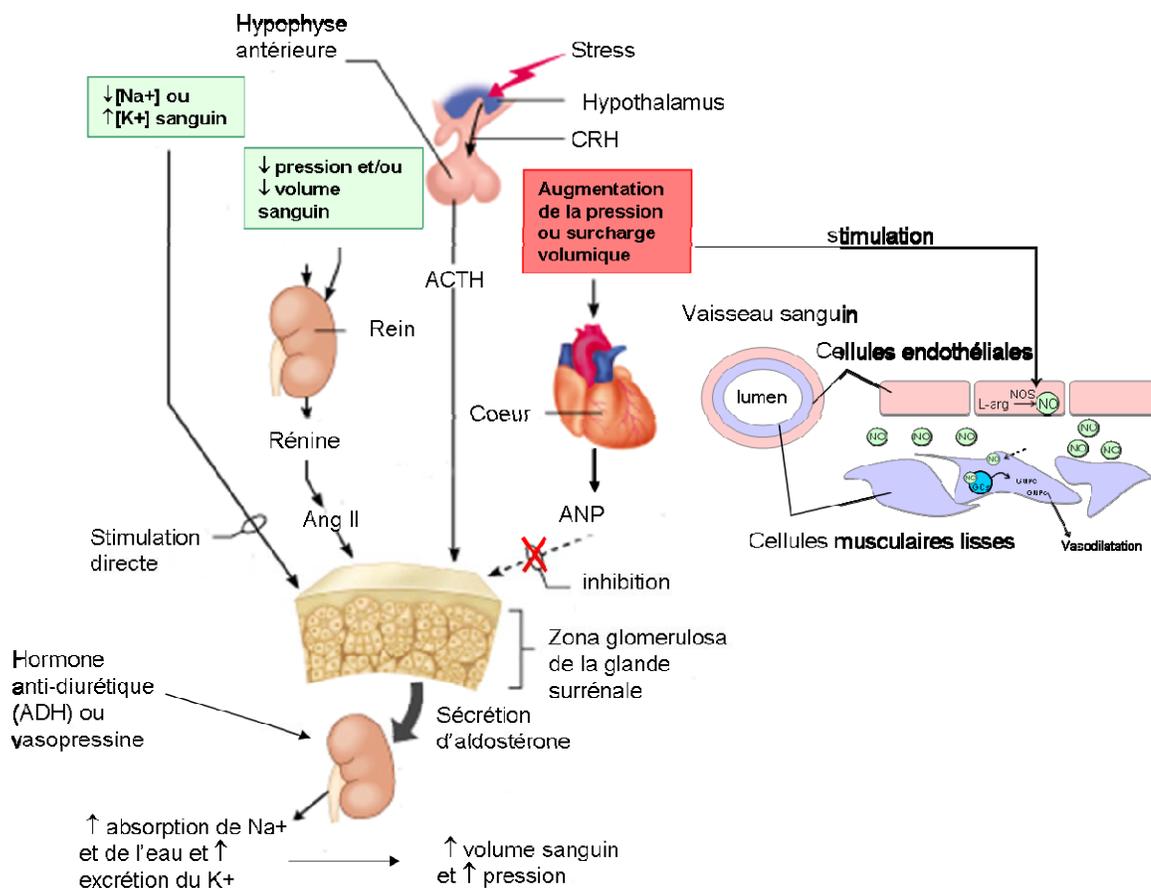


Figure 2 Contrôle endocrinien de la pression artérielle. Le système RAAS et l'ADH stimulent l'absorption d'eau et de sel (vasoconstriction) par le rein tandis que l'ANP et le NO ont une action vasodilatatrice. (adapté de Addison Wesley Longman, 2001).

réabsorption de sodium par le tube collecteur et contribue au maintien du volume plasmatique. L'aldostérone et l'ADH exercent une action positive sur la pression sanguine. L'action hémodynamique de l'ANP consiste à antagoniser le système RAAS, à augmenter l'excrétion des électrolytes et des fluides au niveau du tubule, à augmenter la perméabilité capillaire, à stimuler la filtration glomérulaire et à permettre la vasodilatation [4]. De manière similaire à l'ANP, NO a une activité natriurétique et diurétique [5]. L'ANP et le NO contribuent donc à la diminution de la pression sanguine.

1.1.4 La sensibilité au sel n'est pas à prendre avec un grain de sel

Lorsque le rein ne parvient plus à éliminer efficacement le sodium ingéré par l'alimentation, il y a rétention de sodium et d'eau ce qui contribue à une hypertension d'origine hypervolémique. Il est bien établi que la consommation de sodium est associée à un risque plus élevé d'hypertension [6]. Un nombre élevé de cas d'hypertension pourrait être évité par la réduction de l'apport sodé. Dans la population, il est estimé qu'environ 10% des gens sont sensibles au sel et cette prévalence augmente d'autant plus chez les hypertendus pour atteindre jusqu'à la moitié d'entre-eux [7]. La composante génétique serait d'ailleurs très importante pour la sensibilité au sel. De plus, les individus de race noire ont des risques encore plus élevés d'être sensibles au sel. La sensibilité au sel serait liée au syndrome métabolique. En effet, l'état de résistance à l'insuline aurait la capacité d'augmenter la réabsorption de sodium dans les tubules rénaux occasionnant ainsi la rétention de sodium et engendrant l'hypertension [8]. Ceci pourrait expliquer dans certains cas, la corrélation entre les individus hypertendus sensibles au sel et le syndrome métabolique [8]. De plus, il a déjà été démontré qu'une diète riche en sodium active les voies de signalisation en aval du récepteur de l'insuline, et ce, malgré que l'état

physiologique de résistance à l'insuline soit présent [6]. L'induction minimale requise pour la résistance à l'insuline chez le rat DSS serait une diète 8% sodium pendant au minimum 4 semaines [9].

1.2 Dissection génétique de la physiopathologie de l'hypertension

1.2.1 Stratégie d'identification des gènes candidats

Un défi considérable consiste à identifier les gènes qui rendent un individu plus susceptible à développer au cours de sa vie, l'hypertension essentielle dont l'étiologie demeure inconnue et qui représente environ 95% des hypertendus. L'influence de l'environnement sur les gènes, telle l'alimentation et le mode de vie, a un rôle important sur la pathogénèse des maladies complexes telles que l'hypertension. Environ 30% de l'héritage génétique, combiné aux facteurs environnementaux, serait imputable à l'hypertension [1]. Depuis longtemps les chercheurs se penchent sur les gènes qui sont les acteurs majeurs de manière à développer une stratégie pharmaceutique efficace et éventuellement permettre une médecine personnalisée. Ainsi dans le génome humain, plus de cent loci de caractère quantitatif (QTL) ont été identifiés par l'approche du scan de génome et la majorité de ces QTL se trouvent sur les chromosomes 1, 2, 3, 17 et 18 [10]. Le séquençage du génome humain combiné aux progrès de nos connaissances sur les mécanismes biologiques de l'hypertension, ont permis d'identifier de nombreux gènes candidats. Les souches congéniques sont un outil pour restreindre le nombre de gènes contenus dans ces QTL afin de mieux comprendre leur interaction avec la pathophysiologie. Parmi les outils à notre disposition pour formuler ou vérifier des hypothèses au sujet de l'impact de gènes candidats, mentionnons : 1) les micropuces à ADN (acide désoxyribonucléique), 2) le séquençage pour trouver des variantes génétiques (polymorphisme pour un nucléotide ou

SNP) ou la variation dans le nombre de copies (ou CNV) et 3) les acides ribonucléiques (ARN) d'interférence. Les gènes candidats inclus dans les QTL sont souvent déterminés d'après nos connaissances des mécanismes de l'hypertension ce qui limite la découverte de nouvelles voies jusqu'alors non suspectées. La combinaison et l'interaction de plusieurs QTL entre eux pourrait être parfois nécessaire pour obtenir un phénotype, ce qui rend plus ardue la compréhension des mécanismes génétiques de l'hypertension. De plus, certains QTL peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la pression en plus de nécessiter la présence de d'autres éléments. Actuellement, il y a 3 méthodes qui sont plus fréquemment utilisées dans la recherche de gènes candidats chez l'humain : les études de liaison, les études d'association de gène candidat et les études d'association pangénomique (PWA). À partir de familles dont l'on possède suffisamment de données médicales, il est possible de localiser des régions qui ségrégent de manière non-indépendante : il s'agit d'étude de liaison. D'autre part, les études d'association avec un gène candidat est une méthode plus puissante puisqu'une plus grande population est étudiée. Le génotype d'un gène candidat et le phénotype de groupes de sujets sains et atteints sont comparés pour détecter des génotypes liés à un phénotype plus fréquent que le hasard. Finalement, une autre approche bioinformatique est l'étude d'association pangénomique (en anglais : *Genome-wide association*) qui compare des individus sains et hypertendus afin de trouver des variantes génétiques qui augmenteraient la prévalence des traits caractéristiques de la maladie [10]. Le PWA a été rendu possible grâce à l'amélioration et l'automatisation des techniques de génotypage qui peuvent désormais détecter rapidement plus de 500 000 variations génétiques sur l'ADN d'un même individu. En 2007, un regroupement mondial de chercheurs, le Wellcome Trust case-Control consortium (WTCCC), a publié les résultats d'une vaste étude PWA qui incluait plus de 14 000 individus avec des maladies

généétiques complexes, telles que l'hypertension artérielle [11]. Les résultats de l'étude n'ont pas été fructueux pour l'hypertension puisque c'est la seule des maladies étudiées qui n'a pas permis l'identification de variantes génétiques, et ce, malgré qu'environ 2000 des individus étaient hypertendus [11]. Notre groupe a publié des QTL pour la pression et des paramètres métaboliques sur le chromosome 1 [12]. L'étude d'une plus grande population et un nombre plus élevé de marqueurs permettraient probablement d'obtenir de meilleurs résultats. De plus, notre groupe a démontré que les déterminants génétiques de l'hypertension et de plusieurs phénotypes cardiométaboliques associés peuvent être différents entre les sexes autant chez le rat que chez l'humain [13;19].

1.2.2 La génétique de l'hypertension

La population canadienne française du Saguenay-Lac St-Jean est relativement isolée et présente l'avantage de posséder des arbres généalogiques numérisés qui datent d'à partir du 17^e siècle. Une importante étude comprenant 120 familles (897 sujets) menée par notre groupe a permis de démontrer 46 loci en lien avec l'hypertension et les risques cardiométaboliques associés, majoritairement sur les chromosomes 1 et 3 [20].

Bien qu'établir une liste exhaustive des gènes candidats de l'hypertension ne soit pas réaliste, les progrès en génétique sont encourageants. Pour le moment, les gènes candidats de l'hypertension peuvent se regrouper en cinq classes selon leur fonction physiologique (Tableau 1).

Ces gènes candidats ont été établis d'après des études de liaison et d'association qui sont souvent contradictoires entre-elles. D'autre part, certaines études utilisant des animaux

transgéniques ou des ARN d'interférence ont permis d'approfondir nos connaissances. Par exemple, l'inhibition de WKN1 a démontré son importance pour l'activation de la kinase ERK5 ce qui ouvre des pistes pour la compréhension des mécanismes moléculaires [1]. De plus, l'expression d'un gène pourrait être un intermédiaire entre sa séquence et le phénotype. Autrement dit, un facteur agissant en *cis* (enhancer, silencer) pourrait influencer l'expression d'un gène qui ne possède aucune variante génétique tout en laissant un héritage génétique. Par exemple, les protéines de stress (hsp) sont importantes pour la réponse adaptative au stress, notamment en modifiant l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress. Notre groupe a démontré un caractère génétique à la réponse au stress dans un contexte d'hypertension en mettant en évidence les variations des ARNm de hsp27, 70, 86 et 105 dans le cœur, le rein et les surrénales [22]. C'est ainsi que des études de liaison, combinées à des profils d'expression par des biopuces, ont permis d'identifier plus de 73 éléments en *cis* dans le tissu adipeux et le rein qui mériteraient d'être explorés plus en détails [16].

Classe	Candidats
Contrôle du sodium et des fluides	Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) Angiotensinogène (AGT) Aldostérone synthase Récepteur de l'angiotensine II (AT1) α et β -adducine (ADD1 et ADD2) Peptide auriculo-natriurétique (ANP) Récepteur du peptide natriurétique A (GCA) Récepteur du peptide natriurétique B (GCB) Rénine (REN) Sérine-thréonine kinase "with no lysine" (WNK4) Corticostéroïde 11-beta-déhydrogénase 2 (HSD11B2)
Système nerveux	Récepteur Beta2 adrénergique Récepteur Beta3 adrénergique Récepteur dopamine D2 Récepteur alpha adrénergique
Vasculaire	Endothéline-1 Oxyde nitrique synthétase endothéliale Oxyde nitrique synthétase inductible
Métabolisme	Glycogène synthétase Récepteur de l'insuline Lipoprotéine lipase Apolipoprotéine C-III
Autres	Protéine G, sous-unité β 3

Tableau 1 Principaux gènes candidats de l'hypertension essentielle regroupés selon 5 classes de fonctions physiologiques (tiré de [17]).

1.2.3 Lien génétique entre l'hypertension, l'obésité et le syndrome métabolique

Actuellement, près du deux tiers des canadiens font de l'embonpoint et cette tendance est malheureusement à la hausse depuis les dernières 25 années (Statistique Canada <http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/iyh-vsv/life-vie/obes-fra.php>). Le génome humain évolue à un rythme beaucoup plus lent, ce qui indique que la composante environnementale de l'obésité est un facteur non négligeable. Le remplacement de l'activité physique par des loisirs passifs (télévision, jeux vidéo), l'augmentation des portions alimentaires, l'attrait croissant pour les chaînes de restauration rapide en sont quelques exemples. En 1962, James Neel propose l'hypothèse du génotype « économe » (ou Thrifty, en anglais) et prétend que la sélection naturelle a favorisé les gènes qui permettent la formation de tissus adipeux dans les périodes les plus fastes pour favoriser la survie dans les périodes de grande famine [18].

De nos jours, le mode de vie occidental faciliterait le phénotype obèse chez les individus. Depuis longtemps, la fonction du tissu adipeux était de servir comme une réserve d'énergie. Or, il est maintenant accepté que l'adipocyte a un rôle important dans le métabolisme par la production d'adipokines qui régulent entre autres l'appétit (leptine), la balance glucolipidique (adiponectine) et la résistance à l'insuline (facteur nécrosant des tumeurs (TNF α), interleukine 6 (IL-6))[19]. L'obésité viscérale est associée à un taux élevé d'acides gras libres qui peuvent activer des voies de signalisation aboutissant à une résistance à l'insuline [20]. Cependant, ce ne sont pas tous les individus obèses et sédentaires qui développent le syndrome métabolique et plusieurs chercheurs prétendent que l'obésité viscérale et les métabolites des lipides au détriment du gras corporel sous-cutané seraient le déterminant imminent du syndrome métabolique [2]. Il existe au moins 6 définitions ((World health organisation (WHO), European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), National Cholesterol Education Program (NCEP), American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), National Heart, American Heart Association/Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI), International Diabetes Federation (IDF)) différentes du syndrome métabolique et pour lesquelles les intervalles d'inclusions des différents critères (masse corporelle, pression artérielle, dyslipidémie, résistance à l'insuline) varient [21]. À présent, les analyses génétiques de liaison et d'association ont donné des résultats peu convaincants notamment parce que les multiples définitions compliquent les analyses, les groupes d'individus étudiés sont trop petits et proviennent souvent de différentes origines ethniques [21]. Les gènes candidats peuvent se regrouper en plusieurs catégories : le métabolisme des lipides, le métabolisme énergétique et des glucides, l'inflammation et les autres. Le tableau 2 présente quelques-uns de ces gènes candidats d'après de nombreuses études d'association ou une application bioinformatique prometteuse ENDEAVOUR pour trouver des gènes candidats à partir de bases de données [21;22]. Parmi les gènes candidats des plus prometteurs pour le syndrome métabolique, il y a le récepteur γ activable par les proliférateurs du peroxysoxe (PPAR γ). Des études de liaisons ont montré une forte association pour la susceptibilité au diabète de type 2 et à l'obésité. Il s'agit d'un récepteur nucléaire activé par des acides gras et qui permet de contrôler l'expression de gènes impliqués dans le développement du tissu adipeux et dans le contrôle de l'homéostasie [7]. Une variante génétique consistant au remplacement d'une proline (pro) en position 12 par une alanine (ala) (Pro 12 Ala) est très étudiée et procure une liaison moindre à l'élément de

réponse, ce qui résulte en une activation réduite de la transcription des gènes cibles de PPAR γ [23]. Parmi les gènes candidats intéressants pouvant faire le lien entre l'obésité, l'hypertension et le syndrome métabolique, mentionnons le transporteur d'acide gras (CD36). Une déficience dans l'expression rénale de CD36 est associée à une pression artérielle élevée, une résistance à l'insuline et interfère dans le métabolisme des acides gras chez le rat spontanément hypertendu (SHR) [24]. Une étude de PWA a identifié plusieurs gènes qui pourraient être impliqués dans le syndrome métabolique mais aucun d'entre eux ne semble contribuer à tous les facteurs de risques du syndrome métabolique à la fois. Ceci pourrait être une conséquence : 1) du manque de puissance des analyses génétiques; 2) du fait que certains gènes contribuent indirectement à d'autres traits phénotypiques, par exemple des facteurs de transcription ou des intermédiaires dans les voies de signalisation et 3) le caractère polygénique du syndrome métabolique [25].

Classe	Gènes candidats
Métabolisme des lipides	Adipokines Résistine Adiponectine Récepteur γ activable par les proliférateurs du peroxyosome (PPAR)
	Lipoprotéines Apolipoprotéin A-V (Apoa5) Apolipoprotéin C-III (Apoc3)
	Distribution du tissu adipeux Lamine 11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 Récepteur des glucocorticoïdes (GR) Récepteur de l'estrogène α Transporteur d'acide gras CD36 (CD36)
	Acide gras et cholestérol Récepteur des LDL (ldlr) Gene induit par l'insuline 2
Inflammation	Facteur nécrosant des tumeurs Protéine chimiotactique-1 des monocytes (MCP-1) Interleukine 6 NO synthétase
Métabolisme énergétique et du glucose	Glycoprotéine PC-1 Protéine découplante mitochondriale 2 Complément 1q et protéine 5 associé au TNF Récepteur de la mélanocortine Précurseur de la protéine associée au récepteur de l'insuline (INSRR)
Autres	Synthase aldostérone Sérotonine 2C Serpine 1

Tableau 2 : Principaux gènes candidats du syndrome métabolique regroupés selon 4 classes de fonctions physiologiques. (selon [21,22]).

1.3 Influence de l'environnement sur le développement de l'hypertension et du syndrome métabolique

Notre environnement et notre mode de vie ont un impact certain sur l'incidence que nous avons à développer certaines maladies au cours de notre vie. Cependant, le mécanisme qui permet aux composantes environnementales d'interagir avec nos gènes est moins évident à comprendre. Il est plausible que les maladies à nature polygénique telles que le syndrome métabolique et l'hypertension soient la résultante de plusieurs gènes interagissant et modulables par des facteurs environnementaux [26]. L'effet individuel de ces gènes est

minime sur le phénotype mais confère une importance significative [26]. Certains facteurs environnementaux ont bien été documentés pour leur effet sur les maladies cardiovasculaires. Aussi, il est bien connu que la consommation faible ou modérée de vin ou de bière est bénéfique pour les maladies cardiovasculaires et le syndrome métabolique. Par ailleurs, l'alcool améliorerait le bilan lipidique (lipoprotéine de haute densité (HDL) élevé), augmenterait la sensibilité à l'insuline [26]. Il serait également possible que l'éthanol inhibe les dommages à l'ADN qui sont induits par les peroxinitrites, lorsque l'endothélium est perturbé par le stress oxydatif [26]. Une étude de nutriginomique a comparé le profil d'expression d'individus ayant un syndrome métabolique sur une diète à index glycémique soit fort ou faible. La diète à index glycémique faible améliorait l'insulinémie, réduisait la taille des adipocytes sans modifier la masse corporelle et ce, parallèlement à une inhibition de l'expression de gènes (récepteur de l'insuline, lipase sensible aux hormones, protéine 5 de liaison aux facteurs de croissance de l'insuline (IGF) impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline [27]. À l'opposé, la diète à index glycémique élevé a stimulé le stress oxydatif, la réponse inflammatoire et les voies métaboliques des glucocorticoïdes [27].

La modification de l'alimentation et l'augmentation de l'activité physique demeurent actuellement la stratégie préventive la plus efficace pour la lutte contre les maladies cardiovasculaires. Le statut socio-économique et d'autres déterminants sociaux tels que le réseau social et ethnicité peuvent influencer les habitudes alimentaires des individus d'une population [28]. Avant de considérer toute approche pharmaceutique, augmenter l'activité physique pour le diabète de type 2, modifier l'alimentation pour l'obésité et réduire l'apport sodé pour l'hypertension chez les sujets sensibles au sel sont des approches à privilégier

[7]. Selon la théorie de Barker, une malnutrition in utero peut perturber de manière permanente la physiologie du fœtus et influencer négativement le système cardiovasculaire de manière à favoriser le développement de l'hypertension, de la résistance à l'insuline et de l'hypercholestérolémie lors de la vie adulte [29]. De nombreuses études ont démontrées que le poids du nouveau-né aurait une influence la pression artérielle de l'individu rendu adulte [29]. De plus, d'autres facteurs tels que l'apport en oxygène, la pré-éclampsie, le diabète gestationnel et l'inflammation modifient l'exposition du fœtus aux hormones et facteurs de croissance. En 1992, Lucas propose la théorie de la programmation fœtale qui stipule que des stimuli dans des périodes critiques du développement peuvent avoir des conséquences dans la vie adulte [30]. Les modifications épigénétiques sont des modifications au niveau de l'ADN qui ne changent pas la séquence mais qui peuvent être transmise à la génération suivantes. Les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN et les petits ARNs interférants (siRNA) sont des exemples d'altérations épigénétiques qui modifient l'expression des gènes [7;31]. L'exposition à la fumée de cigarette augmente les risques d'athérosclérose, de syndrome métabolique et de complications chez les diabétiques. Il y a cependant beaucoup de variabilité inter-individus et certaines études démontrent des exemples de polymorphisme dans les gènes de l'apolipoprotéine E et de la glutathione S-transférase qui pourraient expliquer ces différences chez les fumeurs [26]. La conséquence des toxines environnementales (arsenic, dioxine, radiations, pollution de l'air) sur le développement des maladies cardiovasculaires est encore méconnue mais ce champ de recherche a fait l'objet de plusieurs études. L'exposition aux polluants atmosphériques serait un facteur de risque pour l'infarctus du myocarde. De plus, les patients atteints du syndrome métabolique et exposés à la pollution auraient les marqueurs de l'inflammation plus élevés [26]. Malgré que les mécanismes

exacts demeurent inconnus, il a été suggéré que l'inflammation, la thrombose et le stress oxydatif soient impliqués [26;32]. L'endothélium semble particulièrement fragile face aux effets toxiques des polluants environnementaux qui pourraient attaquer la biodisponibilité du NO, un acteur de première importance pour la vasodilatation et la réponse inflammatoire [32]. D'autre part, l'exposition aux polluants génère des radicaux libres menant à un état de stress oxydatif pouvant affecter l'état physiologique par des dommages aux protéines et aux acides nucléiques [32]. Il est bien connu que le stress émotionnel peut augmenter la pression artérielle et les risques cardiovasculaires. Notre groupe a mis en évidence l'existence de gènes candidats communs entre la susceptibilité au stress, les composantes immunitaires et l'hypertension dans un modèle de souris recombinante congénique [33]. De plus, une diète riche en gras prolonge l'augmentation de la pression artérielle suite à un stress [34].

1.3.1 Effet d'une diète riche en gras

Une alimentation riche en gras prédispose à l'obésité et au syndrome métabolique et la possibilité que des composantes de la diète interagissent avec les gènes pour contribuer aux phénotypes a déjà été soulignée. Un exemple bien connu consiste en l'interaction du récepteur PPAR- γ 2 avec les lipides de l'alimentation. Un polymorphisme Pro 12 Ala présent dans la population québécoise a été associé à une meilleure sensibilité de l'insuline, une réponse atténuée à l'apport de matière grasse [26]. Il a été observé dans une étude sur 522 individus ayant une intolérance au glucose, que l'incidence à développer le diabète de type 2 était deux fois plus élevée pour les homozygotes Ala12 mais qu'un traitement préventif par l'exercice et l'alimentation pouvait empêcher l'apparition du diabète [26]. La synthétase 5 de l'acyl CoA (ACSL5) est un gène modulé par PPAR- γ 2 impliqué dans la

biosynthèse des lipides [7]. ACSL5 pourrait expliquer pourquoi certains individus répondent différemment à la perte de poids [7]. Finalement les acides gras polyinsaturés semblent avoir des effets métaboliques important pour le métabolisme des lipides, en régulant l'activité des facteurs de transcription, tels que PPAR [27]. Une étude chez le rat DSS a démontré qu'une diète riche en gras et en sel (60% des calories provenant des acides gras principalement l'acide oléique, le stéarate et le palmitate, chlorure de sodium (NaCl) 8%) pendant 6 semaines, améliorait la force contractile du cœur, et empêchait l'apparition de l'hypertrophie en réponse à l'hypertension [35]. D'autre part, l'élévation des acides gras libres perturbe la production de NO, basale ou après stimulation par l'insuline [36]. L'obésité est généralement associée à une hausse des acides gras libres qui peuvent d'ailleurs agir comme molécule de signalisation et ainsi perturber l'homéostasie du glucose [19].

1.3.1.1 Les acides gras et le cholestérol

Les acides gras saturés, qui par définition possèdent le nombre maximal d'hydrogène sur chacun des carbones sont néfastes pour la santé. L'acide stéarique (C18 :0), l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide myristique (C14 :0) sont des acides gras saturés courants dans notre alimentation, particulièrement celle d'origine animale. Ils augmentent les taux de HDL (high-density-lipoprotein) et LDL (low-density-lipoprotein), les transporteurs sanguins du cholestérol. Les acides gras insaturés qui ont une (mono-insaturé) ou plusieurs (poly-insaturé) double liaisons carbone-carbone, se trouvent surtout dans les aliments d'origine végétale. Les acides gras insaturés peuvent être de conformation cis ou trans selon la disposition des atomes d'hydrogène de part et d'autre de la double liaison. Les acides gras mono-insaturés de type cis (ω -3, ω -6 et ω -9) sont bénéfiques pour la santé

cardiovasculaire. L'acide oléique, est l'acide gras prédominant de l'huile d'olive et contribuerait à ses effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire. Au contraire, les acides gras mono-insaturés de type trans sont néfastes pour la santé cardiovasculaire, et ce, même à faible dose. Le cholestérol joue un rôle essentiel dans plusieurs processus biologiques tel que la biosynthèse d'hormones stéroïdiennes et de la vitamine D3 tout en contribuant à la stabilité des membranes cellulaires. Par contre, lorsqu'il est en excès, c'est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires (infarctus du myocarde, crise d'angine et ACV). L'hypercholestérolémie engendrerait une réponse atténuée par les stimuli, particulièrement le NO, de la vasodilatation dépendante de l'endothélium [37]. De plus, l'activité de la synthétase d'oxyde nitrique eNOS serait influencée par plusieurs lipides dont les céramides [37]. Il a également été suggéré que l'hypercholestérolémie perturbe le fonctionnement du récepteur du NO et entraîne une augmentation compensatoire de l'expression du gène dans l'aorte et les cellules du muscle lisses vasculaires du rat [38]. Dans le même sens, l'effet protecteur des HDL pourrait provenir d'une stimulation de la production de l'oxyde nitrique [37]. Dans les pays occidentaux, environ 45% de l'apport énergétique provient des lipides malgré que la recommandation soit de 35% [39]. De plus, les acides gras saturés, qui représentent la moitié de l'apport total en matières grasses, ont été associé à une hausse de la pression systolique chez des rats mâles [39].

1.3.1.2 L'huile d'olive et la diète méditerranéenne

De nombreuses évidences montrent que la diète méditerranéenne a des effets bénéfiques sur la santé en réduisant le risque de maladies coronariennes, de cancers, en plus d'augmenter la longévité. Traditionnellement, la diète méditerranéenne comprend un apport élevé en : 1) noix, fruits et légumes, 2) une quantité importante de fibres, 3) un apport élevé d'huile

d'olive mais une faible quantité d'acides gras saturés, 4) une consommation moyenne de produits laitiers, 5) peu de viande rouge et de volaille et finalement 6) une consommation d'alcool modérée [40]. L'huile d'olive a une teneur particulièrement élevée en acide oléique et elle est la source principale de matière grasse dans le régime méditerranéen. Les évidences récentes montrent que les acides gras mono-insaturés d'origine végétale, et particulièrement l'acide oléique, sont bénéfiques dans le traitement de l'hypertension [41]. Des études chez l'humain ont démontré que le remplacement des acides gras saturés de la diète par des acides gras mono-insaturés permet de diminuer la pression artérielle [42]. Le mécanisme physiologique de la baisse de la pression artérielle n'est pas entièrement compris. Les acides gras mono-insaturés pourraient modifier la membrane de phospholipides, ce qui altérerait la pression. L'huile d'olive non raffinée, dite vierge, semblerait la plus bénéfique puisqu'elle contient d'autres composés tels que les antioxydants, les α -tocophérol, le squalène et les composés phénoliques (tyrosol, hydroxytyrosol) qui pourraient également contribuer au mécanisme [42]. Il est intéressant de noter qu'une molécule dérivée de l'acide oléique, l'acide 2-hydroxy-oléique a un effet hypotensif important [41].

1.3.1.3 Le rôle du tissu adipeux

L'obésité ou l'excès de poids se traduit par une augmentation de la masse adipeuse par l'hyperplasie (augmentation du nombre) ou par l'hypertrophie (augmentation de la taille) des adipocytes [43]. Le tissu adipeux a traditionnellement un rôle de stockage de l'énergie passif mais ce n'est que récemment que la fonction de glande endocrine lui a été attribuée. L'obésité abdominale (androïde) est associée aux troubles métaboliques du glucose, des lipides et à l'élévation de la pression sanguine contrairement à l'obésité sous-cutanée

(gynoïde) qui ne semble pas générer de complications systémiques [44]. Le tissu adipeux peut intervenir d'au moins deux façons pour perturber l'homéostasie du glucose. Premièrement, une masse adipeuse importante mène à un afflux d'acide gras libres vers d'autres organes ce qui aboutit à une augmentation des triglycérides et ces derniers peuvent 1) interférer avec les voies de signalisation de l'insuline; 2) inhiber l'absorption du glucose; pour finalement 3) favoriser la résistance à l'insuline [45]. Deuxièmement, le tissu adipeux sécrète plusieurs facteurs inflammatoires, les adipokines, dont certains ont un effet direct sur la sensibilité à l'insuline, la régulation de l'appétit, l'élimination du glucose et l'adipogénèse [45;19]. De plus certains adipokines ont une action paracrine telle que l'angiogénèse [19]. Les adipokines sont de deux types : des protéines bioactives telles que l'adiponectine et la leptine et des cytokines telles que le TNF-alpha et les interleukines 6, 8 et 10 [46].

1.3.2 Effet du sel

La consommation recommandée de sel selon l'Institut de médecine est de 1500 mg pour les individus entre 9 et 50 ans. En réalité, les adultes consomment deux fois plus que l'apport recommandé en sodium [47]. La majorité, soit environ 77% de la consommation de sel, proviendrait des aliments préparés alors que le sel de table aurait un impact minime sur la consommation quotidienne [47]. Depuis la découverte par les Chinois des techniques de conservation des aliments, le sel est devenu important économiquement. En effet, il est avantageux pour l'industrie alimentaire d'ajouter du sel aux produits pour plusieurs raisons : 1) en se liant à l'eau, il augmente le poids de la viande et donc permet un profit plus élevé; 2) en stimulant la soif, il favorise la consommation de boissons, souvent vendues par ces mêmes compagnies et finalement question de goût, 3) les consommateurs

préfèrent les aliments salés, 4) il a la capacité d'augmenter la durée de conservation des aliments [48]. Un apport élevé en sodium produit une hausse de la pression artérielle, puisque que les reins ne parviennent pas à tout l'éliminer. Les effets d'une diète riche en sel incluent aussi un plus grand risque d'ACV, d'hypertrophie du ventricule gauche et une progression plus rapide des maladies rénales [48]. La réduction de la consommation de sodium a montré des effets bénéfiques à court-terme chez les hypertendus et les pré-hypertendus, cependant l'effet à long terme est toujours controversé [47]. Un mécanisme indépendant de la pression et qui fait le lien entre une consommation élevée de sel et les dommages à l'endothélium a été suggéré. Une augmentation de l'apport en sodium se traduit par la surexpression du facteur de croissance transformant (TGF- β 1) et de la forme endothéliale de la synthétase de l'oxyde nitrique (NOS3) qui contribue à la réponse physiologique [49]. Il est donc possible que certaines conditions pathologiques, suite à l'effet fibrotique du TGF- β 1 aboutissent à la pathologie rénale.

1.4 Modèles principaux de l'hypertension artérielle et du syndrome métabolique

Il est souvent difficile d'étudier les mécanismes pathophysiologiques des maladies chez l'être humain. En plus de pouvoir soulever certaines questions d'ordre éthique, la longévité, la grande hétérogénéité génétique, la diversité du mode de vie présentent des défis au niveau de l'acquisition et de la reproductibilité des résultats. Les populations fondatrices, notamment des familles au Saguenay Lac St-Jean, qui ont l'avantage d'être plus uniformes, présentent un potentiel de recherche unique en génétique [12;50]. La nature polygénique et pléiotropique de l'hypertension implique d'une part que plus d'un gène contribue au même phénotype et d'autre part qu'un gène peut contribuer à plusieurs phénotypes (pléiotropie). Les gènes peuvent être aussi de faible pénétrance, c'est-à-dire que chaque gène a en soi un

effet très faible sur le phénotype et que la variance de ce phénotype est déterminée par la contribution d'une centaine de variantes génétiques. C'est le cas par exemple pour les gènes de susceptibilité au diabète de type 2, dont certains bien que confirmés dans plusieurs populations et études, ne contribuent qu'à un maximum de 3% à ce trait. L'espèce animale la plus employée comme modèle de recherche pour l'hypertension est le rat. Depuis 2004, le génome du rat est séquencé à plus de 90% (Rat Genome Database) et beaucoup de données physiologiques sont disponibles. Les animaux de laboratoire ont comme avantage d'avoir une longévité plus courte que celle de l'humain et il est plus facile de contrôler l'influence de l'environnement. Le rat spontanément hypertendu et le rat Dahl sensible au sel (DSS) sont les modèles naturels les plus couramment utilisés par les chercheurs puisqu'ils développent l'hypertension de façon spontanée (SHR) ou encore après une diète élevée en sel (DSS).

1.4.1 Le rat spontanément hypertendu (SHR)

La souche consanguine SHR, dérivée à l'origine de la souche de rat Wistar Kyoto, est un modèle non-obèse mais qui présente une certaine résistance à l'insuline et de l'hypertension [51]. Tous les rats SHR deviennent hypertendus lorsqu'ils sont âgés entre 7 et 15 semaines et la pression moyenne atteint chez les mâles adultes environ 200 mmHg [52, 53]. La résistance vasculaire périphérique de SHR est augmentée et cela découlerait d'un trouble de régulation au niveau du système nerveux central [53]. Une diète riche en calcium ou pauvre en vitamine E serait bénéfique pour les rats SHR [54, 55]. De plus, une diète riche en sodium (8%) augmente l'hypertension chez le rat SHR, et chez la souche SS.BN13, une consanguine du rat DSS qui possède le chromosome 13 du rat normotendu BN [10] mais à un degré moindre que le rat DSS [56]. Autre fait intéressant, l'élévation de

la pression artérielle serait un phénomène indépendant du système RAAS, puisque les niveaux plasmatiques de rénine et d'aldostérone ne sont pas augmentés chez le rat SHR [57].

1.4.2 Le rat Dahl sensible au sel (DSS, S)

Le Dr. John P. Rapp a développé la souche consanguine DSS qui dérive de la souche Sprague-Dawley. C'est un modèle génétique d'hypertension sensible au sel et après 4 semaines de diète 8% NaCl, les rats deviennent hypertendus [58]. Des lésions rénales et vasculaires sont présentes et ces rats meurent après 8 semaines de diète [58]. La sensibilité au sel pourrait être due, au moins en partie, à un défaut du système de l'oxyde nitrique puisque la production médullaire de NO est beaucoup plus faible sur une diète riche en sel [59]. Certains facteurs de risque du syndrome métabolique ont également été caractérisés sur une diète riche en sel, incluant la néphropathie, la résistance à l'insuline et l'hypercholestérolémie [49, 6, 60]. De plus, le rat DSS présente une hypertrophie cardiaque et est plus susceptible à la défaillance cardiaque [61, 62, 63].

Lorsque les rats DSS sont nourris avec une diète faible en sel, les rats deviennent hypertendus après 8 semaines alors que le rat Dahl résistant (DR) demeure normotendu [64]. Les différences au niveau de la physiologie de l'hypertension entre le rat DSS et la souche DR sont très intéressantes pour l'identification des gènes pro-hypertensifs et des loci de caractère chez le rat DSS hypertendu. Des études de liaison ont permis l'identification de QTL dans les chromosomes 1-3, 5, 7-10, 13 et 15-18 du rat DSS hypertendu [65]. Cependant, un QTL contient un nombre important de gènes et il est nécessaire d'établir des lignées de souches congéniques pour identifier et préciser l'effet du

gène candidat par rapport au trait quantitatif. L'intérêt du rat DSS comme modèle d'étude découle du fait que cette souche a une hyporéactivité aux effets natriurétiques et diurétiques de l'ANP suggérant une anomalie au niveau de GCA [4]. Le rat DSS est également un modèle d'hypertension sensible au sel. Certaines des souches congéniques du chromosome 2 (C2SM9 et C2SM12) développées par notre collaborateur Dr Deng sont idéales pour étudier le récepteur de l'ANP dans l'hypertension sensible au sel chez le rat DSS. Les caractéristiques génétiques de ces souches sont décrites à la section 1.5.

1.4.3 Les souches congéniques du chromosome 2

Par définition, une souche congénique possède le génome entier d'une souche parentale, par exemple le rat DSS hypertendu mais un segment chromosomique a été substitué par celui d'une autre souche, par exemple le rat Milan normotendu (MNS). De telles lignées de souches congéniques sont établies par des croisements successifs et criblage pour la région d'intérêt avec des marqueurs génétiques. La caractérisation phénotypique de ces souches par rapport à la souche parentale permet d'identifier des phénotypes qui sont la conséquence de la substitution du segment chromosomique.

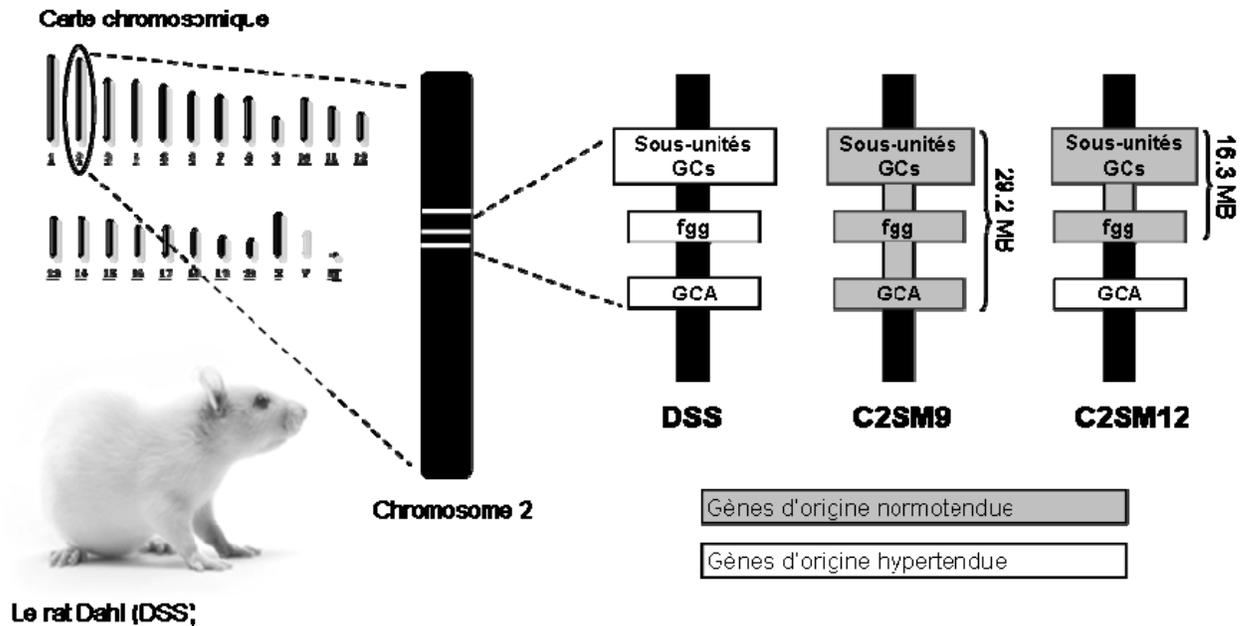


Figure 3 : Illustration de la provenance des principaux gènes candidats dans les souches congéniques SM9 et SM12 et la souche parentale DSS

Notre collaborateur, Dr Alan Deng, a élaboré plusieurs souches congéniques dans une région du chromosome 2 qui contient le C2QTL [66]. C2SM9 et C2SM12 sont des souches congéniques qui contiennent respectivement un court segment de 29,2 mégabases (MB) et 16,3 MB du chromosome 2. Dans ces segments, sont présents le fibrinogène gamma (fgg) et le récepteur du peptide auriculaire natriurétique (GCA). Des analyses de la pression moyenne par télémétrie ont révélé que sur une diète à teneur élevée en sel (2% NaCl), la souche C2SM9 avait une pression moyenne significativement plus basse que celle de DSS [66]. Puisque la pression de la souche C2SM12 n'était pas significativement différente de DSS, les gènes correspondants aux sous-unités α et β de la guanylate cyclase soluble 1 (GCs α 1 et GCs β 1) ont été exclus comme étant des gènes candidats de l'hypertension sur cette diète [66]. La masse du cœur, du ventricule gauche et des reins normalisés par la

masse corporelle de ces rats étaient toutes différentes de DSS après la diète riche en sel [67]. Des résultats de notre groupe [Morin E et coll, résultats non-publiés], ont montré que la souche C2SM9 avait une tolérance au glucose (test OGTT) et un indice HOMA-IR (résistance à l'insuline) plus élevés que DSS après une diète riche en gras et en sucrose (HFLS) et ce, malgré aucune différence entre les souches sur la diète normale. Ces résultats montrent que le métabolisme des glucides chez C2SM9 est diminué par le segment d'origine normotendue.

1.5 Gènes candidats inclus dans le segment chromosomique

C2SM9 contient un segment d'origine normotendue plus long que C2SM12. La comparaison entre les gènes candidats d'origine normotendue ou hypertendue, avec l'aide des données physiologiques ainsi qu'une revue de la littérature portant sur la caractérisation des gènes candidats, permettra de mieux cerner les composantes génétiques impliquées dans ces phénotypes. Tel qu'indiqué sur le schéma (Figure 3), la souche C2SM9 possède les trois principaux gènes candidats de l'hypertension de provenance normotendue : le récepteur de l'ANP, le fibrinogène gamma et le récepteur du NO. La principale différence génétique entre C2SM9 et C2SM12 est au niveau de GCA. En effet, C2SM12 possède le gène d'origine de la souche hypertendue (DSS) alors C2SM9 a celui d'origine normotendue (MNS). L'intérêt de cette étude découle de la comparaison entre les souches pour déterminer précisément l'effet du (des) gène(s) candidat(s) sur les phénotypes observés. Outre ces trois gènes candidats, d'autres gènes sont présents dans le segment chromosomique. Une analyse approfondie des gènes inclus dans le segment chromosomique a permis d'identifier ceux qui pourraient modifier les phénotypes observés. Ces gènes sont présentés (Figure 22) à titre indicatif puisque les connaissances actuelles

n'ont pas permis de caractériser ces gènes comme étant candidat pour les traits de caractère étudié. Ces gènes ont été sélectionnés selon leur fonction potentielle sur le métabolisme des lipides, la fonction rénale ou la fonction cardiaque. Il n'est cependant pas à exclure que de nouvelles percées dans le domaine, qu'une meilleure connaissance des voies de signalisation cellulaire ou que la caractérisation de protéines dont les fonctions demeurent à ce jour inconnues, modifient l'interprétation de ces résultats. Nous nous sommes concentrés sur l'étude des 3 gènes candidats de l'hypertension présents dans ce segment soit GCA, fgg/fgb/fga et GCs.

1.5.1 Le récepteur du peptide auriculaire natriurétique (GCA/Npr1/NprA)

Plusieurs acronymes existent pour définir le récepteur de l'ANP : GCA, Npr1 et NprA. L'abréviation GCA est la contraction du terme anglais « **guanylyl cyclase A** » pour faire référence à son activité enzymatique. La nomination de Npr1 ou NprA est utilisé pour mettre en évidence sa fonction de récepteur des peptides natriurétiques, de l'anglais « **Natriuretic peptide receptor** ». L'indication de la lettre A ou du chiffre 1 est employé pour distinguer les 3 isoformes existantes et qui ont une affinité différente pour les trois ligands de cette famille de récepteur. Le gène de GCA est situé sur le chromosome 2 du rat, il s'agit du gène candidat principal pour les rats DSS congéniques dans cette étude.

1.5.1.1 Importance physiologique de GCA

Tel qu'il le sera détaillé dans les prochains paragraphes, les mécanismes de régulation du système du peptide natriurétique sont nombreux et interviennent à différents niveaux. Ceci reflète bien l'importance de ce système au niveau de la physiologie des systèmes cardiovasculaire et rénal. Il est vrai que l'action de GCA est importante 1) pour la régulation de la pression sanguine et de la volémie. Outre ces actions, l'ANP a également

un effet direct 2) sur la diurèse (élimination urinaire) et la natriurèse (teneur en sodium dans l'urine), 3) sur la vasodilatation et le remodelage vasculaire, 4) sur l'hypertrophie cardiaque et la fibrose, et tout récemment 5) sur le métabolisme du tissu adipeux. Tous ces mécanismes sont étroitement reliés entre eux mais également à d'autres systèmes (tel qu'abordé précédemment), de manière à permettre un contrôle optimal de la pression dans toutes les situations afin de maintenir l'homéostasie [68].

1.5.1.2 Effet sur régulation de la pression sanguine et de la volémie

Le système de l'ANP a une forte action hypotensive résultant de l'effet cumulatif de son action sur le volume intra-vasculaire, la natriurèse, la diurèse et finalement de par son action directe sur la vasodilatation. En premier lieu, l'ANP augmente l'excrétion des électrolytes et de l'eau dans l'urine [4]. Pour ce faire, l'ANP agit sur les tubules contournés proximaux et les tubules collecteurs en réduisant leur capacité de réabsorber l'eau et le sodium. D'autre part l'ANP inhibe le système RAAS en inhibant directement la synthèse et la libération de rénine et d'aldostérone. L'ANP inhibe le transport du cholestérol (précurseur de l'aldostérone) à la mitochondrie [69]. De sorte, la biosynthèse d'aldostérone est inhibée au niveau de son précurseur [69]. Ensuite, l'ANP inhibe la sécrétion de rénine par une voie impliquant des protéines kinases de type II dépendantes de la forme cyclique de la guanosine monophosphate (GMPC) [70]. Puisque le système RAAS a des effets physiologiques opposés à celui de l'ANP, son inhibition est nécessaire à la coordination du système. L'ANP a également un effet hypotenseur et hypovolémique en permettant la vasodilatation des cellules du muscle lisse et en régulant par plusieurs mécanismes la diurèse et la natriurèse. L'implication de GCA dans la physiopathologie de l'hypertension est soutenue par des expériences dans lesquelles des souris KO pour GCA

développaient l'hypertension [4]. Dans ces souris déficiente en GCA, la diurèse et la natriurèse normalement stimulées par une expansion volumique sont complètement abolies [4]. Ceci souligne l'importance de GCA dans le mécanisme de l'hypertension.

1.5.1.3 Effet sur la diurèse et la natriurèse

À ce jour, trois mécanismes, ayant tous en commun le GMPc comme effecteur, ont été caractérisés pour expliquer l'effet natriurétique et diurétique de l'ANP [71]. Premièrement, la stimulation de GCA au niveau glomérulaire, augmente la vasodilatation des artères pré-glomérulaires et stimule la vasoconstriction des artères efférentes [72, 73]. Ceci a pour conséquence d'élever la pression dans les capillaires du glomérule, ce qui engendre une augmentation du taux de filtration glomérulaire et une baisse de la réabsorption du sodium et de l'eau [74]. Deuxièmement, au niveau des tubules proximaux, le transport du sodium et de l'eau est inhibé par un mécanisme dépendant de la stimulation de GCA et médié par le GMPc. De plus, les canaux sodiques sensibles à l'amiloride présents dans les tubules collecteurs sont inhibés [75]. Finalement, au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire, la protéine kinase dépendante du GMPc (PKGII) est activée par GCA et la sécrétion de rénine est diminuée [76]. En somme, ces actions initiées par le système de l'ANP au niveau rénal stimulent la natriurèse et la diurèse.

1.5.1.4 Effet sur la vasodilatation

La protéine kinase dépendante du GMPc (PKGI) est activée lorsque l'ANP stimule l'activité guanylyl cyclase de GCA qui coordonne la vasodilatation des cellules musculaires lisses. En revanche, le calcium a un rôle important de second messager dans la régulation du tonus vasculaire. Lorsque le GMPc active la PKGI, celle-ci active un canal Ca^{2+}

/ATPase, un canal calcique du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et un canal potassique activé par le calcium (BK_{Ca}) qui éliminent le calcium du cytosol [74]. D'autre part, les canaux qui ont comme fonction de permettre l'entrée du calcium dans le milieu intracellulaire, sont inhibés. Globalement, la concentration de calcium intracellulaire est réduite à de très bas niveaux, ce qui réduit son interaction avec la calmoduline (CaMK) et contribue à inactiver la myosine qui ne peut désormais plus interagir avec l'actine. De plus, PKGI stimule la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP), ce qui contribue d'autant plus à inactiver la myosine [76]. Il y a donc relâchement du muscle lisse. Le processus est évidemment réversible et permet la contraction.

1.5.1.5 Effet sur l'hypertrophie cardiaque et la fibrose

La surexpression des gènes précurseurs de l'ANP et du brain natriuretic peptide (BNP) sont des marqueurs de l'hypertrophie cardiaque. Récemment, chez le rat DSS, une étude comparant 93 gènes a démontré que la surexpression de l'ANP dans le ventricule gauche indiquait une hypertrophie cardiaque décompensée en plus d'une insuffisance cardiaque et ce, contrairement à d'autres marqueurs de l'hypertrophie cardiaque [77]. De plus, des souris déficientes en GCA sont fortement hypertendues et sont atteintes d'hypertrophie cardiaque avec fibrose interstitielle [78]. Conséquemment, le système de l'ANP a une action anti-hypertrophique directe et indépendante de son action vasodilatatrice [79]. Des souris qui surexpriment GCA spécifiquement dans le cœur, avaient une faible expression d'ANP ventriculaire et des myocytes de taille réduite [79]. Il a été suggéré que la voie de signalisation ANP/GCA/GMPc inhiberait la voie calcineurine-NFAT pour prémunir le cœur d'un remodelage cardiaque excessif qui aboutirait à une insuffisance cardiaque [80]. Il a aussi été démontré que les fibroblastes exprimaient l'ARNm de GCA et de GCB et

qu'ils répondaient à une stimulation non seulement par l'ANP mais aussi par le BNP et le peptide natriurétique de type C (CNP) [81]. Les voies de signalisation de l'ANP serait également anti-fibrotique dans un contexte d'hypertrophie cardiaque [79].

1.5.1.2 Mécanisme de régulation de GCA

1.5.1.2.1 Régulation de l'expression génique de GCA

Le gène GCA a une taille de 17,5 kilobases (Kb) et il comprend 22 exons et 21 introns [82]. Ce gène est présent chez les eucaryotes de l'embranchement des cordés et des arthropodes. La boîte TATA, élément de reconnaissance par la protéine TBP (TATA binding protein) pour l'initiation de la transcription n'est pas présente dans le gène [83]. Une boîte CCAAT inversée ainsi que trois sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 permettent l'initiation de la transcription et ce, dans les deux sens [83]. La méthylation de cytosines spécifiques est un mécanisme de régulation de la transcription des gènes sous le contrôle de Sp1 [84], ce mécanisme épigénétique pourrait être envisageable pour la régulation de GCA. D'ailleurs, il a récemment été démontré que le facteur de transcription Ets-1 augmentait les niveaux de l'ARNm, de la protéine ainsi que de l'activité de GCA et que ce mécanisme de régulation de l'expression était inhibé par l'hyperméthylation du site de liaison de Ets-1 [85]. La séquence du promoteur comprend un élément de réponse au GMPc ainsi que des répétitions du dinucléotide TA [86]. Par son habileté à former différentes conformations d'ADN telles que l'ADN-Z, l'ADN-H ou l'ADN cruciforme, les répétitions TA peuvent influencer l'expression d'un gène [86]. La transfection de cellules fibroblastiques NIH 3T3 avec le promoteur de GCA sous le contrôle d'un gène rapporteur ont démontré que le nombre de répétitions TA était inversement proportionnelle avec l'activité luciférase [86]. Un élément de réponse au GMPc a été identifié dans le promoteur de GCA [87]. Des

analyses de sous-segments du promoteur de GCA ont également démontrés que des éléments de régulation positifs (entre -1396 et -1307) et négatifs (entre -1520 et -1396) étaient présents dans cette région [87]. De plus, notre groupe a récemment identifié une protéine de liaison pour cet élément de réponse au GMPc ayant une activité répressive sur la transcription du gène de GCA [68].

1.5.1.2.2 Régulation au niveau protéique de GCA

Il y a sept formes membranaires de guanylyl cyclase, dénommées GCA à GCG [4]. Cependant, seul GCA/NprA et GCB/NprB ont une affinité pour les peptides natriurétiques [4]. Le récepteur du peptide natriurétique C (NprC) ne possède pas de domaine avec activité guanylyl cyclase et joue le rôle de récepteur de clairance. Ce récepteur lie les 3 types de peptides natriurétiques (ANP, BNP et CNP) et il a un rôle important dans la régulation du système des peptides natriurétiques. L'expression de GCA est prédominante dans le rein, les surrénales, le tissu adipeux, le cœur, le muscle lisse vasculaire, le cerveau et les poumons [74]. Le domaine de liaison au ligand de GCA a une forte affinité pour l'ANP et le peptide natriurétique cérébral (BNP : brain natriuretic peptide). L'isoforme GCB, dont le ligand est le CNP, est plutôt exprimée dans les chondrocytes, le cerveau, les poumons, l'utérus et dans le muscle lisse vasculaire [74]. Le patron d'expression de la guanylyl cyclase ainsi que son rôle physiologique suggèrent que GCA est prédisposé à jouer un rôle important dans l'hypertension. D'autre part, il a été démontré par des analyses avec des ligands radioactifs que GCB est absent dans les vaisseaux pré-glomérulaires, les glomérules et les papilles rénales du rat [88]. GCA est une protéine dimérique ayant les domaines fonctionnels suivants : un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine juxtamembranaire kinase-like, un domaine transmembranaire, un domaine

intracellulaire de régulation dépendant de l' adénosine triphosphate (ATP) et un domaine à activité guanylyl cyclase [89]. Le domaine kinase-like de GCA est associé au complexe de chaperonnes HSP90 et P50 et permet la maturation ainsi que le repliement adéquat de la protéine [4]. Les modifications post-transcriptionnelles sont limitées à la glycosylation, la phosphorylation et la formation de ponts disulfures. La glycosylation se fait sur l'asparagine 13, 180, 306, 347 et 395. Certains auteurs prétendent que la glycosylation ne serait pas indispensable à la liaison de l'ANP puisqu'elle n'est pas affectée par un traitement par l'endoglycosidase F ou H [89] alors que d'autres affirment que la glycosylation serait nécessaire [74]. Il y a deux liaisons disulfures qui sont très conservées entre les récepteurs des peptides natriurétiques (PN) et qui joueraient un rôle critique. Le premier, cystéine (cys) 60-86 est localisé près du site de liaison du chlore et par conséquent, il pourrait jouer un rôle dans la liaison de l'ANP [89]. Le second, cystéine (Cys) 423-432 se situe au niveau de la séquence du motif de signalisation juxtamembranaire [89]. Lors de la liaison de l'ANP, ces domaines juxtamembranaires font une rotation de 24° qui pourrait être responsable d'un changement de configuration dans le domaine intracellulaire permettant l'activité guanylyl cyclase du récepteur [89]. Le domaine juxtamembranaire kinase-like est très similaire au domaine tyrosine kinase du récepteur au PDGF (platelet-derived growth factor). D'ailleurs, GCA possède 31 des 33 acides aminés invariables ou fortement conservés de la famille des protéines kinases [74]. Le motif de liaison à l'ATP GXXG est commun dans la majorité des protéines kinases et en ce qui concerne le domaine kinase-like de GCA, il contient une séquence similaire GRGSNYG. De plus, quatre résidus sérines et 2 résidus thréonines dans le domaine juxtamembranaire du récepteur de l'ANP sont phosphorylés lorsque celui-ci est exprimé dans les cellules épithéliales de reins (HEK 293) [74]. D'autre part, des études ont démontrées que la phosphorylation serait

conditionnelle à la transduction du signal et à l'activation hormonale optimale de GCA [74]. Des études de mutagenèse ont démontrées que la substitution par une alanine d'un minimum de 4 de ces sites de phosphorylation empêchait GCA de répondre à la stimulation par l'ANP [74].

1.5.1.2.3 Activation de GCA

De la même façon que de nombreux récepteurs, le contrôle de l'activité peut se faire par plusieurs mécanismes tels que les modifications post-traductionnelles et permet au récepteur de passer à travers différents états : basal, actif et désensibilisé. Ainsi, GCA à l'état basal est sous forme d'oligomères et est phosphorylé sur 5 ou 6 des sites du domaine kinase-like décrits précédemment. Il serait possible que la phosphorylation le prépare à la liaison de son ligand. En effet, une étude a démontré que les récepteurs dont le domaine kinase-like était absent, étaient constitutivement actifs [74]. De plus, la liaison de l'ATP sur le domaine kinase-like est requise pour l'activation de GCA. L'utilisation d'un analogue non-hydrolysable de l'ATP a permis de démontrer que la fonction de l'ATP n'était pas de fournir une source de phosphate mais bien de se lier sur GCA directement ou à l'aide d'un intermédiaire protéique pour la stabiliser [74]. Lorsque le ligand se lie, des modifications conformationnelles surviennent ce qui rassemble le domaine juxtamembranaire de deux monomères et la transduction du signal à travers de la membrane. À ce moment-ci, l'activité du récepteur GCA est maximale ce qui se reflète par une augmentation de la synthèse de GMPc. Pour interrompre l'activité du récepteur, la déphosphorylation désensibilise le récepteur GCA. L'inhibition de l'activité de phosphorylation serait à l'origine de l'augmentation de la déphosphorylation de GCA. De plus, il semblerait que l'augmentation de GMPc par d'autres protéines à activité guanylyl cyclase n'inhiberait pas

l'activité de GCA [74]. Pour retrouver son activité basale, le peptide natriurétique doit être libéré et ses sites re-phosphorylés.

1.5.1.2.4 Inhibition de GCA

L'angiotensine II, l'hormone anti-diurétique, le PDGF, l'endothéline, l'acide lysophosphatidique et le sphingosine-1-phosphate stimulent la vasoconstriction, favorisent la prolifération ou la croissance cellulaire et inhibent tous l'activité de GCA. Il y a interaction au niveau moléculaire entre ces voies car elles convergent en activant la phospholipase C qui produit les seconds messagers : inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). D'une part, lorsque l'IP3 se lie sur son récepteur du réticulum sarcoplasmique, cela engendre une libération de calcium dans le cytosol qui a été associée avec la désensibilisation des récepteurs des PN mais le mécanisme précis demeure inconnu [90]. La CaMK, une protéine qui peut s'associer au calcium pourrait être impliquée dans le mécanisme de désensibilisation. La protéine kinase dépendante du calcium et dont l'activité dépend de la CaMK est impliquée dans le contrôle de l'hypertrophie et de la défaillance cardiaque [91]. Des souris KO du gène GCA surexpriment CaMK, ce qui suggère que celle-ci serait impliquée dans l'hypertrophie qui survient en réponse à une perte d'activité de GCA [91]. D'autre part, la liaison du DAG active la protéine kinase C (PKC). Une expérience avec un activateur pharmacologique de PKC a provoqué la baisse du niveau de GMPc en réponse à la stimulation hormonale [74]. Cette baisse de l'activité de GCA a été corrélée avec la déphosphorylation des sites du domaine kinase-like. En d'autres termes, PKC inhibe l'activité de GCA par un mécanisme de désensibilisation hétérologue.

1.5.1.2.5 Internalisation et dégradation de GCA

Il est actuellement controversé de prétendre que la régulation de GCA peut se faire par internalisation et dégradation [74]. Toutefois, il est généralement accepté que NprC est internalisé et recyclé à la membrane. Certains auteurs prétendent que la liaison de l'ANP à son récepteur stimule son internalisation et sa dégradation dans différentes lignées cellulaires dont Leydig, Cos, 293, PC-12 alors que d'autres études ne parviennent pas à le démontrer [74]. Une faible activité pour GCA/NprA pourrait être à l'origine d'une confusion entre NprC et GCA.

1.5.1.2.6 Les ligands de GCA

Il existe trois types de peptides natriurétiques : ANP, BNP et CNP. Cependant, seul l'ANP et le BNP sont des ligands de GCA/NprA et peuvent le lier de manière équivalente. Il s'agit d'hormones peptidiques qui sont synthétisées à partir de pré-pro-hormones. La forme active de l'hormone est finement contrôlée et produit des peptides entre 22 et 32 acides aminés [92]. Outre les fonctions physiologiques reliées à la liaison de leur récepteur GCA/NprA, les peptides natriurétiques sont des marqueurs d'hypertrophie cellulaire. L'expression de l'ANP est prédominante dans les myocytes des oreillettes alors que le BNP est plutôt exprimé dans le ventricule. Comme l'origine de son appellation le laisse supposer, le BNP (Brain natriuretic peptide) est également exprimé dans le cerveau de certains animaux, tels que le porc où il a été isolé mais il est absent du cerveau du rat. En physiologie cardiaque, la sécrétion de l'ANP survient principalement en réponse à un étirement de l'oreillette droite mais également lors d'une stimulation sympathique des récepteurs β -adrénergiques, à une hypernatrémie (taux élevé de sodium dans le sang) et finalement à des hormones pro-vasoconstrictrices telles que l'angiotensine II et l'endothéline. La fonction du BNP est très

similaire à celle de l'ANP à la différence de la demi-vie qui est plus longue pour le BNP. L'urodilatine est produit par le rein et a les mêmes fonctions physiologiques que l'ANP [4]. Les endopeptidases neutres (NEP), régulent l'activité des PN en les dégradant. Le récepteur de clairance NprC ne possède aucune activité guanylyl cyclase et lorsqu'il est lié à l'un de ses ligands, il est internalisé et le peptide natriurétique est dégradé suite à la fusion d'un lysosome.

1.5.2 Le récepteur GCs

Le récepteur du NO, la guanylate cyclase soluble (GCs) a un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et dans la balance sodique. GCs est un hétérodimère α/β qui est formé par la combinaison des différentes sous-unités α_1 , α_2 , β_1 et β_2 . L'hétérodimère α_1/β_1 , dont les sous-unités sont situées sur le chromosome 2, est considéré comme la forme universelle. D'autre part, l'hétérodimère universel serait plus actif et sensible au NO que l'hétérodimère α_2/β_1 [93]. GCs a une activité guanylate cyclase et lorsqu'il est stimulé, il catalyse la formation du second messager GMPC à partir de guanosine triphosphate (GTP). L'ARNm de GCs a été détecté dans plusieurs régions anatomiques dont le rein et le cœur [93]. GCA et sGC ont donc des actions physiologiques compatibles et complémentaires et les voies de signalisation cellulaire convergent au niveau du GMPC.

1.5.2.1 Importance physiologique du système de l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique est synthétisé à partir de L-arginine par des synthétases d'oxyde nitrique qui peuvent être constitutives (par exemple NOS1 ou NOS3) ou inductibles (NOS2). L'injection intraveineuse de L-arginine induit une baisse de pression chez le rat DSS sur

une diète riche en sel (8% NaCl) alors qu'aucun effet n'est observé chez le rat SHR ou chez le rat DSS sur une diète faible en sel (0,3% NaCl) [94]. Il est possible qu'une production insuffisante de NO soit reliée à la mauvaise réabsorption du sodium dans les tubules rénaux et ceci serait impliqué dans la physiopathologie du rat DSS sur une diète riche en sel. En plus de favoriser la baisse de la pression, la voie NO/GCs/GMPc est vasodilatatrice et natriurétique [93]. Il est possible que cet effet soit dû au NO qui inhiberait le transport du sodium en inhibant la pompe Na⁺/K⁺ ATPase, l'échangeur de Na/H dans les tubules proximaux et le transport de sodium dans le tube collecteur au niveau du cortex [93]. Le système de l'oxyde nitrique a donc un rôle dans la régulation de la pression artérielle et pourrait être impliqué dans les mécanismes de la pathologie de l'hypertension.

1.5.2.2 Stress oxydatif et oxyde nitrique

Il a été suggéré que le stress oxydatif serait impliqué dans plusieurs formes d'hypertension [95]. Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle par la production de substances vasodilatatrices (NO, prostacycline PGI₂ et le facteur hyperpolarisant EDHF) et des facteurs contractants et qui favorisent la croissance cellulaire (thromboxane A₂, endothéline-1, angiotensine II et la prostaglandine H₂). Un déséquilibre entre ces facteurs pourrait être à l'origine entre autre de l'athérosclérose et de l'agrégation plaquettaire. De plus, une dérégulation de l'endothélium, caractérisée par une baisse de la biodisponibilité du NO est un facteur de risque connu pour l'hypertension et les maladies cardiovasculaires [96]. L'interaction du NO avec des radicaux libres tel que l'anion superoxyde O₂⁻, génère des peroxy-nitrites dont l'effet est cytotoxique. Il est intéressant de noter que des antioxydants tels que les polyphénols du vin rouge sont bénéfiques pour le système cardiovasculaire notamment par leur effet sur l'augmentation de

l'activité de NOS [97]. Tel que mentionné précédemment, le stress chronique, particulièrement important dans nos sociétés modernes pourrait être un facteur environnemental de l'hypertension artérielle. Une réduction de la biodisponibilité du NO semble être une autre conséquence du stress [96].

1.5.3 Le polypeptide gamma du fibrinogène (fgg)

Le fibrinogène est une glycoprotéine complexe composée de 3 polypeptides : alpha (fga), bêta (fgb) et gamma (fgg). Sa synthèse se fait dans les hépatocytes et le fibrinogène et ses 3 polypeptides sont reliés par de nombreux ponts disulfures. Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène soluble est transformé en fibrine insoluble pour permettre la coagulation sanguine.

1.5.3.1 Implication de fgg dans les maladies cardiovasculaires

Certains SNP (single nucleotide polymorphism) dans les gènes des chaînes de fibrinogène sont associés à une hausse des niveaux sanguins [98]. Le polymorphisme dans le gène fgg 10034 C/T est associé à l'augmentation de 2,4 fois du risque de thrombose veineuse profonde. Cette allèle, dite H2, est caractérisée par un épissage alternatif produisant une variante dite, fibrinogène γ' qui possède à la fois des propriétés pro-thrombotique et anti-thrombotique selon l'épissage [98, 99]. Les niveaux de fibrinogène γ' seraient influencés par les processus physiologiques : élevés lors de la phase aiguë de l'ACV ischémique mais réduits dans la phase de récupération [99]. L'haplotype H3 de fgg 9340 T/C est associé à un risque moindre d'ACV ischémique. Une étude indique que les haplotypes H2 et H3 de fgg sont corrélés avec une variation du fibrinogène total et un risque accru d'infarctus du myocarde alors que qu'une autre étude affirme le contraire [98, 100]. La différence entre

ces résultats pourrait être la conséquence de l'étude de populations différentes. Rotterdam est une étude d'association prospective menée dans les Pays-Bas par Dr Albert Hofman et qui comprend 6275 patients initialement âgés de 55 ans et plus qui a démontré que la combinaison des haplotypes H3 de fgg et fga était associée à l'ACV et que la prévalence était supérieure que si la variante était présente dans seulement l'une des formes des polypeptides [99].

1.6 Hypothèses et objectifs de recherche

Hypothèses générales :

(1) Une différence génétique dans le gène du récepteur du peptide natriurétique auriculaire (GCA) entre la forme normotendue (SM9) et hypertendue (DSS, SM12) est responsable des différences entre ces souches. Nous croyons que la souche SM9 aura certains phénotypes améliorés en lien avec l'hypertension artérielle (réduction de la pression artérielle, amélioration de la fonction rénale et cardiaque) vis-à-vis la souche parentale DSS et la souche congénique SM12. La souche SM12 pourrait avoir un phénotype amélioré mais intermédiaire à DSS et SM9.

(2) La composante lipidique et/ou sodique de la diète influence différemment la fonction rénale, cardiaque ainsi que les paramètres anthropométrique des rats DSS et de ses souches congéniques. Il est à prévoir qu'une diète plus riche en gras et/ou en sel, accentuera les phénotypes de l'hypertension et du syndrome métabolique. Malgré que la teneur en sodium des diètes soit faible, nous pensons observer des effets du au caractère de sensibilité au sel de la souche étudié.

Les objectifs de cette recherche sont :

(1) Déterminer l'effet de la composante lipidique et sodique des diètes sur les fonctions rénale, cardiaque ainsi que sur les paramètres anthropométriques et lipidiques. Nous croyons que l'effet du sel sera particulièrement important pour les fonctions rénales et cardiaques chez le rat DSS sensible au sel. De plus, la diète riche en gras sera néfaste en premier lieu pour les paramètres anthropométriques mais également pour la fonction rénale et cardiaque.

(2) Comparer la réponse physiologique des souches congéniques SM9 et SM12 entre elles et par rapport à la souche parentale DSS et évaluer l'implication du gène candidat principal : le récepteur du peptide natriurétique auriculaire. Nous souhaitons observer une amélioration partielle des phénotypes chez la souche congénique SM9 qui contient GCA originant d'une souche normotendue. Nous souhaitons démontrer que GCA a une influence certaine sur l'hypertension mais il est à prévoir que d'autres gènes sont impliqués dans la pathophysiologie de l'hypertension. Les différences entre les souches SM9 et SM12 nous permettra de démontrer l'effet de d'autres gènes inclus dans le segment du C2QTL.

(3) Expliquer les mécanismes physiologiques menant à une baisse de pression pour la souche SM9 par rapport aux souches SM12 et DSS. Nous espérons démontrer une anomalie au niveau de la régulation génétique ou de l'activité de GCA qui serait en partie responsable de la pression élevée de DSS.

2. Matériel et méthode

2.1 Animaux et protocoles expérimentaux

Les souches congéniques C2SM9 et C2SM12 et la souche parentale DSS ont été divisées en plusieurs groupes : selon le protocole expérimental attribué soit « Télémétrie » ou « Cages métaboliques » et selon l'une des 4 diètes étudiées. Les protocoles expérimentaux suivent les normes du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et ont été approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) du Centre de recherche du CHUM. L'élevage a été réalisé au Centre écogénomique des maladies complexes du CRCHUM au Technopôle Angus. Les souches de rats DSS et les congéniques SM9 et SM12 ont été obtenues de notre collaborateur Dr Alan Deng. Des rats mâles uniquement ont été utilisés dans le cadre de ces travaux pour éviter l'influence des hormones féminines (ex : œstrogène, progestérone) sur le système rénine-angiotensine-aldostérone et sur l'endothélium qui pourraient être à l'origine de différents mécanismes physiopathologiques de l'hypertension. Âgés de 4 semaines, les rats mâles ont été gardés sous un cycle de lumière/obscurité de 12 heures/12h avec un libre accès à l'eau et à la diète normale. La pesée hebdomadaire a permis de faire le suivi de la croissance des rats pendant la durée de l'étude. À 14 semaines, les groupes de rats ont été subdivisés et l'une des diètes suivantes leur a été attribuée : diète riche en gras et faible en sel (HFSL), riche en gras et sel normal (HFNS), faible en sel (NFLS) ou la diète normale (NFNS). Initialement, seules les diètes HFSL et NFNS ont été employées. Ayant débuté l'analyse des résultats, nous avons constaté qu'en plus des matières grasses, le sel pouvait également avoir un impact sur les résultats. Ainsi pour permettre une analyse rigoureuse des résultats, nous avons ajouté les deux diètes contrôles pour la concentration de sel : NFLS et HFNS. La composition exacte

des diètes est mentionnée ci-dessous (tableau 3). La consommation de nourriture a été calculée pendant 4 semaines, soit la durée totale de la diète puis, les rats ont été sacrifiés.

Information nutritionnelles	HFLS « Normal Fat Low Salt »	HFNS « High Fat Normal Salt »	NFLS « Normal Fat Low Salt »	NFNS « Normal Fat Normal Salt »
Fournisseur #cat	Bioserv #F3282	Bioserv #F5756	Teklad TD.08494	Teklad 2018/2918
Calories (kcal/g)	5,3	5,3	3,1	3,3
Protéines (%cal)	16,16	16,16	~23	23
Lipides (%cal)	59,36	59,36	~17	17
Saturés (g/kg)	142,34	142,34	~9,6	9,6
acide stéarique (g/kg)	44,10	44,10	~1,5	1,5
acide palmitique (g/kg)	88,91	88,91	~7,6	7,6
acide myristique (g/kg)	5,38	5,38	~0	0
Mono-insaturé (g/kg)	178,53	178,53	~12,8	12,8
acide oléique (g/kg)	161,68	161,68	~12,6	12,6
Poly-insaturés (g/kg)	37,28	37,28	~34,1	34,1
Glucides (%cal)	24,48	24,48	~60	60
Sodium (%)	0,057	0,23	~0,04-0,08	0,23
Cholestérol (g/kg)	0,90	0,90	~0	0

Tableau 3 : Information nutritionnelle détaillée des diètes (HFNS, HFLS, NFLS, NFNS) utilisées dans le protocole expérimental. Kilogramme (Kg)

2.1.1 Protocole Télémétrie

Des transducteurs radiotélémetriques (Data Sciences international, TA11PA-C40), ont été insérés à 12 semaines dans la cavité abdominale inférieure et reliés à des cathéters implantés dans l'artère fémorale. Un analgésique, la buprénorphine (0,05g mg/Kg), a été administré pendant 2 jours et des soins postopératoires ont été effectués pendant 10 jours afin de permettre la récupération des animaux. Les pressions sanguines systoliques, diastoliques et moyennes ainsi que le rythme cardiaque et l'activité ont été enregistrés (Data Sciences international, Dataquest A.R.T. 2.3) à la fin de la diète, sous condition de jeûne.

2.1.2 Protocole Cages métaboliques

2.1.2.1 Composition corporelle

L'analyseur de la composition corporelle par résonance magnétique (Echo Medical Systems, EchoMRI-900™) a été employé avant le début de la diète et au sacrifice afin de déterminer l'évolution de la masse grasse et de la masse maigre pendant le protocole. Les données obtenues ont été corrigées par la masse corporelle des animaux.

2.1.2.2 Réponse à l'effet natriurétique et diurétique de l'ANP

Sous jeûne, un gavage avec un volume d'eau correspondant à 5% de la masse corporelle du rat a été effectué. Par la suite, les rats sont transférés dans des cages métaboliques, avec privation de nourriture et d'eau, pour la récolte de l'urine. Quarante minutes après le gavage et sous anesthésie légère (isoflurane 4% et oxygène 1,5%), une injection intraveineuse d'ANP (Bachem; #H-2100; 1 µg/400µl) ou de saline physiologique (contrôle basal) a été effectuée [101, 102]. Le volume d'urine est noté et des échantillons sont prélevés 40 et 60 minutes après l'injection. Pour vider complètement la vessie des animaux, une légère pression a été effectuée dans la région suprapubienne à la fin de chacun des intervalles. L'urine a été envoyée au département de biochimie du CHUM pour les analytes urinaires (Na, K).

2.1.2.3 Dosages biochimiques des fluides

2.1.2.3.1 Cages métaboliques 24 heures

Les rats ont été placés dans des cages métaboliques individuelles pendant une période de 24h, sans nourriture [15]. La consommation d'eau, le volume urinaire ainsi que son analyse

ont été effectués (Na, K, Cl, créatinine, Ca, phosphore, protéine, urée). La masse corporelle fut déterminée avant et après les cages métaboliques.

2.1.2.3.2 Clairance de la créatinine

La veille du sacrifice, les rats furent placés dans les cages métaboliques pour une durée d'environ 18 heures (1080 minutes) sans nourriture mais avec libre accès à l'eau. La consommation d'eau et le volume urinaire ont été mesurés puis le dosage de la créatinine urinaire a été effectué. Finalement, les rats sont sacrifiés et le sérum est récolté après la centrifugation du sang (2800g, 10 min, T°pièce) et conservé à -35°C. Le dosage de la créatinine est effectué pour obtenir la valeur de la clairance de la créatinine (CCR) calculée selon la formule ci-dessous :

$$\text{CCR (ml/min)} = \frac{\text{Créatinine urinaire } (\mu\text{mole/L}) * \text{Volume urine (ml)}}{\text{Créatinine sérique } (\mu\text{mole/L}) * \text{temps de collecte (min)}}$$

Le dosage de la créatinine urinaire et sérique a été effectué par les laboratoires de biochimie du CHUM. L'analyse complète du sérum a été effectuée par les laboratoires de l'Université McGill (Animal Resources Centre). L'analyse du bilan lipidique du sérum (HDL, LDL, cholestérol) et le dosage de l'aldostérone sérique ont été mesurés par les laboratoires de biochimie du CHUM.

2.1.2.4 Sacrifice

Les rats ont été sacrifiés à 19 semaines par décapitation sous anesthésie avec 4% d'isoflurane. Les tissus suivants ont été prélevés et pesés : le tissu adipeux rétropéritonéal, les reins droit et gauche (séparation du cortex), les surrénales, l'aorte, le foie, le cœur, (ventricules, oreillettes), les poumons, le cerveau, le pancréas et les intestins. Les organes

ont été congelés rapidement dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Certains de ces tissus ont été utilisés pour déterminer l'expression des gènes, analyse histologique ou encore pour mesurer la production de GMPc en réponse à l'ANP dans les glomérules isolés.

2.1.2.5 Histologie

Un demi-rein droit et une section des ventricules droit et gauche au niveau des cavités ventriculaires ont été fixés avec une solution de paraformaldéhyde 4% tamponnée. Les échantillons furent envoyés à l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie de l'Université de Montréal (IRIC) pour traitement des échantillons. **Histologie du rein :** Une coloration histochimique avec l'hématoxyline-éosine a été effectuée sur les coupes de rein. Le pathologiste Dr Louis Gaboury (IRIC) a effectué une analyse histopathologique à l'aveugle. Vingt et un paramètres, regroupés en 5 catégories (glomérules, tubules, pelvis et fornix, vaisseaux et espace interstitiel) ont été évalués semi-quantitativement et des lésions représentatives ont été photographiées. **Histologie du cœur :** Une coloration histochimique avec le trichrome de Masson a été effectuée sur les coupes de rein pour l'analyse de l'hypertrophie cardiaque.

2.1.2.5.2.1 Analyse morphométrique

La fonction de mesure du logiciel Image J version 1.38x (conçu par Wayne Rasband du NIH) a été calibré à l'aide d'une échelle millimétrique et a permis de déterminer les aires de section et la longueur des segments d'intérêt. L'aire de la cavité des ventricules droit et gauche, l'aire du tissu des ventricules droit et gauche ont été mesurées (voir la figure 5). Au niveau cellulaire, l'aire de section des myocytes dans le tissu subépicardique et

subendocardique a été déterminée. Finalement, l'épaisseur de la paroi des ventricules droit et gauche a été mesurée.

2.1.2.5.2.2 Quantification de la fibrose

Des photos représentatives (n=5 par zone) dans le tissu subépicardique, subendocardique et midmyocardique ont été échantillonnées. La quantification de la fibrose a été effectuée avec le logiciel Photoshop tel que décrit précédemment [103]. L'indice de fibrose a été déterminé comme étant l'aire de la fibrose divisée par l'aire totale de l'image.

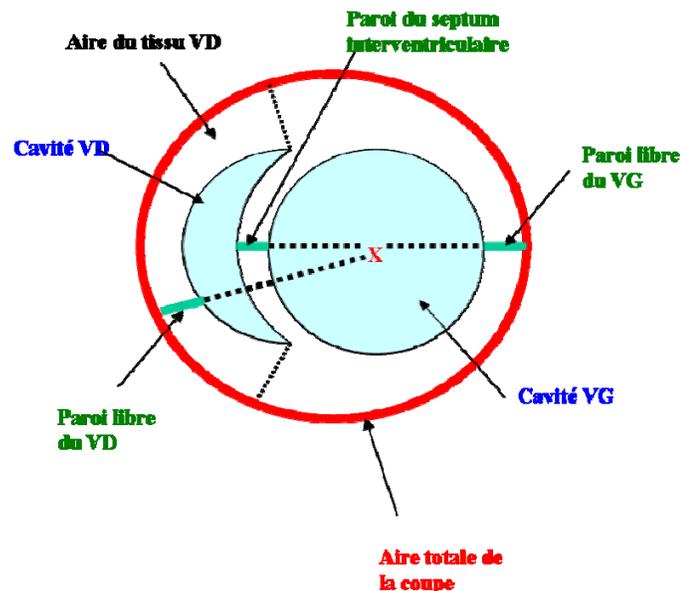


Figure 4 : Schéma d'une coupe histologique du cœur. Les mesures des cavités, du tissu ou des segments sont indiquées. VD : ventricule droit; VG : ventricule gauche.

2.1.2.6 Stimulation des glomérules avec l'ANP

Le rein droit des rats a été prélevé puis maintenu à 4°C dans une solution de Krebs oxygénée. Les glomérules ont été purifiés par filtrations successives sur des tamis de 250, 150 et 106 μm pour éliminer les tubules. Les glomérules de chacun des groupes de rats ont été mis en commun et dilués à une densité similaire, puis fractionnés en duplicata selon

différentes concentrations ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ et concentré) et une partie de ces échantillons a été réservée pour le dosage protéique. Les glomérules ont été pré-incubés 2 minutes avec de l'isobutylmethylxanthine 500 μ M (Sigma Aldrich Canada, #cat : I-7018), puis stimulés avec de l'ANP 5×10^{-8} M ou 10^{-12} M (contrôle) (Tocris Bioscience, #cat : 1912) pré-dilué dans l'acide acétique 0,0005N. La réaction a été arrêtée avec de l'acide perchlorique (PCA 1N) puis conservée à -35°C jusqu'au dosage du GMPc [104]. Les glomérules ont été soniqués (Branson sonifier 150, 80W) sur glace 3 fois pendant 20 secondes. Le surnageant obtenu après centrifugation pendant 10 minutes à 1000 g a été prélevé, acétylé, puis le GMPc a été dosé avec un kit EIA (Cayman, #cat : 581021). De plus, les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry modifié [105]. Les résultats sont exprimés en picomole de GMPc par milligramme de protéine.

2.2 Analyses génétiques

2.2.1 Extraction d'ARN et RT-PCR en temps réel

Le réactif TRIzol [®] a permis d'extraire l'ARN total à partir des organes d'intérêts pulvérisés à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Les échantillons d'ARN ont été digérés avec de la DNase I (Invitrogen, cat# 18047-019) pour éliminer les traces d'ADN suivi d'une seconde extraction d'ARN. La réaction de transcription inverse avec M-MLV (Invitrogen, #cat : 28025-013) en présence d'inhibiteur de RNase (Invitrogen, #cat : 10777-019) en utilisant un total de 1 μ g d'ARN, dont la qualité et la concentration ont été préalablement vérifiées sur un gel d'agarose 1% et à l'aide d'un spectrophotomètre (Ge Healthcare, Ultrospec 3100 pro). L'expression des gènes a été déterminée par RT-PCR quantitative en temps réel à l'aide d'un appareil Rotorgene RG-3000 (Corbett Research) avec la technologie SYBR-green (Quantitech SybrGreen Mastermix, QIAGEN, #cat : 204143 ou

Faststart SYBR Green Master, Roche, #cat : 04 673 484 001) selon les recommandations du manufacturier. Pour vérifier si un contaminant d'ADN était présent, la réaction a été effectuée avec de l'ARN dilué dans les mêmes proportions que les échantillons. Le gène de la β -actine a été employé comme contrôle endogène tel que suggéré pour des conditions expérimentales similaires [106]. Une courbe standard a été établie par la dilution sériée des ADN complémentaires pour chacun des tissus respectifs. L'expression des gènes a été déterminée par la méthode de quantification relative avec 2 courbes standards. Le tableau 4 ci-dessous montre les amorces utilisées dans cette étude. La température d'hybridation a été optimisée pour chaque paire d'amorces et les courbes de fusion ont été analysées. Les amorces ont été dessinées sur plusieurs exons consécutifs de manière à éviter l'amplification de l'ADN génomique avec l'aide du logiciel Primer-Blast (NCBI).

Gène	Séquence des amorces	Tm (°C)	Référence
GCA/NprA	5'- CCTTTCAGGCTGCCAAAAT (S) 5'- GATGATATTCTTCAGGCCATCC (AS)	55	Acc. NM_012613
NprC	5'- CCTACAATTTTCGACGAGACCAAA (S) 5'- TCGCTCACTGCCCTGGAT (AS)	61	PMID: 15789000
ANP	5'- GGAGCCTGCGAAGGTCAA (S) 5'- TATCTTCGGTACCGGAAGCTGT (AS)	55	PMID: 15789000
TGF- β 1	5'- CCAAGGAGACGGAATACAGG (S) 5'- CAGGTCACCTCGACGTTTG (AS)	60	Acc. NC_005100
SERCA2	5'- GGGGATATAGTGGAATTGCTG (S) 5'- ACAGGGTCAGTATGCTTGATG (AS)	62	Acc. NM_001110823
β -MHC	5'- CATGGCGGCATCTGTGAT (S) 5'- CAGCCTCATCAACCAGAAGA (AS)	60	Acc. NC_005114
β -actine	5'- ACTGCCGCATCCTCTTCCTC 5'- CCGCTCGTTGCCAATAGTGA	58	PMID: 15569320

Tableau 4 : Séquences, température d'hybridation (Tm) optimale, localisation et référence (accession ou référence #PMID) pour les amorces utilisées pour déterminer l'expression des gènes. (S) : sens; (AS) : anti-sens.

2.2.2 Séquençage

Le produit de PCR a été amplifié à la température d'hybridation optimale avec les amorces indiquées dans le tableau 5. Subséquemment, l'amplicon a été excisé du gel et purifié (GE

healthcare, #cat 28-9034-70). L'ADN a été quantifié à l'aide d'une échelle de poids moléculaire (Invitrogen, #cat : 10068-013). Les échantillons furent envoyés au service de séquençage du CHUM. Les séquences ont été déterminées avec le logiciel Chromas, les séquences consensus ont été obtenues avec Mobyli, la traduction et le choix du cadre de lecture ont été effectués avec ExPASy et les alignements ont été réalisés avec Clustal W.

Gène	Séquence des amorces	T _m (°C)	Référence
GCA (répétition TA)	5'- GATAGTAGCCCTCATCTCCG (S) 5'- GGACAGCTATGTGAAGTGCC (AS)	56	[83]
Dual Et-1/AngII receptor (dear)	5'- CAGCACCTTGGTATGAGCAC (S) 5'- CACGGTCCCCTTTCATGTAG (AS)	56	[107]

Tableau 5 : Séquences, température d'hybridation (T_m) optimale, localisation et référence pour les amorces utilisées pour le séquençage. (S) : sens; (AS) : anti-sens.

2.3 Analyses *in silico*

2.3.1 Analyses des gènes dans le segment chromosomique

Les marqueurs moléculaires marquant les extrémités des segments chromosomiques des rats congéniques ont été utilisés afin de déterminer leur position exacte et de trouver le contig associé dans le génome du rat (tableau 6). Par soustraction, la taille des segments a été calculée.

Souche	Marqueur génétique	Position	Contig	Région d'inclusion du segment	Longueur (pb)	Taille du segment (pb)
SM9	D2got115	49288036	NW_047625	49288036⇒59886137	10598101	29167191 (29,17 MB)
			NW_047626	0⇒18125569	18125569	
	D2chm161	443521	NW_047627	0⇒443521	443521	
SM12	D2got115	49288036	NW_047625	49288036⇒59886137	10598101	16321540 (16,32 MB)
	D2rat131	5723439	NW_047626	0⇒5723439	5723439	

Tableau 6 : Marqueurs génétiques des extrémités des segments chromosomiques des rats congéniques, emplacement et taille du segment d'origine normotendue en mégabases (MB). pb : paire de base

Les gènes inclus dans les segments chromosomiques ont été répertoriés et classés selon leur fonction tel que décrit par le Centre National pour l'Information de Biotechnologie (NCBI pour l'acronyme en anglais), leur effet potentiel sur les phénotypes observés a été évalué. Un diagramme de Venn a été généré pour illustrer les gènes en commun entre les segments chromosomiques portés par les différentes souches utilisées dans cette étude.

2.3.2 Analyses statistiques

Les résultats de ce mémoire sont exprimés selon la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne. Les analyses statistiques (test t de Student pour échantillons appariés ou pour échantillons non-appariés, analyse de la variance à 1 ou 2 facteurs (ANOVA)) ont été effectuées avec le logiciel Statview 5.0. Les différences étaient considérées significatives lorsque la valeur p était plus petite que 0,05.

3. Résultats et discussion

Avant d'interpréter les résultats, il est important de considérer les différences dans les concentrations de sel entre les diètes (Tableau 3). Initialement, nous voulions comparer l'effet d'une diète riche en gras et en sucrose à une diète normale mais nous avons réalisé que la diète commerciale riche en gras et en sucrose était pauvre en sel (Na=0,057%) par rapport à la diète normale (Na=0,23%). Ainsi, pour valider que les effets occasionnés par les diètes sont dus à une différence en matières grasses ou en sel, nous avons ajouté deux diètes contrôles : soit une diète riche en gras à concentration normale en sel (HF/NS; Na=0,23%) et une diète normale en terme de matières grasses mais faible en sel (NF/LS; Na=0,057%). Ainsi, certaines figures de ce travail ne présentent que les deux diètes originales (HF/LS et NF/NS) alors que d'autres présentent les quatre diètes. Nous porterons une attention particulière aux différences de contenu en sel et en gras entre ces diètes.

Le rat congénique est un modèle idéal pour évaluer l'impact d'un ou de plusieurs gène(s) candidat(s) sur différents paramètres physiologiques. Un segment d'origine normotendue et provenant de la souche MNS a été substitué dans le génome de la souche parentale DSS hypertendue (Figure 3). De plus, la souche SM9 possède trois gènes candidats d'origine normotendue : le récepteur de l'ANP (GCA), le récepteur du NO (GCs) et les gènes qui codent pour les polypeptides du fibrinogène (fgg). La souche SM12 ne possède que les deux derniers gènes candidats. Ainsi, lorsque les phénotypes sont similaires entre les souches SM12 et DSS, mais différents de la souche SM9, nous pouvons attribuer ces différences à la portion du segment chromosomique qui comprend le gène candidat GCA. En effet, en analysant la carte des segments chromosomiques des souches congéniques, la différence entre SM9 et SM12 est comprise dans un segment chromosomique qui contient

GCA comme principal gène candidat (Figure 3). Lorsque les phénotypes de SM9 et SM12 sont similaires mais différents de la souche parentale DSS, nous pouvons attribuer la différence au segment commun entre SM9 et SM12 et différent de DSS, soit celui qui contient les gènes candidats GCs et fgg. Il est possible que des gènes attenants aux trois gènes candidats majeurs puissent influencer les phénotypes, mais nous analyserons les résultats de prime abord, en se concentrant sur ces trois gènes candidats.

3.1 Paramètres anthropométriques et lipidiques

3.1.1 Apport alimentaire et masse corporelle

Effet de la diète

Nous avons noté que les rats congéniques mangeaient moins lorsqu'ils étaient soumis à une diète riche en gras et en sucrose (HF) par rapport aux diètes normales (NF) (Figure 5A). Cependant, l'apport calorique des diètes HF est beaucoup plus élevé que pour les diètes NF (5,3 vs 3,3 kcal/g), ce qui explique la prise alimentaire plus faible pour toutes les souches en diète HF. Par contre, malgré un apport alimentaire plus faible pour les diètes HF, l'apport calorique total demeure beaucoup plus important pour les diètes HF que pour les diètes NF. En raison de cet apport calorique plus élevé, nous avons observé un gain de poids par rapport au début de la diète plus élevé pour les diètes HF (entre 22 et 58 grammes

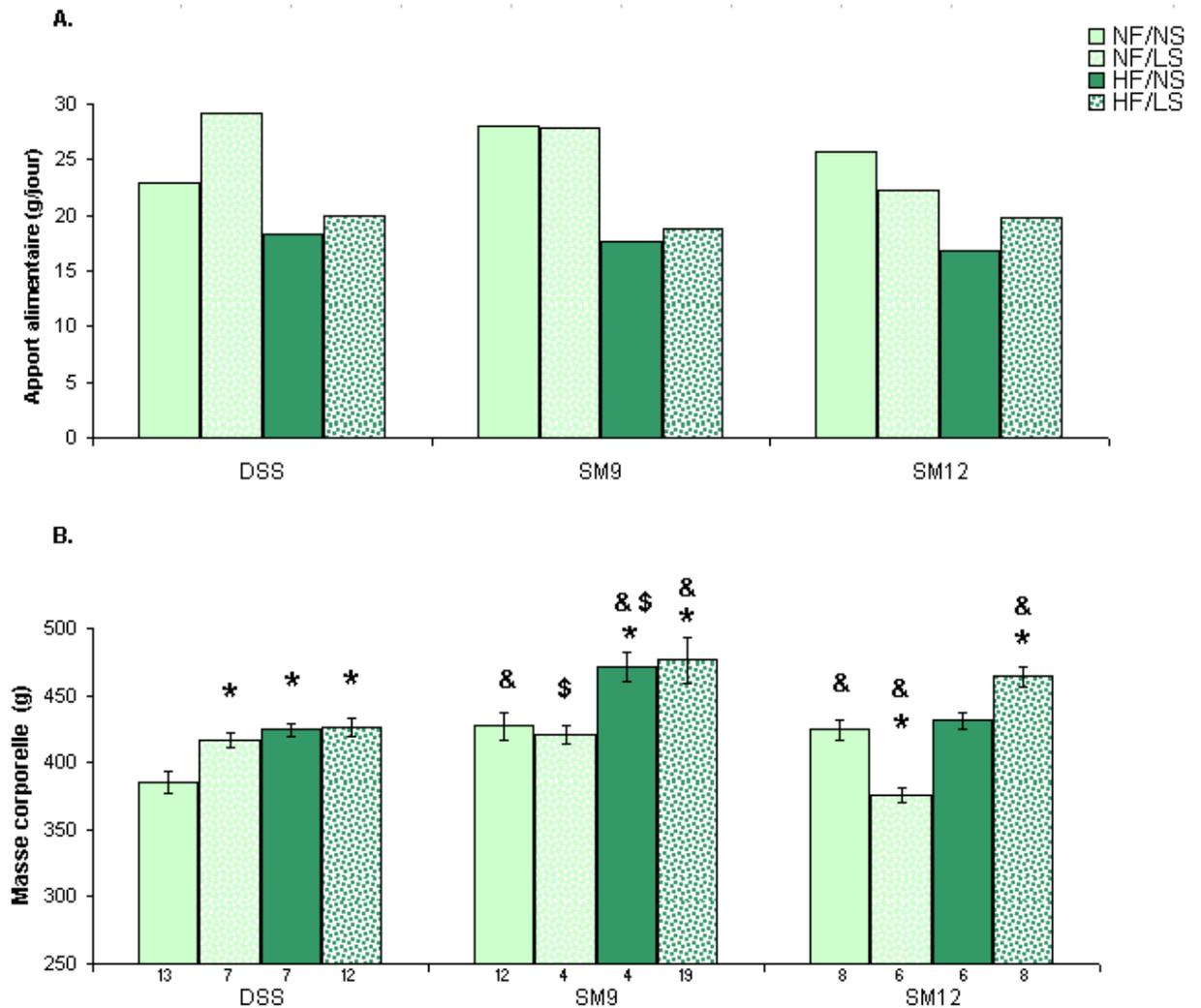


Figure 5 : Apport alimentaire quotidien (A) des rats DSS et des souches congéniques SM9 et SM12 pour chacune des diètes NFNS, NFLS, HFNS ou HFLS. L'apport alimentaire représente la moyenne de plusieurs rats par cage. La masse corporelle (B) après 31 jours de diète. NFNS: "normal fat, normal salt"; NFLS: "normal fat, low salt"; HFNS: "high fat, normal salt"; HFLS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12. Le nombre de rats dans chacun des groupes est indiqué en dessous des barres de l'histogramme.

selon la souche et la diète) que pour les diètes NF (inférieur à 2 grammes) après 31 jours de diète. La masse corporelle des rats à la fin de la diète (Figure 5B) ne reflète pas exactement le gain de poids car les différentes souches n'ont pas la même masse corporelle au départ. Ces données sont toutefois pertinentes car de nombreux paramètres physiologiques, par exemple la masse des organes et la diurèse, ont été corrigés par la masse corporelle. Dans notre cas, l'appétit pour le sel n'a pas globalement influencé l'apport alimentaire bien qu'il a déjà été démontré chez le rat Wistar, que l'apport alimentaire augmentait en fonction du contenu en sel [108].

Effet de la souche

L'apport alimentaire est demeuré constant entre les souches lors des diètes NF/LS, HF/NS et HF/LS (Figure 5A). Cependant, nous observons une hausse de prise alimentaire pour le rat DSS sur la diète NF/LS par rapport à la diète NF/NS. Cet effet pourrait être spécifique à la souche DSS de manière à augmenter son apport en sel. Une préférence pour les aliments salés a été démontrée chez l'humain et le rat [109, 110, 111, 112]. De plus, il a été démontré qu'à la phase précoce de l'hypertension, l'appétit pour le sel est augmenté et ce, malgré la rétention sodique [113]. Globalement, nos résultats ne démontrent pas de différence dans l'apport alimentaire entre les souches. Cependant, on note que la masse corporelle de DSS est plus faible que celle de SM9 et SM12 pour toutes les diètes (Figure 5B) et que la courbe de croissance de la souche SM9 est significativement supérieure aux souches SM12 et DSS.

3.1.2 Composition corporelle

Effet de la diète

La composition corporelle des rats, déterminée par EchoMRI a été modifiée avec la diète HF (Figure 6A). Bien sûr, le rapport de la masse adipeuse/masse maigre s'est avéré être beaucoup plus élevé sur les diètes HF, soit une hausse de plus de 75% (Figure 6A). Lorsque la balance énergétique est positive, c'est-à-dire que la consommation énergétique est supérieure à ce qui est dépensé, il y a gain de poids puisque l'énergie excédentaire est transformée en graisse et stockée dans les adipocytes [114]. Le contenu en sel des diètes n'a pas modifié le ratio masse adipeuse/masse maigre.

Effet de la souche

La souche SM9 présente un rapport masse adipeuse/masse maigre significativement plus élevé que les souches DSS et SM12. De plus, les rats SM9 engraisent plus que SM12 et DSS sur les diètes HF malgré un apport alimentaire équivalent (Figure 5A). Cette différence peut être expliquée par des facteurs génétiques. On sait que l'obésité peut être influencée par des gènes qui interviennent dans l'homéostasie énergétique par exemple dans la gestion des graisses ou dans l'apport énergétique [115]. Lorsque les cellules répondent moins bien aux effets de l'insuline, cet état se nomme résistance à l'insuline. L'indice HOMA-IR qui provient de l'anglais « Homeostasis model Assessment) est une formule mathématique qui permet de quantifier la résistance à l'insuline à partir des valeurs de glycémie et d'insulinémie à jeun [116]. Notre laboratoire a démontré que la souche SM9

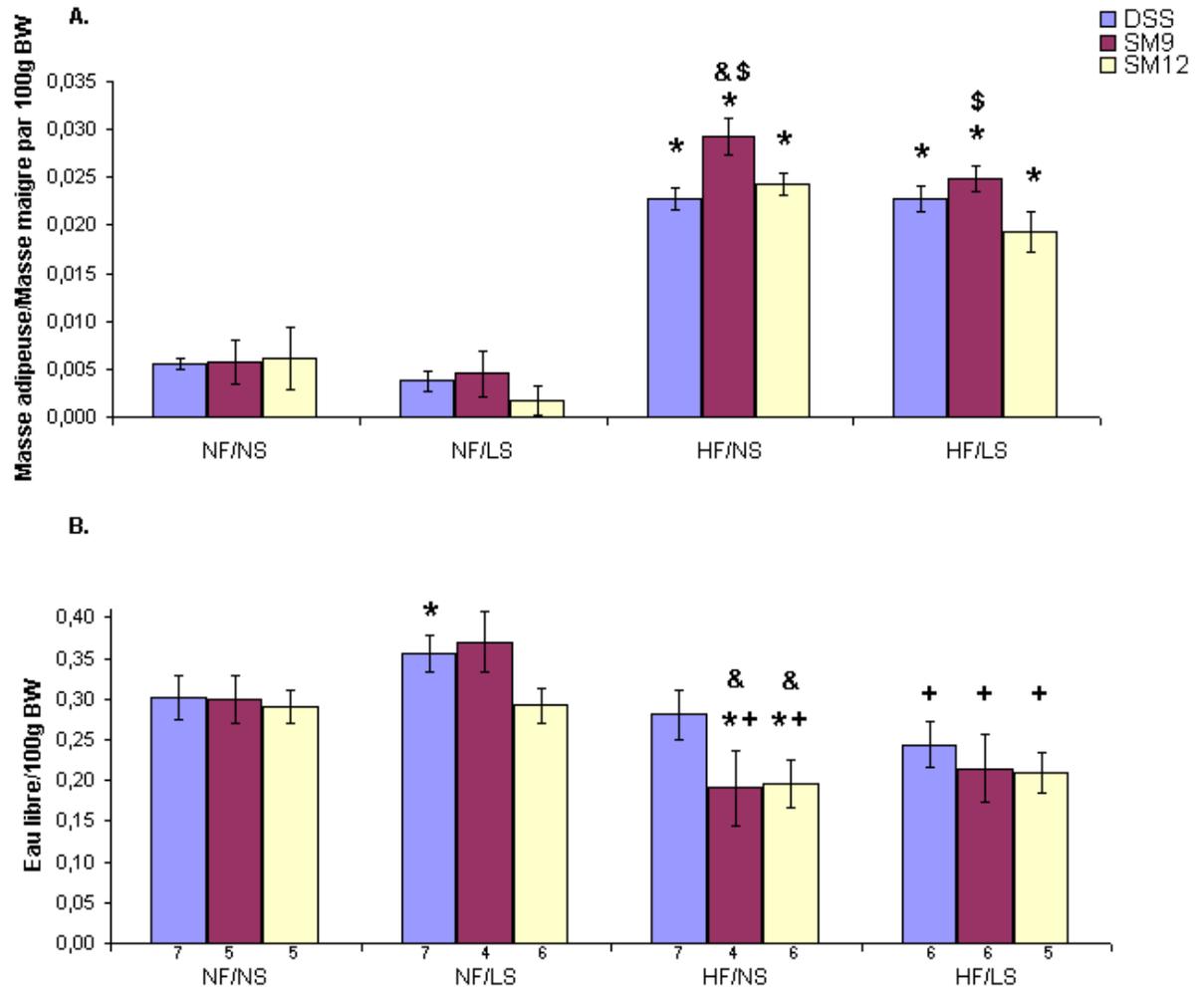


Figure 6 : Variation du rapport de la masse adipeuse sur la masse maigre (A) des rats DSS congéniques (delta) pour chacune des diètes NFNS, NFLS, HFNS ou HFLS ainsi que l'eau libre (B) après 31 jours de diète. Les valeurs ont été normalisées par la masse corporelle (BW) et sont exprimées en unités pour 100 grammes de BW. NFNS: "normal fat, normal salt"; NFLS: "normal fat, low salt"; HFNS: "high fat, normal salt"; HFLS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; + $p < 0,05$ par rapport à la diète NFLS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12. Le nombre de rats dans chacun des groupes est indiqué en dessous des barres de l'histogramme.

avait un indice HOMA-IR significativement plus élevé que la souche DSS sur la diète HF/LS [117]. Étant donné le rôle du tissu adipeux dans la résistance à l'insuline, nous pouvons faire le lien entre l'augmentation du rapport masse adipeuse/masse maigre et l'HOMA-IR chez la souche SM9. Ces résultats suggèrent que le segment chromosomique spécifique à la souche SM9 contient un ou plusieurs gènes influençant la prise de poids et la résistance à l'insuline.

3.1.4 Bilan lipidique

Effet de la diète

Nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence dans la triglycéridémie entre les deux diètes (Figure 7A) et qu'ils se situent dans l'intervalle des valeurs de références du rat mâle Wistar [118]. L'obésité abdominale est souvent associée à des triglycérides circulants élevés et de bas taux de HDL [119, 120]. La triglycéridémie pourrait également être considérée comme un marqueur de risques métaboliques incluant le développement des maladies cardiovasculaires surtout lorsqu'il y a obésité abdominale [120]. Étonnamment, les niveaux de cholestérol total, LDL et HDL étaient tous significativement plus bas lors de la diète HF/LS (Figure 7 B-D). Ayant analysé seulement les deux diètes HF/LS et NFNS, il est impossible pour le moment de déterminer si cette différence est attribuable au contenu en sel, en lipide ou encore à la combinaison des deux. Cependant, selon les valeurs de référence du rat Wistar, il faut noter que tous les rats démontraient une cholestérolémie élevée [118]. Pour analyser l'effet d'une diète riche en gras, il est important de prendre en considération plusieurs facteurs incluant la qualité des acides gras.

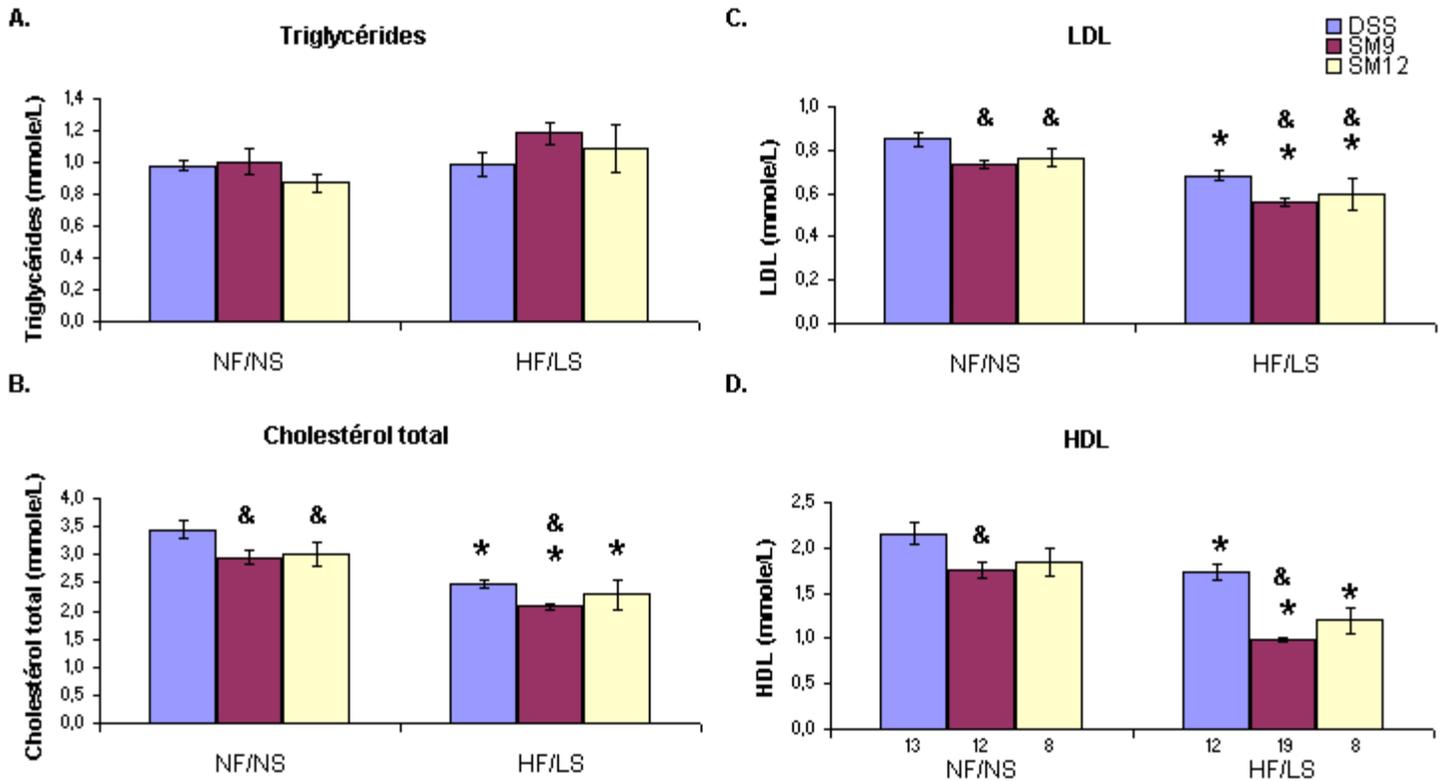


Figure 7 : Bilan lipidique sérique des rats DSS congéniques après 31 jours de diète NFNS ou HF/LS, indiquant la concentration des triglycérides (A), du cholestérol total (B), des HDL (C) ainsi que des LDL (D) exprimés en mmole/L. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12. Le nombre de rats dans chacun des groupes est indiqué en dessous des barres de l'histogramme.

Rappelons que les acides gras saturés sont ceux qui augmentent le taux de cholestérol et de LDL et qu'il est recommandé d'en limiter leur consommation mais de favoriser plutôt les acides gras insaturés [121]. Les acides gras polyinsaturés réduiraient d'autant plus le taux de cholestérol que les acides gras monoinsaturés [122]. D'après une étude du Dr Giugliano, un groupe de patients qui ont suivi une diète méditerranéenne pendant deux ans, avait un taux de cholestérol total et de triglycérides plus faibles, une meilleure résistance à l'insuline, ainsi qu'une meilleure fonction endothéliale [123]. D'autre part, le sel est un élément extrêmement important à considérer lors d'analyse d'effet de diètes chez le rat DSS dû à sa sensibilité au sel. Des études chez le rat DSS ont montré qu'une diète riche en sel (de 4 à 8% NaCl) augmentait le cholestérol par rapport à une diète normale qui contenait 0,3% de NaCl [64, 124, 125]. Ci-dessous, le tableau 7 indique la quantité de sel approximative ingérée par jour selon l'apport alimentaire quotidien et la composition de la diète.

Quantité consommée	NF/NS	NF/LS	HF/NS	HF/LS
Acides gras saturés	0,25	0,25	2,5	2,8
Acides gras monoinsaturés	0,33	0,34	3,1	3,5
Acides gras polyinsaturés	0,87	0,90	0,66	0,73
Cholestérol	0	0	0,02	0,02
Glucides	13	13	6,3	7,0
Protéines	4,8	4,9	3,5	3,9
Sodium	0,06	0,02	0,04	0,01

Tableau 7 : Consommation moyenne des différentes composantes nutritionnelles selon la consommation quotidienne et la composition nutritionnelle de chacune des diètes NF/NS, NF/LS, HF/NS et HF/LS. Les valeurs sont exprimées en gramme par jour et sont la moyenne des valeurs pour les 3 souches. NF/NS: "normal fat, normal salt"; NF/LS: "normal fat, low salt"; HF/NS: "high fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt".

Les diètes HF, en plus de contenir environ 10 fois plus d'acides gras saturés que les diètes NF, contiennent du cholestérol, ce qui devrait contribuer d'autant plus à augmenter les

niveaux circulants de cholestérol. Par contre, il est vrai que les acides gras mono-insaturés sont beaucoup plus élevés dans les diètes HF et sont présents surtout sous forme d'acide oléique. En fait, l'acide oléique représente 22% des acides gras de la diète HF. Ainsi, 83% des acides gras des diètes HF sont mono-insaturés ou polyinsaturés. Considérant, les effets bénéfiques de la diète méditerranéenne sur le taux de cholestérol, la composition lipidique de la diète HF/LS pourrait expliquer le taux de cholestérol circulant plus bas sous diète riche en gras. Les études qui ont démontré la relation entre l'élévation du cholestérol et la consommation de sel étaient effectuées avec des diètes ayant des concentrations beaucoup plus élevées en sel (0,3 et 8%) que nos études (0,057 et 0,23%) [64, 124, 125]. Il est donc possible que le sel contribue à hausser le cholestérol, mais il semble que la qualité des lipides dans la diète contribue d'avantage à diminuer le cholestérol circulant sérique. Les HDL demeurent plus bas sur la diète HF/LS par rapport à la diète NF/NS (Figure 7D). Un bas taux de HDL est associé au développement accéléré de l'athérosclérose en lien avec des perturbations dans le métabolisme du cholestérol et la perte de leur fonction oxydative sur les lipoprotéines [119]. Lorsque les taux de HDL sont bas, cela constitue un facteur de risque du syndrome métabolique et de l'obésité [127, 128].

Effet de la souche

Nous avons noté que les niveaux sériques de cholestérol total, de LDL et de HDL étaient généralement plus bas pour les souches congéniques SM9 et SM12 par rapport à DSS pour toutes les diètes (Figure 7 B-D). Une différence génétique entre DSS et les souches congéniques pourrait expliquer ces résultats. La source majeure de cholestérol circulant ne provient pas de la diète mais plutôt de sa synthèse endogène, dont l'enzyme limitante est la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) qui produit environ 80% du

cholestérol circulant [129]. Des déterminants génétiques impliqués dans le métabolisme du cholestérol, soit au niveau du transport ou de la biosynthèse, pourraient donc expliquer des différences entre les souches. Il y a 138 SNPs validés pour le gène de la squalène synthase, une enzyme impliquée dans le métabolisme du cholestérol chez l'humain et certains de ces SNPs pourraient être associés à des niveaux élevés de LDL [130]. Les LDL transportent le cholestérol jusqu'aux artères où ils peuvent former des plaques (athérosclérose), par opposition aux HDL qui peuvent lier le cholestérol pour le transporter jusqu'au foie, où il peut être réutilisé ou excrété [131]. Il est possible que le métabolisme du cholestérol puisse être perturbé par l'un des gènes, ou groupe de gènes de la portion commune du segment chromosomique entre SM9 et SM12. Nous avons observé une réduction plus importante que les autres souches des taux de HDL pour la souche SM9 sur la diète HF/LS par rapport à la diète NF/NS. Rappelons que la souche SM9 a un rapport de la masse adipeuse/masse maigre plus élevé en plus d'être plus résistante à l'insuline que les deux autres souches. Le rapport des triglycérides sur les HDL, qui corrèle avec la résistance à l'insuline est associé à un risque plus important à développer le syndrome métabolique [132, 133]. Ce ratio est significativement plus élevé pour la souche SM9 par rapport à la souche DSS sur la diète HF/LS, ce qui suggère un désordre métabolique plus important pour SM9. Il est intéressant de se rappeler qu'en plus de leur fonction de réserve énergétique, les acides gras peuvent également interférer avec les voies de signalisation cellulaire et perturber l'homéostasie du glucose [19].

3.1.5 Poids des organes

Effet de la diète

La masse relative des reins est significativement plus petite chez les souches SM12 et DSS sous diètes riches en gras (Figure 8 AB). Étant donné qu'il n'y a pas de différence dans les poids relatifs des reins sur les diètes HF/NS et HF/LS, nous pouvons conclure que la composante grasse de la diète affecte la masse des reins. De plus, la masse relative des reins de la souche DSS est significativement plus basse sur la diète NF/LS que sur la diète NF/NS, suggérant que le sel peut également affecter la masse relative des reins. Tout comme le gain de poids et le ratio masse adipeuse/masse maigre, nos résultats démontrent que les poids absolus et relatifs du tissu adipeux rétropéritonéal sont significativement augmentés sur les diètes HF par rapport aux diètes ND (Figure 8 CD). Contrairement aux reins et aux tissus adipeux, nous n'avons pas observé de variation suite aux changements de diète dans les masses relatives des ventricules ou des oreillettes (Figure 8 FH). Concernant la masse absolue, il y avait une tendance générale, parfois significative, à l'augmentation des masses ventriculaires et auriculaires suite aux diètes HF (Figure 8 EG). Le dépôt ectopique de lipides apparaît dans le cœur, le foie et le muscle lorsque le flux d'acides gras libres est perturbé et que la capacité d'accumulation du tissu adipeux est dépassée [134, 135]. L'augmentation de la masse des ventricules que nous observons lors de la diète riche en gras, pourrait être due à des dépôts ectopiques de lipides ou à l'hypertrophie cardiaque.

Effet de souche

La masse relative des reins des souches congéniques SM9 et SM12 est significativement plus basse que celle de DSS sur la diète NF/NS (Figure 8 B). D'autre part, l'équipe du Dr

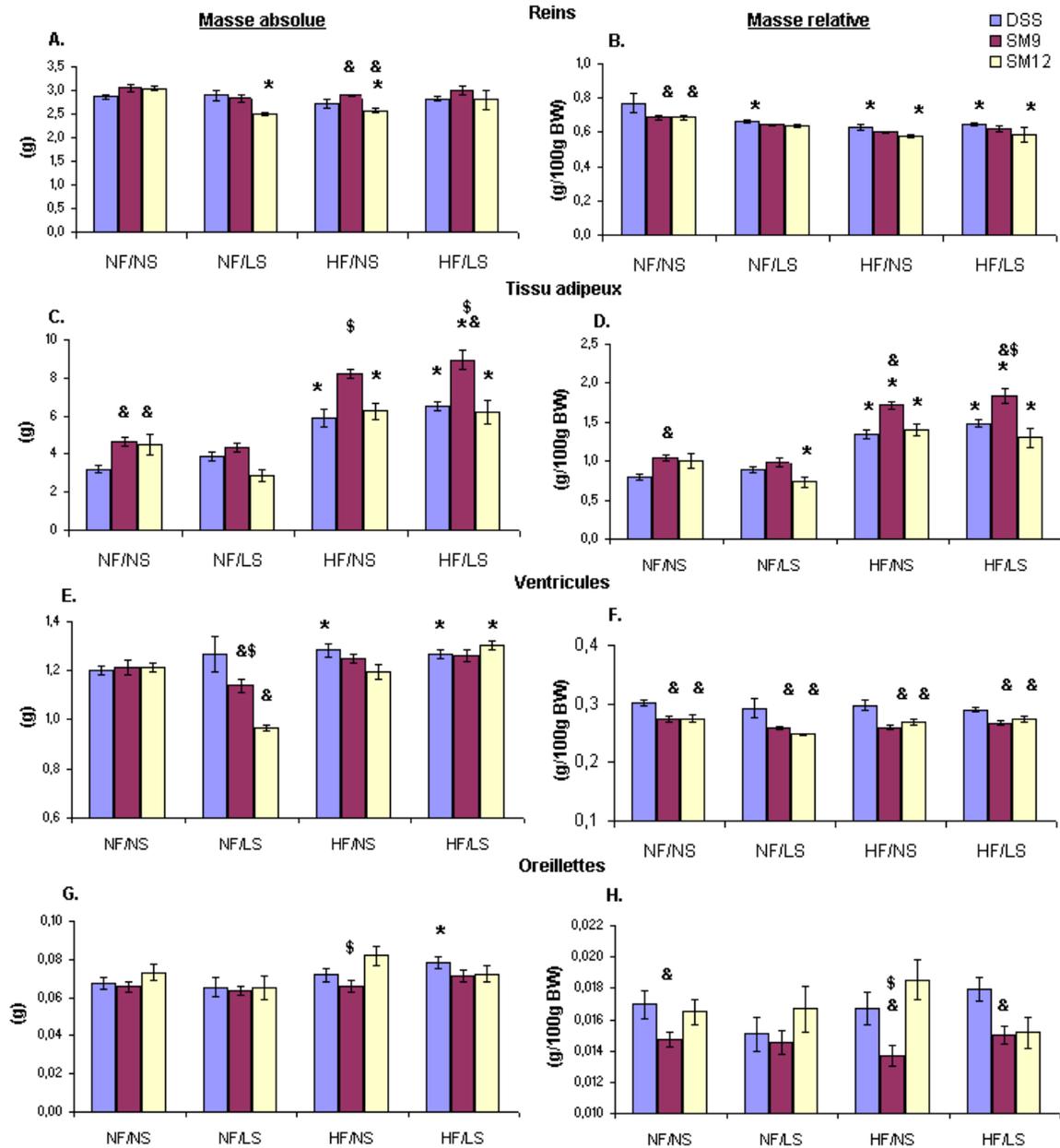


Figure 8 : Poids absolus et relatifs des reins droit et gauche (A, B), du tissu adipeux rétro-péritonéal (C, D), des ventricules droit et gauche (E, F) ainsi que des oreillettes droite et gauche (G, H) des rats DSS congéniques après 31 jours de diète NFNS, NFLS, HFNS ou HFLS. NFNS: "normal fat, normal salt"; NFLS: "normal fat, low salt"; HFNS: "high fat, normal salt"; HFLS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12.

Deng a démontré que sur une diète contenant 2% de NaCl, la masse rénale relative de SM9 et SM12 était significativement plus faible que celle de la souche parentale DSS [67]. Cette différence pourrait donc être attribuée au segment du chromosome 2, commun à SM9 et SM12. L'hyperplasie cellulaire, qui pourrait expliquer nos résultats, a été démontrée chez le rat DSS pour expliquer l'hypertrophie rénale présente chez les rats sur diète riche en sel [136].

La masse adipeuse rétropéritonéale de la souche SM9 est plus élevée que celle de SM12 et DSS sur les diètes HF (Figure 8 CD). Il s'agit d'un élément additionnel au rôle du tissu adipeux dans la résistance à l'insuline plus élevée chez la souche SM9. La portion du segment du chromosome 2 qui est unique à SM9 et différente de SM12 et DSS, pourrait expliquer cette différence génétique. De même, nous avons observé que la masse relative ventriculaire des souches SM9 et SM12 était plus basse que DSS, de manière fortement significative, pour toutes les diètes de l'étude (Figure 8 F). Cette différence avait été observée par le laboratoire de Dr Deng avec une diète riche en sel [60]; dans notre étude, le rat DSS présente une hypertrophie cardiaque plus accentuée que les deux autres souches sur toutes les diètes. La masse relative auriculaire (Figure 8 H) est significativement plus élevée ou montre une tendance à l'être chez DSS et SM12 par rapport à SM9 pour toutes les diètes. Sachant que l'oreillette est le site primaire de production de l'ANP et que la pression sanguine des souches SM12 et DSS est plus élevée que celle de SM9 sur diète riche en sel [73], nous pouvons suggérer que la masse des oreillettes a été augmentée par un mécanisme compensatoire face à la hausse de la pression artérielle.

3.2 Pression moyenne

Effet de la diète

Nos résultats ne démontrent pas de variation significative de la pression artérielle par la diète HF/LS malgré une tendance à la baisse observée pour les souches DSS et SM12 (Figure 9). Il est bien connu que le sel a une influence importante sur la pression à court terme [6, 47]. De plus, une diète riche en acide linoléique et en sucrose a été associée à une hausse de pression chez le rat DSS [137]. Cependant, certaines études ont montré un effet bénéfique de la diète HF composée d'acide oléique et d'acide gras mono-insaturés [39, 42, 138, 139], alors que d'autres études ont montré un effet néfaste sur la pression [140-143]. L'effet de diètes HF sur la pression semble être influencé par la qualité de sa composition lipidique. Ainsi, les oxydants, les composés mineurs, le faible ratio d'acides gras saturés/insaturés, la quantité plus élevée d'acide gras ω 3, ainsi que l'absence de gras trans, sont tous des paramètres qui peuvent contribuer à réduire la pression lors de la prise d'une diète HF [39, 42, 139]. Ces paramètres sont importants pour l'analyse de l'effet de la diète et malheureusement les articles scientifiques abordent peu la question. En plus de la composition lipidique, la durée de la diète, le modèle d'étude et le sexe sont des facteurs qui pourraient influencer la réponse physiologique. Il semblerait que 6 semaines de diète HF soit suffisantes pour augmenter la pression artérielle chez des animaux normaux [140, 141]. Dans notre étude, la diète HF/LS contenait une grande quantité d'acide oléique et compte tenu des propriétés bénéfiques de l'huile d'olive, ceci pourrait expliquer en partie la tendance à la baisse de la pression artérielle. Par contre, il faut tenir compte de la teneur en sodium plus faible dans la diète HF/LS qui peut aussi avoir un impact sur la baisse de la pression. Cependant, il s'agit ici d'une faible différence (0,057% vs 0,23% Na) et les études

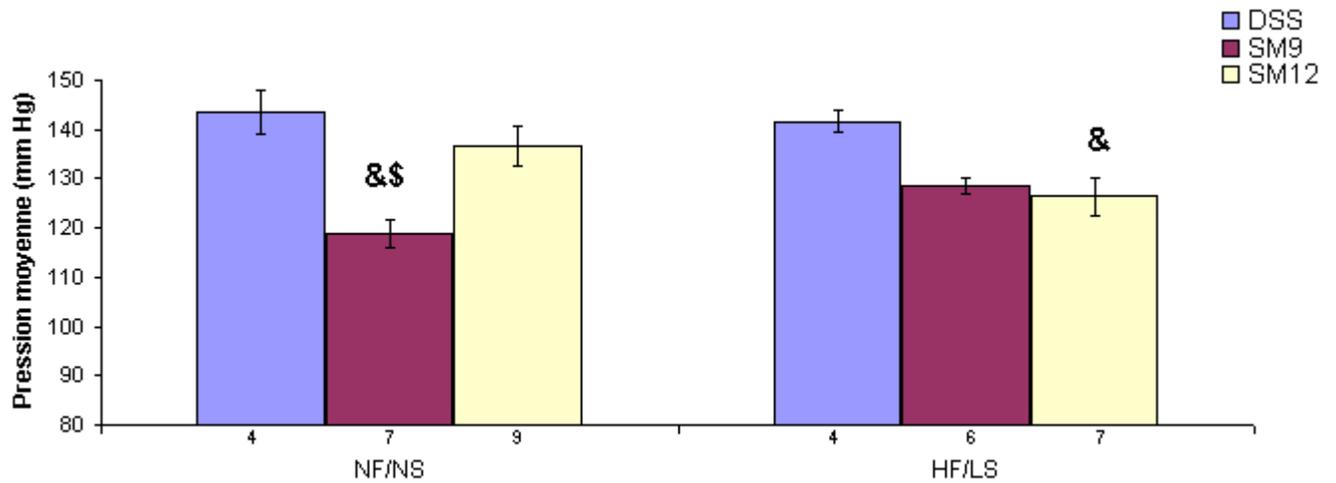


Figure 9 : Pression moyenne (mm Hg), déterminée par radio-télémétrie, des rats DSS congéniques après 33 jours de diète NF/NS et HF/LS. Les valeurs indiquent la moyenne de chacun des groupes après 12 heures de lecture de jour et de nuit. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt". Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12.

ayant démontré un effet de la concentration de sodium dans les diètes montraient des différences plus importantes. En fait, lorsque nous corrigeons le sodium par la quantité consommée de diète (Tableau 7), on note une différence de 2 à 6 fois selon le type de diète HF/LS, HF/NS, NF/LS et NF/NS.

Dans les études qui ont montré des effets du sel chez le rat DSS, les différences de concentrations en sel sont généralement de 10 à 20 fois (exemples typiques : 0,4 et 4% Na ou encore 0,4% et 8% Na) [144, 145]. En somme, il est possible que la concentration de sel plus faible ainsi que la qualité de la composante lipidique contribuent à la tendance de la diète HF/LS à diminuer la pression. Le prochain protocole de télémétrie comprendra les diètes contrôles HF/NS et NF/LS afin de déterminer la composante responsable de la baisse de la pression que nous avons observée.

Effet de la souche

Nos résultats démontrent que la pression moyenne des rats DSS et SM12 est supérieure respectivement de 25 et 18 mm Hg à celle de SM9 sur la diète NF/NS (Figure 9). SM12 et DSS possèdent le segment qui contient le gène GCA d'origine hypertendue alors que celui de SM9 est d'origine normotendue. Les multiples actions physiologiques de GCA sur la pression ont été expliquées précédemment. Ces résultats suggèrent que le système de l'ANP est perturbé dans ces souches et il est possible que ceci dépende de GCA. L'équipe du Dr Deng avait déjà observé cette différence entre les souches sur la diète riche en sel [66]. Nos travaux montrent que la différence persiste sur une diète normale en sel mais indiquent également que la différence de pression entre la souche DSS et la souche SM9 s'estompe sur la diète HF/LS. Ces résultats permettent de poser l'hypothèse que le

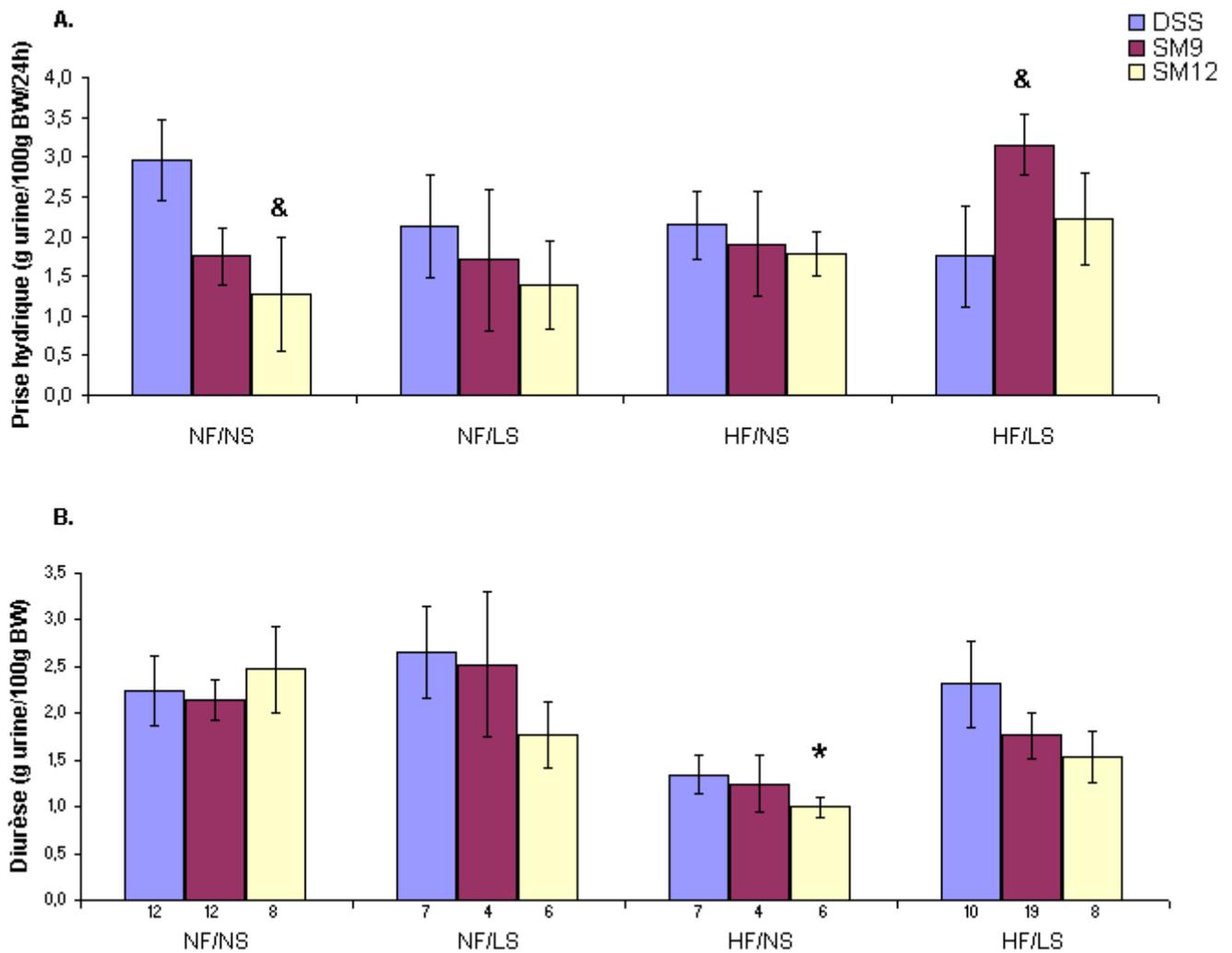


Figure 10 : Apport hydrique (A) et diurèse (B) compilés pendant 24 heures dans des cages métaboliques chez les congéniques du rat DSS lors des diètes NFNS, NFLS, HFNS et HFLS. NFNS: "normal fat, normal salt"; NFLS: "normal fat, low salt"; HFNS: "high fat, normal salt"; HFLS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12.

segment chromosomique contenant la GCA serait responsable non seulement de la différence de pression entre les deux souches mais également de la sensibilité au sel de la souche DSS. La GCA demeure la meilleure candidate pour cette différence.

3.3 Fonction rénale

3.3.1 Analyse des fluides corporels

Effet de la diète

En cages métaboliques, nous avons observé que les rats nourris avec la diète HF/NS montraient une diurèse 24h diminuée par rapport à la diète normale NF/NS (Figure 10B). Cet effet est attribuable à la composante lipidique de la diète HF et n'est pas une conséquence de la variation de la prise hydrique (Figure 10A). Il est plus facile de discuter conjointement de la composition urinaire et sérique en électrolytes. Nous analyserons premièrement le sodium puisqu'il est particulièrement important dans la pathologie de l'hypertension artérielle. Nos résultats indiquent que la natriurie (taux de sodium urinaire) est significativement plus basse pour les trois souches sur la diète HF/LS alors que la natrémie (taux de sodium dans le sang) est significativement plus élevée (Figure 11A et 13A). Nous savons que la réabsorption tubulaire de sodium est régulée principalement par l'aldostérone mais que l'ANP, la volémie et la capacité de perfusion du rein y jouent un rôle important. Or, nos résultats démontrent que l'aldostéronémie est significativement plus élevée lors de la diète HF/LS (Figure 13C). Plus élevée est la consommation de sel, plus le système RAAS sera inhibé. Ainsi, lors de la diète HF/LS, l'aldostéronémie était plus élevée, la natriurie plus basse et la natrémie plus élevée que sur la diète NF/NS. L'aldostérone favorise aussi l'élimination du potassium; la régulation se fait en sens inverse du sodium pour permettre l'équilibre des charges. Le ratio Na/K est un meilleur paramètre

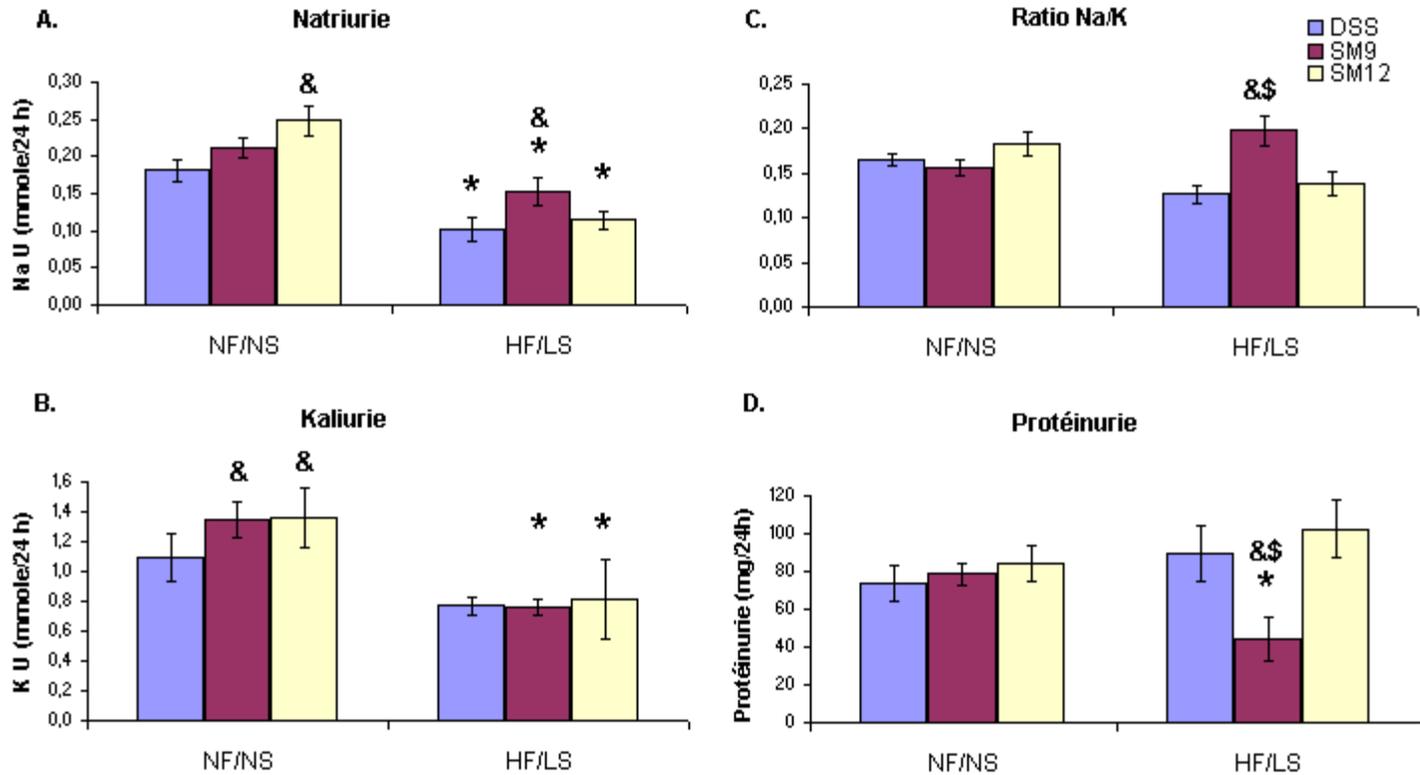


Figure 11 : Analyse de la natriurie (A), kaliurie (B), du ratio Na/K urinaire (C) et de la protéinurie (D) après une collecte de 24 heures dans des cages métaboliques chez les congéniques du rat DSS lors des diètes NFNS et HF/LS. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * p<0,05 par rapport à la diète NFNS; & p<0,05 par rapport à la souche DSS; \$ p<0,05 par rapport à la souche SM12.

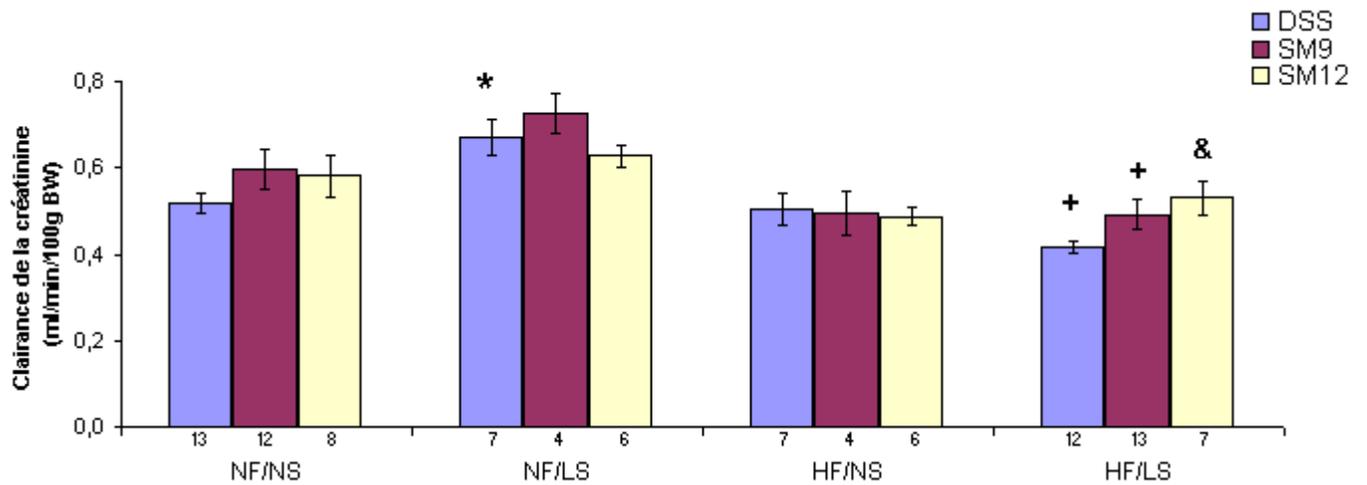


Figure 12 : Clairance de la créatinine des rats DSS congéniques déterminée à la fin de la diète NFNS, NFLS, HFNS et HFLS. NFNS: "normal fat, normal salt"; NFLS: "normal fat, low salt"; HFNS: "high fat, normal salt"; HFLS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; + $p < 0,05$ par rapport à la diète NFLS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12.

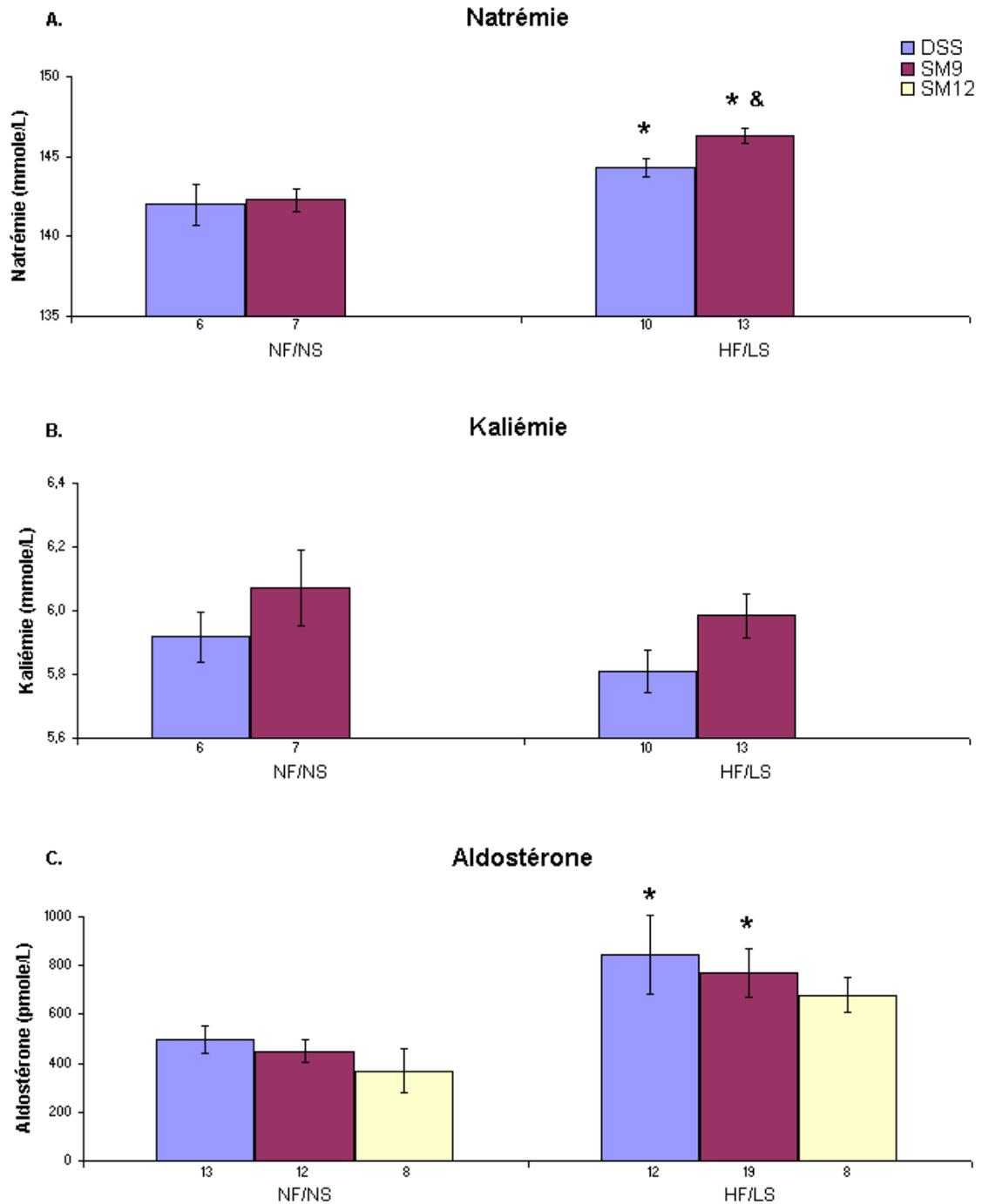


Figure 13 : Natrémie (A), kaliémie (B) et aldostérone sérique (C) chez les congéniques du rat DSS déterminés à la fin de la diète NFNS et HF/LS. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12.

pour comparer l'excrétion de sodium et potassium dans des diètes de composition minérale différente. Ainsi, lorsque nous comparons le ratio Na/K entre les diètes (Figure 11C), nous n'observons pas de différence significative. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les diètes pour la protéinurie (Figure 11D) ou la clairance de la créatinine (Figure 12). Par contre, nous observons une tendance à la diminution de la clairance de la créatinine lors des diètes HF tel que confirmé par des analyses ANOVA à deux facteurs. Or, il est connu que la clairance de la créatinine est augmentée lors d'une alimentation riche en sodium [146, 147] mais nous pensons que la différence en sodium entre les diètes étudiées ici pourrait être trop faible pour produire une différence dans la clairance de créatinine. Lors d'une étude chez le rat SD, la clairance de la créatinine est augmentée par l'ajout de 5% de beurre dans une diète normale après 4 semaines de diète [148]. Une autre étude a démontrée que lors du stade précoce de la polykystique rénale, la diète riche en gras abaissait la clairance de la créatinine par rapport à une diète faible en gras [149]. D'autres auteurs ont montré que la source de lipide pouvait modifier certains paramètres importants pour la fonction rénale sans obtenir de modification de la clairance de la créatinine [149]. Nous pouvons attribuer la tendance à la baisse de la clairance de la créatinine lors de la diète riche en gras à la composante lipidique mais aussi à une différence en sodium entre les diètes.

Effet de la souche

La prise hydrique et la diurèse pendant une collecte de 24 heures dans des cages métaboliques ne sont pas significativement différentes entre les souches mais on note une grande variabilité entre les rats (Figure 10 AB). Il est intéressant de noter que la souche SM9 sur la diète HF/LS a une natriurie et une natrémie plus élevées que DSS (Figure 11A

et 13A). Conséquemment, le ratio Na/K urinaire de SM9 sur la diète HF/LS est plus élevé que pour les souches SM12 et DSS (Figure 11C). Ces résultats indiquent que la diète HF/LS améliore certains paramètres de la fonction rénale de façon spécifique à SM9. En effet, un faible ratio Na/K urinaire est indicateur d'une plus grande rétention sodique [71]. La partie du segment chromosomique unique à SM9 pourrait expliquer cet effet qui semble dépendant de la diète HF. Dans le même sens, SM9 sur la diète HF/LS avait une protéinurie plus basse que DSS et SM12, indicatif d'une meilleure fonction rénale. La protéinurie est un indicateur du stade terminal de l'insuffisance rénale des maladies cardiovasculaires [150]. Le fait que nous démontrons que les deux souches les plus hypertendues, SM12 et DSS soient celles qui ont une protéinurie plus élevée n'est pas surprenant. Notre groupe a démontré que la composition des fluides était différente si le prélèvement avait été effectué à jeun ou non [151]. La réponse au jeûne permet de mieux déceler l'effet des gènes, ceux-ci étant largement supérieurs à l'effet de l'environnement (la modification de la diète par exemple) [151]. Nous n'avons noté aucune différence significative entre les souches au niveau de l'aldostéronémie, de la kaliémie (Figure 13B et 13C) ou encore de la clairance de la créatinine (Figure 12). On note cependant une clairance de créatinine plus élevée pour SM9 et SM12, et si cette différence se confirme, cela serait le reflet d'une meilleure fonction rénale, particulièrement au niveau glomérulaire.

3.1.3 Eau libre

Effet de la diète

Nous avons noté une baisse de la quantité d'eau libre chez les rats sur diètes riches en gras (Fig.6). Or, nous avons noté que la diurèse de 24 heures est diminuée sur la diète HF. Nous

n'avons pas observé d'effet de la concentration de sel dans les diètes sur la quantité d'eau libre.

Effet de la souche

Lors de la diète HF/NS, l'eau libre était significativement plus élevée pour la souche DSS que les deux autres souches alors qu'il ne s'agissait seulement que d'une tendance sur la diète HF/LS (Figure 6B). Il est possible que cette différence soit induite par la concentration de sel plus élevée ainsi que la sensibilité au sel caractéristique de la souche DSS et qui pourrait favoriser la rétention d'eau.

3.3.2 Analyse histopathologique du rein

Effet de la diète

Il y aurait des liens étroits entre le syndrome métabolique et la dysfonction rénale [152]. En ce sens, les résultats de l'analyse histopathologique démontrent que le score total de dommage rénal des rats sur la diète HF/LS est plus important que sur la diète NF/NS (Figure 14 A-C). Ce résultat va de paire avec ceux obtenus par un groupe qui a comparé l'effet de la diète riche en gras sur des rats et qui a observé des dommages glomérulaires et tubulaires démontrant ainsi l'impact de l'obésité sur le rein [153]. Un autre groupe a indiqué que l'augmentation de la réabsorption tubulaire de sodium jouait un rôle majeur dans l'initiation de l'hypertension induite par l'obésité [154]. Du point de vue mécanistique, il a été suggéré que l'obésité augmenterait la pression au niveau des capillaires glomérulaires provoquant une hyperfiltration et hypersécrétion d'albumine dans l'urine [154]. Ceci est en fait relié à l'hypothèse de surcharge (en anglais « overload hypothesis ») selon laquelle l'hypertension au niveau du glomérule conduit à une

hyperfiltration et à une fuite de protéines dans l'urine, ce qui s'accompagne de dommages glomérulaires et de la perte de néphrons [155]. La réparation et la régénération tubulaire permettent par la suite la récupération des néphrons endommagés [155]. L'analyse individuelle des paramètres histopathologiques met en évidence des dommages glomérulaires et tubulaires pour les deux diètes (Figure 14A).

Lors de l'examen des tubules, le Dr Louis Gaboury, pathologiste en chef à l'IRIC, a noté la présence accrue de régénération tubulaire, de cylindres hyalins, d'atrophie tubulaire et de fibrose tubulo-interstitielle, alors qu'au niveau glomérulaire, les dommages typiques étaient la sclérose glomérulaire, l'épaississement de la membrane basale et l'expansion de la matrice mésangiale. En somme, malgré que la diète HF/LS ait montré plusieurs effets positifs sur les phénotypes cardiovasculaires, cette diète produit un dommage rénal chez les trois souches.

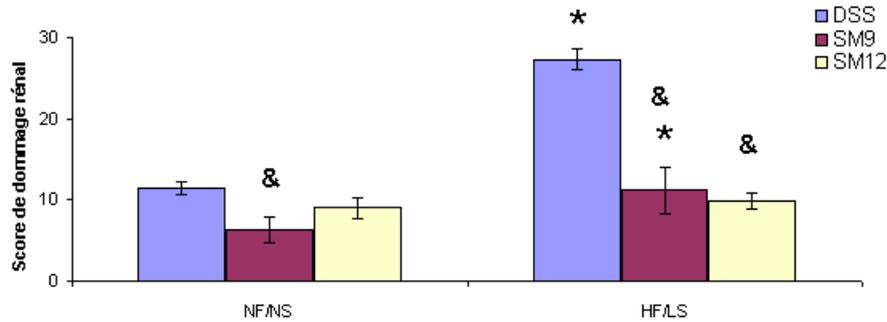
Effet de la souche

Nous avons également noté que le score total de dommage rénal était significativement plus élevé chez la souche parentale DSS, et ce pour les deux diètes HF/LS et NF/NS (Figure 14). Sous diète NF/NS, la souche SM12 avait un score de dommage rénal intermédiaire à DSS et SM9. Notons que les souches DSS et SM12 possèdent la forme hypertendue du gène candidat GCA. Étant donné l'importance du rein et de GCA dans le contrôle de la volémie, ces résultats sont très pertinents. En somme, les lésions rénales observées lors de l'examen histopathologique restent malgré tout assez légères, et ce même chez le rat DSS qui était plus atteint lors des deux diètes HF/LS et NF/NS. Le fait que le

A.

Paramètres histopathologiques	NF/NS			HF/LS		
	DSS	SM9	SM12	DSS	SM9	SM12
Glomérules	2,0 ± 0,5	1,5 ± 0,8	0,4 ± 0,2	6,8 ± 1,0	2,9 ± 0,6	1,2 ± 0,4
Tubules	7,6 ± 0,8	3,0 ± 0,3	6,2 ± 0,8	14 ± 0,0	6,2 ± 1,0	7,3 ± 0,7
Pelvis et fornix	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Vaisseaux	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,4	0,7 ± 0,2	3,5 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,2 ± 0,1
Espace interstitiel	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,4	1,7 ± 0,2	2,8 ± 0,7	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1
Score dommage rénal	11,5 ± 0,8	6,3 ± 1,5	9,0 ± 1,4	27,3 ± 1,2	11,2 ± 1,8	9,8 ± 1,0

B.



C.

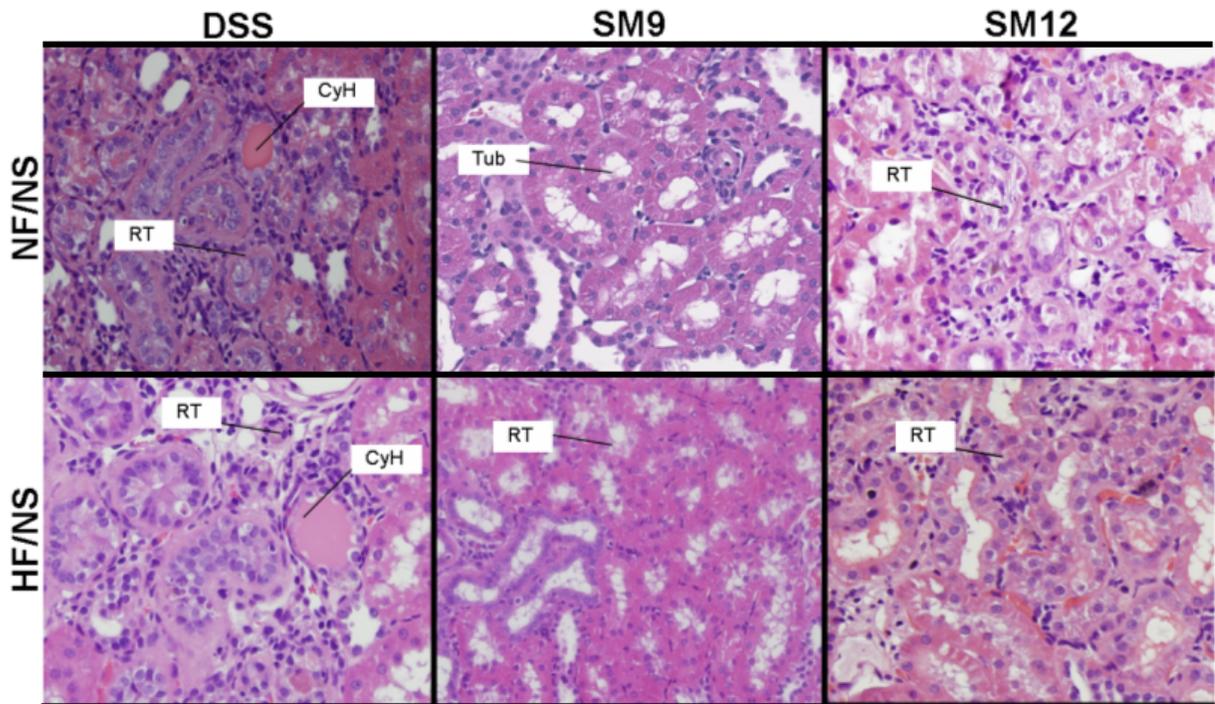


Figure 14 : Dommage rénal déterminé par une étude histopathologique externe à l'aveugle à la fin de la diète NFNS et HFLS. Les glomérules, tubules, pelvis et fornix, vaisseaux et l'espace interstitiel ont été examinés (A) pour un total de 21 paramètres, un score total de dommage a été déterminé (B) et des photos représentatives des dommages tubulaires sont montrées (C). NFNS: "normal fat, normal salt"; HFLS: "high fat, low salt"; Tub: Tubules normaux. RT: régénération tubulaire; CyH: cylindre hyalin. Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS.

score de dommage rénal soit plus faible chez la souche SM9, suggère un rôle protecteur conféré par le segment du chromosome 2 provenant de la souche normotendue.

3.3.3 Réponses diurétique et natriurétique à l'ANP.

Effet de la diète

Nous avons d'abord confirmé que sous une diète normale en sel et en gras (NF/NS), les rats répondaient bien à l'ANP, c'est à-dire par une augmentation significative de la diurèse et de la natriurèse après stimulation par l'ANP (Figure 15A et B). Par contre, nous avons aussi noté que sous la diète HF/LS, les réponses diurétiques et natriurétiques à l'ANP étaient complètement abolies. Afin de mieux comprendre les raisons de cette inhibition, nous avons ajouté deux groupes expérimentaux comportant les diètes contrôles NF/LS et HF/NS décrites précédemment.

La réponse diurétique à l'ANP sous ces diètes s'est avérée intermédiaires aux diètes HF/LS et NF/NS. Ainsi, nous notons que la diminution en sel dans la diète inhibe l'effet diurétique de l'ANP, alors que l'augmentation en gras inhibe l'effet diurétique seulement chez la souche DSS. Quant à la natriurèse, celle-ci ne semble être inhibée que par la combinaison de diète riche en gras et pauvre en sel puisque sous la diète riche en gras mais normale en sel (HF/NS) ou encore normale en gras mais faible en sel (NF/LS), la réponse natriurétique à l'ANP est préservée. En fait, on observe même une augmentation de la natriurèse à l'ANP pour les souches SM9 et SM12 sous diète riche en gras et normale en sel (HF/NS). On peut conclure que l'effet inhibiteur de la diète HF/LS sur la diurèse peut être expliqué par la diminution en sel dans la diète alors que l'effet inhibiteur sur la réponse natriurétique à l'ANP ne peut être expliqué que par l'effet combiné d'une diète riche en gras mais pauvre

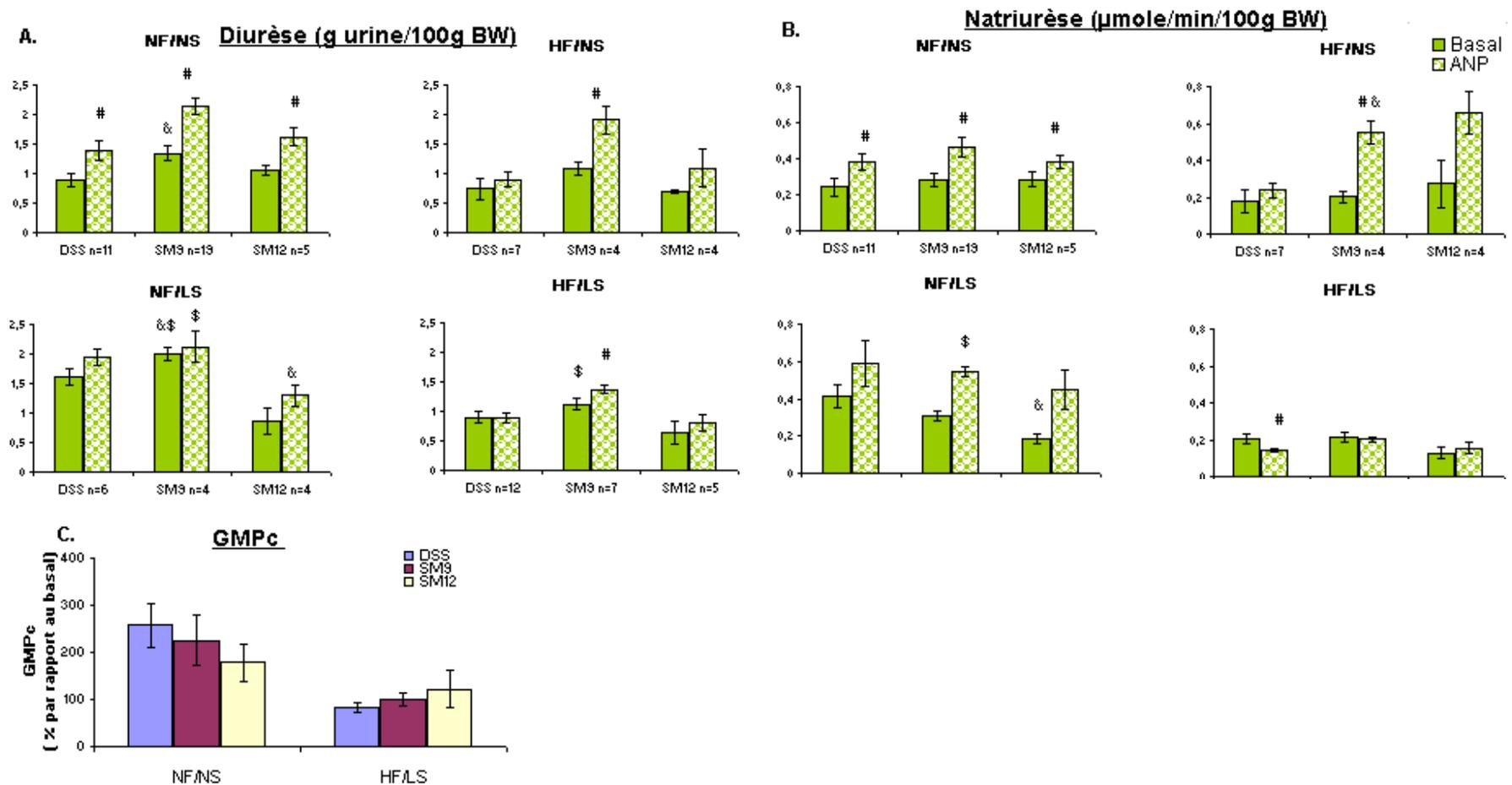


Figure 15: Réponse diurétique (A), natriurétique (B) et niveaux de GMPc urinaire (C) après stimulation par l'injection d'ANP suite à un gavage des rats DSS congéniques sur les diètes NF/NS, NF/LS, HF/NS et HF/LS. NFNS: "normal fat, normal salt"; NF/LS: "normal fat, low salt"; HF/NS: "high fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12; # $p < 0,05$ par rapport à la condition basale. Les statistiques (Fig 15 C) ne sont pas montrées du à la complexité de l'analyse statistiques.

en sel. Conséquemment, nous avons aussi noté une chute significative des niveaux de GMPc en réponse à l'ANP sous la diète HF/LS par rapport à la diète NF/NS (Figure 15C). Le GMPc est le second messenger produit par la guanylate cyclase après son activation par l'ANP et qui médie les réponses physiologiques telles que la diurèse et la natriurèse [4]. Nous pouvons comprendre facilement que l'apport en sel dans la diète puisse influencer la natriurèse et même la diurèse.

Une étude a montré que la diète riche en gras favorise la natriurèse et ce mécanisme pourrait être en lien avec l'augmentation de l'expression du co-transporteur Na-K-2Cl chez le rat Fisher 344 × Brown Norway [141]. Or, nous observons aussi une augmentation de la stimulation de la natriurèse en réponse à l'ANP sous diète HF/NS pour les souches SM9 et SM12. Nos expériences rapportent un premier cas d'inhibition de la natriurèse et de la diurèse en réponse à l'ANP par une diète riche en gras et pauvre en sel dont le mécanisme impliquerait une diminution de production de GMPc par la GCA en réponse à l'ANP. Ces résultats pourraient aussi être expliqués par une interférence dans l'action de l'ANP ou une réduction de l'activité de GCA.

Effet de la souche

Un des résultats les plus intéressants de cette portion du projet est la différence observée entre la souche SM9 par rapport aux souches DSS et SM12. La souche SM9 présente une plus forte réponse diurétique à la stimulation par l'ANP pour les deux diètes normales en sel et normale ou riche en gras (NF/NS et HF/NS) (Figure 15A). On note de plus, une diurèse de base plus élevée pour la souche SM9 sous les quatre diètes. Ceci est cohérent avec le fait que cette souche, contrairement aux deux autres, possède le récepteur de l'ANP,

la GCA provenant de la souche normotendue MNS. Plusieurs équipes dont la nôtre ont déjà montré que le rat DSS réagit peu aux effets natriurétiques et diurétiques de l'ANP [4]. Puisque GCA est le candidat le plus prometteur présent dans ce segment de chromosome, ceci confirme l'importance du gène de GCA dans le contrôle de la diurèse en réponse à l'ANP. Cette différence de souche est cependant moins claire pour la natriurèse. Ainsi, sous diète normale en sel et en gras, la natriurèse en réponse à l'ANP est légèrement plus élevée chez la souche SM9 alors que sous diète riche en gras et normale en sel, nous ne notons pas de différence entre les souches SM9 et SM12 qui toutes deux voient leur natriurèse, en réponse à l'ANP, augmentée par la diète riche en gras tel que rapporté [156]. Or physiologiquement, la natriurèse accompagne généralement la diurèse. Quelques cas montrant une dissociation de la diurèse et de la natriurèse ont été rapportés dans la littérature [102, 157]. Un analogue humain de l'ANP, le Met-O-ANF, peut stimuler la diurèse à des doses qui n'augmentent pas la natriurèse ou le GMPc [102]. La résistance rénale à l'ANP, caractérisée par la baisse de la capacité natriurétique est un phénomène lié à l'insuffisance cardiaque chronique [158]. Cette résistance à l'ANP pourraient être dues par exemple à 1) une diminution de la biodisponibilité de l'ANP qui dépendrait de NEP, 2) une modification de l'expression de GCA ou du récepteur de clairance, 3) une désensibilisation de GCA ou encore 4) une altération dans la transduction du signal [158]. Nous notons que la souche DSS a une réponse natriurétique et diurétique à l'ANP qui semble plus facilement inhibée que les souches SM9 et SM12 sous diète HF/NS. D'autre part, nos résultats ne montrent aucune différence entre les souches dans les concentrations de GMPc urinaire en réponse à la stimulation par l'ANP sous les deux diètes (Figure 15C). Afin de mieux comprendre le mécanisme de cette dissociation entre la diurèse et les taux de

GMPc urinaire, nous avons décidé de mesurer directement la stimulation aiguë de la GCA par l'ANP dans les glomérules isolés.

3.3.4 Stimulation de la guanylate cyclase par l'ANP dans les glomérules

Effet de la diète

Dans les glomérules isolés, nous avons noté une production accrue de GMPc en réponse à l'ANP pour tous les groupes de rats sous les deux diètes NF/NS et HF/LS (Figure 16). De plus, nous confirmons l'effet inhibiteur de la diète HF/LS sur la production de GMPc en réponse à l'ANP pour la souche DSS. Les glomérules isolés utilisés pour ces expériences sont intacts puisque leur purification à l'aide de tamis permet d'éliminer les glomérules endommagés ou fragmentés ex-vivo (120 μ m). Par opposition, les expériences mesurant la production de GMPc in vivo cumulent les effets de l'ANP sur d'autres éléments que les glomérules tels que les vaisseaux et les tubules en plus des glomérules sains et endommagés (in vivo). Tel que nous avons discuté précédemment, les analyses histopathologiques montrent bien un dommage glomérulaire chez les souches congéniques étudiées qui est accentué par la diète HF/LS particulièrement chez la souche DSS (Figure 14). D'autres travaux démontrent des dommages glomérulaires lors de l'administration de la diète HF chez le rat et la souris et tout semble indiquer que ces dommages pourraient moduler la réponse à l'ANP de la guanylate cyclase [153, 159, 160].

Effet de la souche

Sous diète normale, NF/NS, la stimulation de la guanylate cyclase est plus élevée chez la souche DSS que SM9 et SM12 alors que celle de SM12 s'est avérée être intermédiaire (Figure 16A). Le niveau de stimulation était de 13 fois pour la souche DSS alors qu'il est

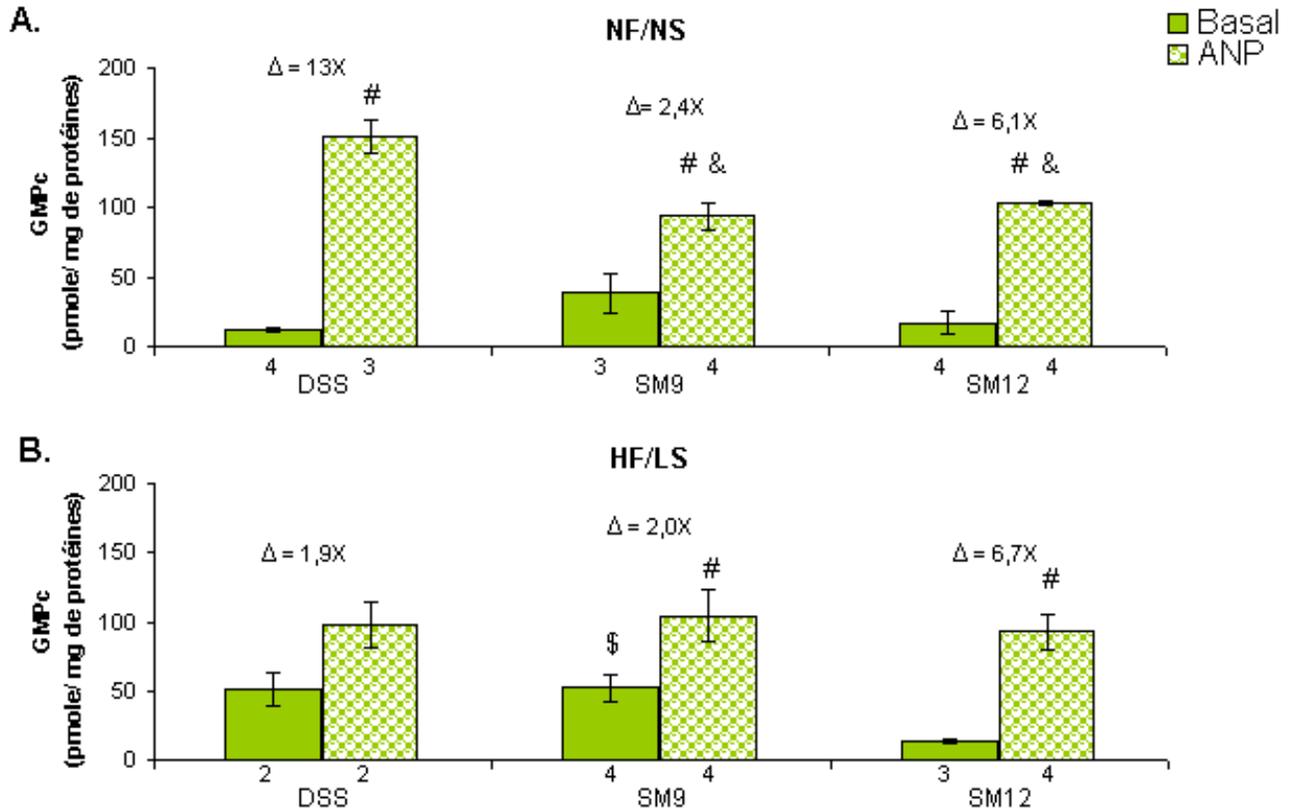


Figure 16 : Stimulation de la guanylate cyclase par l'ANP sur la diète NF/NS (A) et HF/LS (B) dans les glomérules isolés des rats DSS congéniques. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12; # $p < 0,05$ par rapport à la condition basale. La différence (Δ) entre la condition basale et l'ANP est indiquée au dessus des barres de l'histogramme.

respectivement de 6,1 et 2,4 fois pour les souches SM12 et SM9. En comparaison les glomérules des rats normotendus Wistar, Wistar-Kyoto, WKY et Sprague-Dawley, étaient stimulés environ 6 fois par une dose similaire d'ANP alors que chez la souche hypertendue SHR, la stimulation était d'environ 15 fois [104]. Malgré quelques différences méthodologiques dans la méthode de dosage du GMPc, l'ordre de grandeur de la stimulation de la guanylate cyclase demeure comparable entre les souches ou les diètes. Le comportement intermédiaire de la souche SM12 par rapport à SM9 et DSS, pourrait être expliqué par les différences génétiques entre ces souches. Le segment d'origine normotendue commun entre la souche SM12 et SM9, pourrait expliquer le phénotype. La différence entre DSS et les deux autres souches observées sous diète NF/NS est atténuée sous diète HF/LS.

Une réponse exagérée à l'ANP avait déjà été observée dans les glomérules de SHR par rapport à plusieurs souches normotendues et ce, avant que la souche ne devienne hypertendue suggérant l'importance du système de l'ANP dans la pathogénie de l'hypertension chez le rat SHR [104]. Nous observons le même phénomène pour le rat DSS sous diète normale, soit une relation inverse entre le niveau de stimulation de la GC par l'ANP et la pression artérielle. D'autre part, étant donné que la pression est plus élevée chez le rat DSS, nous estimons que des mécanismes dépendants du GMPc, pourraient être enclenchés pour contrer la hausse de la pression. Ainsi, la réponse de la guanylate cyclase à l'ANP serait plus élevée chez DSS comme mécanisme compensateur et le segment d'origine normotendue qui est présent dans les souches SM9 et SM12 pourrait expliquer la différence de l'activité de la guanylate cyclase par l'ANP différemment chez le rat DSS.

3.3.5 Expression de l'ARNm par PCR en temps réel

3.3.5.1 Expression de GCA/NprA et du récepteur de clairance NprC

Nous avons observé des niveaux d'ARNm de GCA et du ratio GCA/NprC dans le cortex ainsi que dans le tissu adipeux significativement plus faibles chez SM9 par rapport à DSS et SM12 sous diète normale (Figure 17). Cependant lorsque les rats sont sous diète HF/LS, la différence entre DSS et SM9 est grandement diminuée et même abolie principalement par une diminution du taux de ARNm de GCA par la diète chez DSS. Les résultats vont dans le même sens, pour le ratio GCA-Nprc suggérant que ce sont bien les niveaux de ARNm de GCA et non ceux de NprC qui sont affectés par la diète chez DSS. Quant à la souche SM12, ses taux de ARNm de GCA sont semblables à ceux de DSS sous diète normale mais sont affectés différemment par la diète HF/LS. Ils sont plus diminués que la souche DSS dans les glomérules et moins affectés par la diète que la souche DSS dans le tissu adipeux.

Ceci est très intéressant puisque cela met directement en perspective l'implication de GCA par rapport aux phénotypes observés dans cette étude. Mentionnons aussi la présence d'un nombre variable de répétitions TA, localisé à la position -943 du site d'initiation de la transcription, dans le promoteur du gène GCA pour expliquer la variation de l'expression inter-souche [86]. En effet, notre groupe a démontré que le rat hypertendu SHR possède 40 répétitions du dinucléotide TA, que le rat normotendu MNS duquel provient le segment chromosomique de la souche SM9, en possède entre 25 et 32 répétitions et finalement que le rat DSS ne possède que 10 répétitions [86]. Également, notre équipe a démontré que la transcription de GCA était négativement corrélée au nombre de répétitions TA dans son promoteur [104]. Pour faire le lien avec cette étude, nous avons séquencé la région du

promoteur contenant la région riche en répétitions du dinucléotide. Nos résultats démontrent que la souche SM12 qui contient GCA d'origine hypertendue ainsi que sa souche parentale DSS ont 10 répétitions du dinucléotide TA tandis que SM9, qui contient GCA originant de la souche normotendue MNS, en contient de 20 et 24 (Tableau 8). Ces résultats permettent d'établir une corrélation avec les taux d'ARNm de GCA ainsi que plusieurs phénotypes et ainsi, de démontrer plus concrètement l'implication du gène candidat GCA.

Souche	Nombre de répétition TA
DSS	10
SM9	entre 20-24 *
SM12	10

Tableau 8 : Nombre de répétitions du dinucléotide TA dans le promoteur du gène GCA déterminé par séquençage de la région avec des amorces spécifiques. * L'imprécision pour la souche SM9 provient du fait que l'ADN polymérase amplifie difficilement des régions riches en répétitions rendant le compte difficile à préciser avec certitude.

En somme, le patron d'expression de GCA dans le tissu adipeux et le cortex rénal est cohérent avec le nombre de répétitions TA et permet d'expliquer plusieurs des phénotypes observés.

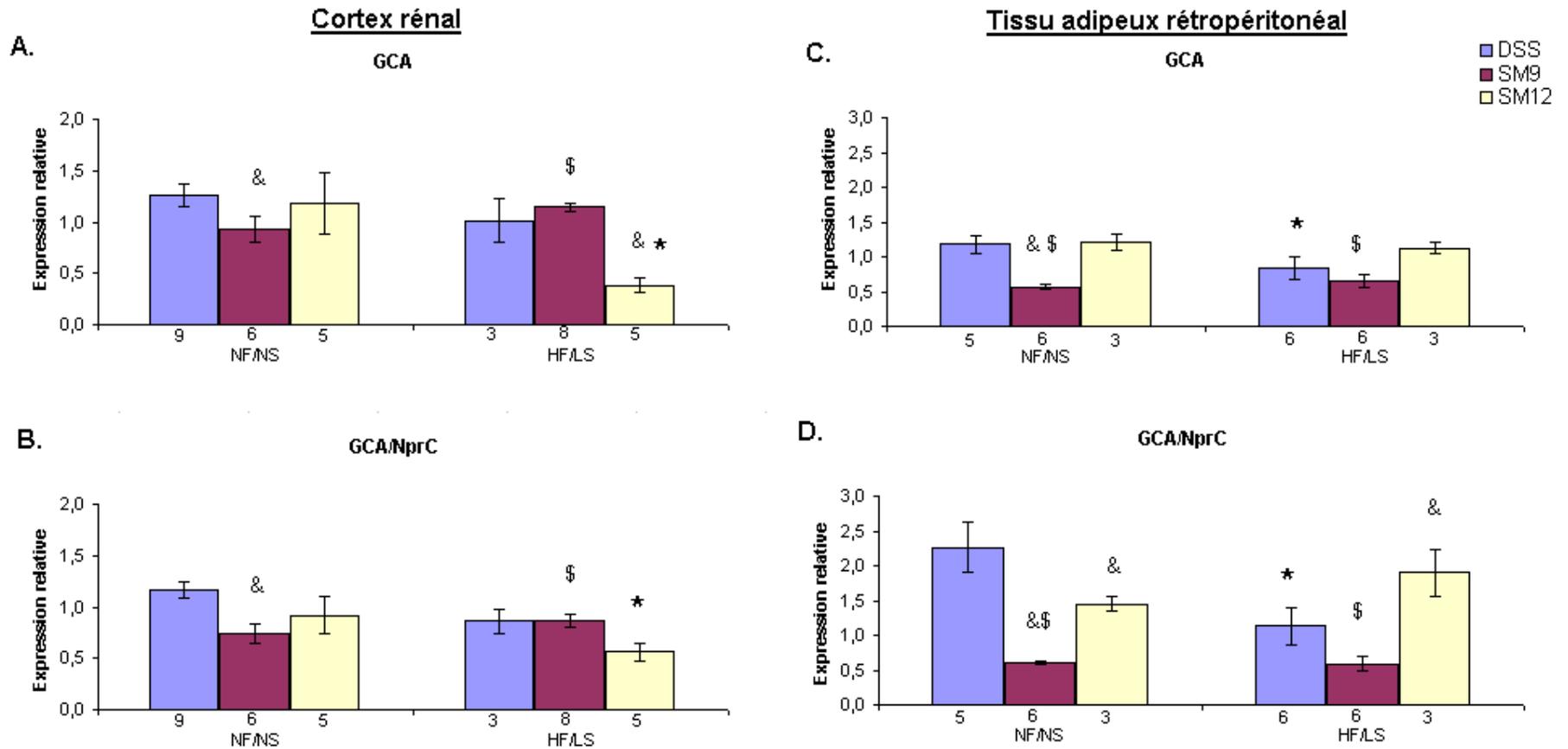


Figure 17 : Expression relative de l'ARNm de GCA et du ratio GCA/NprC sur la diète NF/NS et HF/LS dans le cortex glomérulaire (A, B) et dans le tissu adipeux rétropéritonéal (C, D) des rats dahl congéniques. Les données ont été normalisées par la β -actine. NF/NS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NF/NS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12. Le nombre de rats par groupe est indiqué sous les barres de l'histogramme.

3.3.5.2 Expression de l'ANP dans les oreillettes et les ventricules

Effet de la diète

Nos résultats démontrent clairement une baisse significative (ANOVA à deux facteurs) de l'expression de l'ARNm du pré-pro-ANP dans l'oreillette et dans le ventricule lors de la diète HF/LS et ce pour toutes les souches (Figure 18 A-B). L'oreillette est le site principal de synthèse de l'ANP. La production d'ANP est stimulée par une surcharge volémique; par son action vasodilatatrice, la libération d'ANP vise à réagir à la hausse de la pression artérielle. Nous avons observé une légère diminution de la pression artérielle par la diète HF/LS (Figure 9). Ainsi, les niveaux d'ARNm du pré-pro-ANP varient dans le même sens que la pression artérielle. Les taux de l'ARNm de GCA et de GCA/NprC ont tendance à diminuer sous diète HF/LS (Figure 17 B, D) suggérant que l'activité du système ANP/GCA/GMPc serait atténuée par une diète riche en gras et faible en sel. Les niveaux de GMPc urinaire après stimulation par l'ANP vont également dans ce sens (Figure 16). D'autre part, l'expression de l'ANP dans le ventricule est un marqueur de l'hypertrophie cardiaque bien utilisé mais des questionnements à savoir si l'expression de l'ANP reflétait la pression artérielle plutôt que l'hypertrophie cardiaque, sont survenus récemment [4, 156, 162]. Ainsi, l'ANP étant anti-hypertrophique, nos données d'expression suggèrent une plus grande susceptibilité à l'hypertrophie cardiaque pour les rats sur la diète HF/LS (Figure 18) [163].

Effet de la souche

Les taux de d'ARNm du pré-pro-ANP dans les oreillettes ne sont pas différents entre les souches sous diète normale (Figure 18A). Par contre, les taux sont plus élevés chez la souche SM9 que DSS et SM12 sur la diète HF/LS. Chez l'humain, il a été démontré que

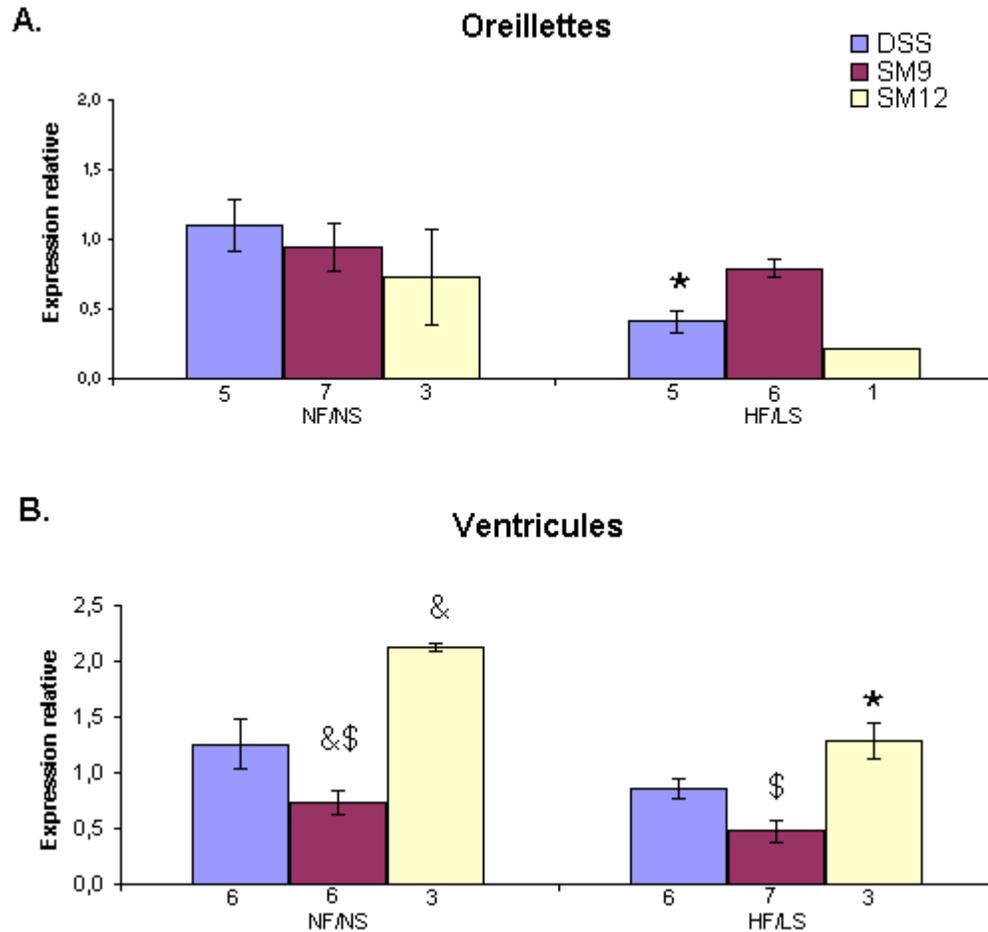


Figure 18 : Expression relative de l'ARNm du pré-pro-ANP dans les oreillettes (A) et les ventricules (B) des rats congéniques lors de la diète NF/NS et HF/LS. Les données ont été normalisées par la β -actine. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12. Le nombre de rats par groupe est indiqué sous les barres de l'histogramme.

l'ANP plasmatique était plus élevé chez les obèses normotendus que chez les obèses hypertendus [164]. Considérant que la souche SM9 a une pression plus basse que DSS même sur la diète HF/LS (Figure 9), les niveaux d'ARNm du pré-pro-ANP dans l'oreillette appuient cette différence rapportée chez l'humain. De plus, nos résultats indiquent que pour les diètes HF/LS et NF/NS l'expression du pré-pro-ANP dans les ventricules est significativement supérieure pour les souches SM12 et DSS par rapport à la souche SM9 (Figure 18B). Ces résultats vont dans le sens d'une pression moins élevée et d'une protection contre l'hypertrophie pour la souche SM9. En somme, les différences dans les niveaux de pré-pro-ANP dans les ventricules sont intéressantes et méritent d'être étudiées plus en détail. La section suivante (3.4 Fonction cardiaque) présente le sommaire de nos données pour évaluer l'hypertrophie cardiaque chez les souches congéniques. L'expression de différents marqueurs de l'hypertrophie cardiaque sera évaluée et des coupes histologiques des ventricules seront analysées afin d'évaluer si des différences entre les souches et entre les diètes sont présentes. L'hypertrophie cardiaque pathologique est généralement associée à l'hypertension artérielle.

3.4 Fonction cardiaque

3.4.1 Marqueurs de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose

Effet de la diète

Plusieurs gènes peuvent être utilisés comme marqueurs de la fonction cardiaque et indiquer un état d'insuffisance, de défaillance, d'hypertrophie cardiaque ou de fibrose [77, 165, 166]. Avec la diète HF/LS, nos résultats démontrent que l'expression des marqueurs SERCA2, chaîne lourde bêta de la myosine (β -MHC) et TGF- β 1 a tendance à diminuer (Figure 19). Pour la souche DSS, la baisse est significative pour tous les marqueurs mais

pour la souche SM12, la diminution n'est significative que pour 2 d'entre-elles et aucun résultat n'est significatif pour SM9 malgré qu'une tendance soit observée (Figure 19 A-C). L'hypertrophie cardiaque peut être bénéfique par exemple si un remodelage physiologique survient à la suite d'un mécanisme compensatoire chez l'athlète qui s'entraîne pour augmenter son endurance ou sa force musculaire [167]. L'hypertrophie pathologique peut être concentrique si c'est un stimulus de surcharge pressive comme l'hypertension artérielle qui l'initie : le cœur aura de petites cavités et des parois ventriculaires épaisses [166]. Par opposition, l'hypertrophie excentrique est stimulée par une surcharge volémique et les cavités sont plus grandes et les parois sont minces [166]. L'hypertrophie concentrique est aussi caractérisée par l'augmentation de la taille des myocytes, par la fibrose interstitielle, et une surexpression des gènes fœtaux tels que l'ANP, le BNP et le β -MHC [166]. Une diminution de l'expression de SERCA2 et une augmentation du gène β -MHC sont bien documentés pour être associés à une augmentation de l'hypertrophie cardiaque alors que l'augmentation de l'expression de TGF- β 1 indique la fibrose [77, 166, 167, 168]. Nos résultats sont donc contradictoires dans le sens que le marqueur SERCA2 indique un effet néfaste de la diète HF/LS alors que le β -MHC lui procurerait un effet plutôt bénéfique. Ces résultats sont également ambigus puisque nous avons répertorié des effets bénéfiques convaincants de la diète HF/LS sur les taux de cholestérol mais d'autres tels que le gain de poids, le score de dommage rénal étaient des effets néfastes. L'expression de d'autres marqueurs de l'hypertrophie cardiaque pourrait être évaluée, particulièrement ceux qui permettent de différencier l'hypertrophie pathologique et l'hypertrophie physiologique (ex : Nab1). Les études qui voulaient vérifier l'effet d'une diète riche en gras sur l'hypertrophie cardiaque ont des résultats mitigés. Chez l'humain, l'obésité morbide est associée à la cardiomyopathie où l'on observe un remodelage du ventricule gauche, soit une plus grande

chambre et une paroi ventriculaire plus épaisse et cette hypertrophie a également été qualifiée d'hybride ou d'excentrique-concentrique [168- 170].

Une étude a démontré que chez le rat, la diète faible en gras et en sel semble plus bénéfique au niveau de l'hypertrophie que la diète riche en gras mais faible en sel [171]. Par contre, la diète riche en gras était plus favorable que la diète faible en gras lorsque la teneur en sel était importante [171]. Effectivement, d'autres études sur le sujet ont montré que le rat DSS sur une diète riche en gras avait une hypertrophie du ventricule gauche réduite et une seconde a démontrée qu'une diète riche en gras mais faible en glucide réduisait l'hypertrophie chez le rat Wistar [172, 173]. En somme, la littérature ne démontre pas d'effet clair de la composante lipidique sur l'hypertrophie mais plusieurs composantes de la diète semblent intervenir et interagir de manière à moduler la fonction cardiaque. Il est également reconnu que le sel induit l'hypertrophie cardiaque et ce, même avant que l'hypertension ne se développe [174]. Il a été démontré que les voies de signalisation ANP/GCA/GMPc étaient bien activées dans le cardiomyocyte néonatal permettant à PKG-1 d'activer le phospholamban qui peut ensuite réguler l'activité de SERCA2 pouvant ainsi moduler la contraction cardiaque [175, 176]. Ceci devient d'autant plus intéressant sachant que nos résultats ont également démontré que l'expression du pré-pro ANP dans les ventricules et les oreillettes est plus basse lors de la diète HF/LS. En ce sens, il devient plus convaincant, que l'expression plus faible de l'ANP soit occasionnée par la diète HF/LS qui active moins la voie PKG-1 et que cela ait comme conséquence une expression moindre de SERCA2, tel que nous avons démontré. D'autre part, soulignons que la différence d'expression entre les deux diètes n'est peut-être pas assez importante pour procurer une différence au niveau de la fonction cardiaque. Le groupe du Dr Okere a publié

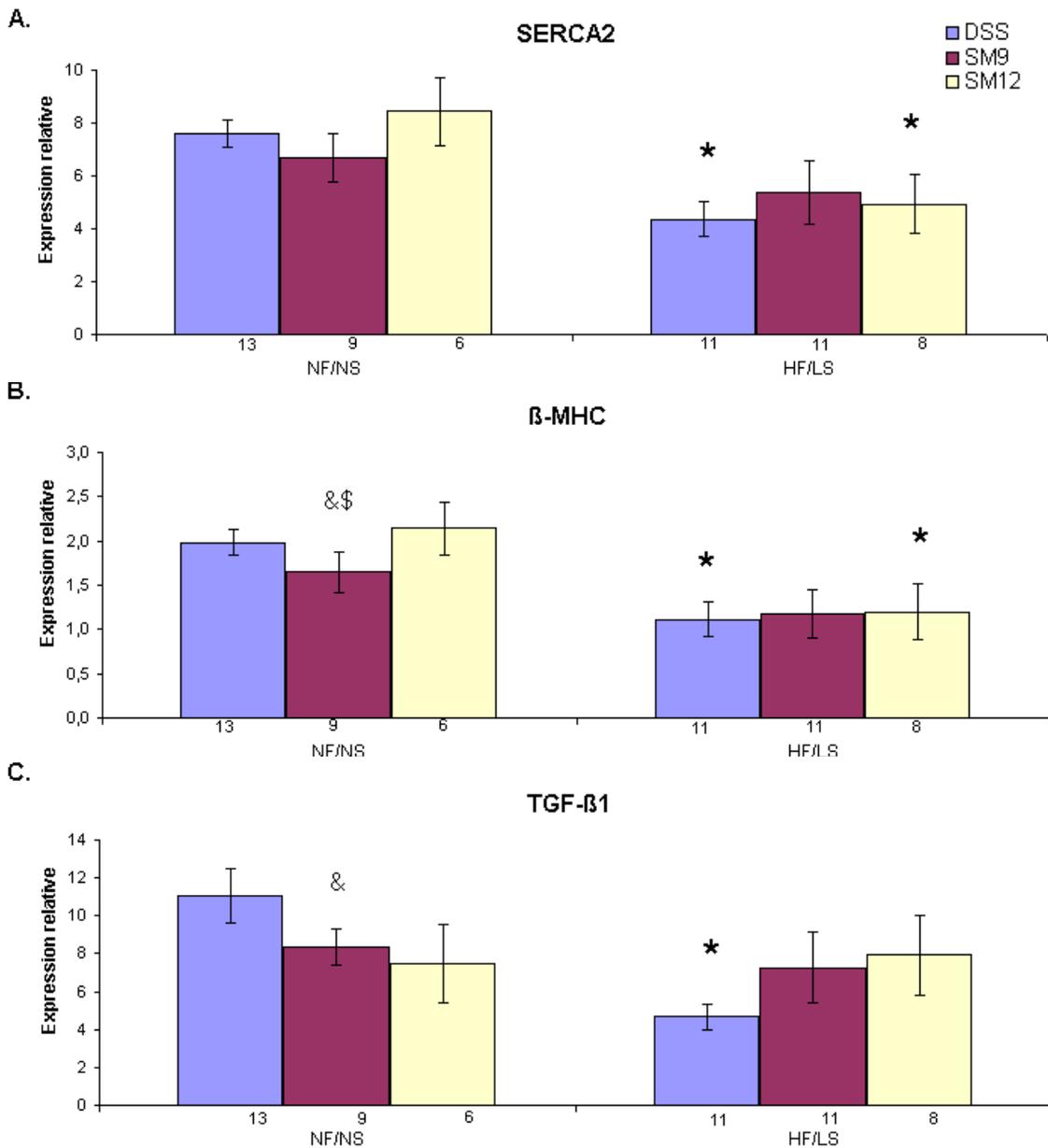


Figure 19 : Expression relative de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque (A, B) et de la fibrose (C) dans les ventricules sur la diète NF/NS et HF/LS. Les données ont été normalisées par la β -actine. NFNS: "normal fat, normal salt"; HFLS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12. Le nombre de rats par groupe est indiqué sous les barres de l'histogramme.

l'effet d'une diète riche en gras mais faible en sel chez le rat DSS, soit un contexte expérimental similaire à notre étude [171]. Les différences entre les diètes pour les niveaux d'ARNm de l'ANP du ventricule étaient de l'ordre de 3 fois, étant suffisant pour percevoir des différences au niveau de l'aire de section des myocytes [171], alors que nos différences sont d'environ 1,5 fois. Ces résultats indiquent des signes précurseurs de l'hypertrophie cardiaque. Une période de diète prolongée pourrait peut-être accentuer ces effets. Généralement, les études ayant comparé l'effet d'une diète riche en gras variaient entre 10 et 16 semaines alors que notre étude n'était que de 4 semaines [171-173, 1781].

Effet de la souche

Nous avons observé que l'expression de la β -MHC et du TGF- β 1 étaient significativement plus basses pour la souche SM9 par rapport à DSS sur la diète NF/NS seulement (Figure 19 B-C). Ceci témoigne que la souche SM9 ait moins de fibrose et d'hypertrophie cardiaque que la souche DSS sur la diète NF/NS mais que cet effet est perdu lors de la diète HF/LS. Nous avons également observé que la masse relative des ventricules et des oreillettes de SM9 était significativement plus petite que celle de DSS sur la diète NF/NS (Figure 8 FH). De plus, nous avons également noté que l'expression ventriculaire de l'ANP de la souche SM9 était significativement plus basse que celle de DSS sur la diète NF/NS (Figure 18 B). Ainsi, ces données suggèrent que le segment chromosomique inséré dans la souche SM9 lui procurerait une protection contre l'hypertrophie cardiaque mais seulement sous diète NF/NS. Encore une fois, cette différence pourrait s'expliquer par une différence de pression artérielle entre les souches SM9 et DSS.

3.4.2 Morphométrie comparée du cœur

Effet de la diète

Nous avons évalué sur des coupes transversales, la morphométrie du cœur pour déterminer s'il y avait les différences entre les souches ou entre les diètes. Nos résultats montrent une diminution de la cavité, une augmentation de l'épaisseur de la paroi libre et une augmentation de l'aire du tissu du ventricule gauche lorsque les valeurs ont été normalisées par l'aire de surface (Figure 20 A, C) pour la souche SM9 sous diète HF/LS. La souche SM9 semble être plus prédisposée à devenir obèse par rapport aux autres souches lorsqu'on évalue le ratio masse adipeuse/masse maigre et ceci pourrait expliquer le rapport poids du cœur/poids corporel (Figure 8). Par contre, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les diètes au niveau de l'aire de section des myocytes (Figure 20B). L'hypertrophie cardiaque concentrique est la forme d'hypertrophie généralement associée à l'obésité sévère mais des formes d'hypertrophie excentrique ont également été répertoriées, d'où le terme hypertrophie hybride ou excentrique-concentrique que certains préfèrent employer [179- 182, 168]. Il est aussi à considérer que lors du développement de l'hypertrophie du ventricule gauche, la taille des myocytes augmente pour réduire la surcharge pressive qui induit un stress sur la paroi ventriculaire et que de façon concomitante, l'expression des marqueurs de l'hypertrophie qui modulent des voies de signalisation cellulaire et augmentent la synthèse protéique qui permettra aux cardiomyocytes de prendre de l'expansion [183]. Successivement, l'hypertrophie des myocytes aboutit à l'hypertrophie du ventricule gauche [183]. Nos données de morphométrie macroscopique ne varient pas dans le même sens que l'hypertrophie cellulaire. Plusieurs études ont souligné l'importance d'une normalisation adéquate de certaines valeurs anthropométriques [184]. Certaines valeurs anthropométriques varient

effectivement avec la taille d'un individu (ex : les dimensions du cœur et du cerveau), alors que d'autres, telles que la pression artérielle ou le taux de LDL, varient plutôt avec la masse corporelle [184]. Une méthode de correction appropriée est essentielle pour l'interprétation de nos phénotypes, la correction par la masse corporelle pouvant ne pas être suffisante. Nous avons démontré que la composition corporelle variait entre les souches (ratio masse adipeuse/masse maigre) mais également avec la diète. La normalisation par l'aire de surface pourrait expliquer les différences dans la morphométrie cardiaque alors qu'aucune différence n'a pu être observée pour la taille des myocytes avec la diète. Puisque logiquement des différences au niveau de la taille des myocytes doivent survenir avant les changements macroscopiques, nous pouvons conclure que la diète HF/LS n'a pas modulé la morphométrie cardiaque. De plus, nous expliquons la tendance à la baisse de certains des paramètres macroscopiques lors de la diète HF/LS par la différence de masse corporelle qui influence la masse du cœur.

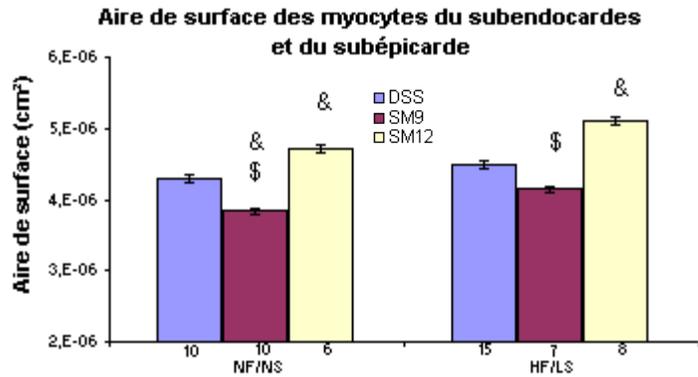
Effet de la souche

Il y semble avoir des différences au niveau de la morphométrie cardiaque entre la souche SM9 et les souches DSS et SM12. Les myocytes de SM9 sont de

A.

	Souche et Diète					
	NF/NS			HF/LS		
	DSS (n=9)	SM9 (n=10)	SM12 (n=5)	DSS (n=9)	SM9 (n=9)	SM12 (n=8)
Cavité du VG/aire de surface VG	0,245 ± 0,009	0,239 ± 0,017	0,250 ± 0,012	0,230 ± 0,008	0,191 ± 0,015 &*	0,244 ± 0,018
Épaisseur de la paroi libre/aire de surface du VG (cm/cm²)	0,315 ± 0,006	0,322 ± 0,012	0,305 ± 0,009	0,329 ± 0,012	0,369 ± 0,011 &*	0,364 ± 0,018 &*
Épaisseur du septum/aire de surface du VG (cm/cm²)	0,251 ± 0,008	0,255 ± 0,009	0,238 ± 0,015	0,263 ± 0,008	0,285 ± 0,013	0,297 ± 0,016 &*
Tissu VG/aire de surface VG	0,755 ± 0,009	0,761 ± 0,017	0,750 ± 0,012	0,770 ± 0,008	0,809 ± 0,015 &*	0,776 ± 0,018
aire de surface VG (cm²)	0,833 ± 0,033	0,829 ± 0,026	0,850 ± 0,030	0,805 ± 0,022	0,771 ± 0,020	0,786 ± 0,049
Masse relative de l'oreillette gauche (g/100 g BW)	0,297 ± 0,00048	0,284 ± 0,00030 &	0,272 ± 0,00043	0,283 ± 0,00039	0,265 ± 0,00015 &§	0,275 ± 0,00087 &

B.



C.

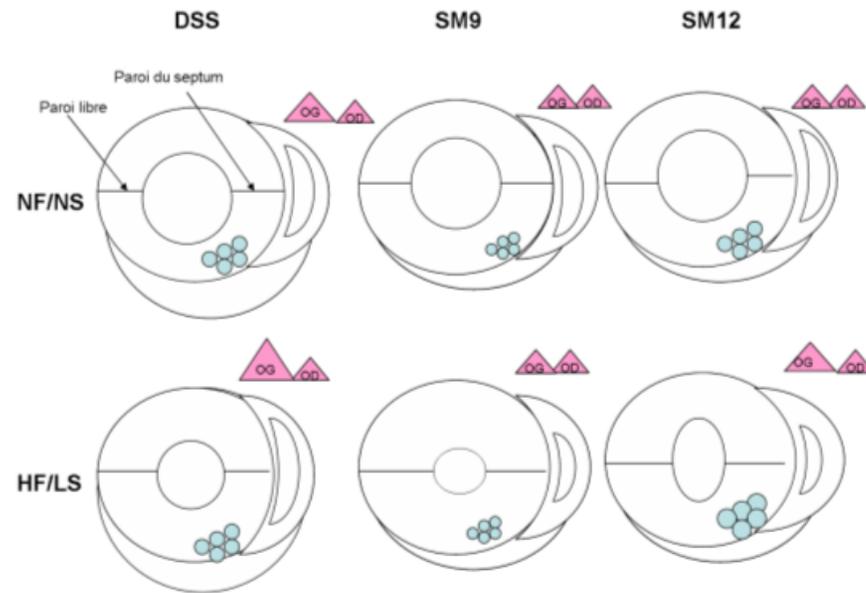


Figure 20 : Morphométrie cardiaque (A) et aire de surface des myocytes du subendocarde et du subépicarde (B) et schéma des coupes de coeur (C) chez les rats congéniques lors de la diète NF/NS et HF/LS. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * p<0,05 par rapport à la diète NFNS; & p<0,05 par rapport à la souche DSS; § p<0,05 par rapport à la souche SM12. L'aire de section de 60 myocytes pour chacune des coupes a été mesurée.

plus petite taille que DSS et SM12 sur les diètes NF/NS et HF/LS (Figure 20B). Ce constat demeure vrai avec ou sans normalisation par l'aire de surface du ventricule gauche. Au niveau de la morphométrie macroscopique cette même tendance est observée et est significative entre les souches SM9 et DSS lors d'une diète HF/LS. Les marqueurs d'hypertrophie β -MHC et ANP sont diminués significativement chez la souche SM9 lors de la diète NF/NS. Considérant que nos résultats ont démontré une pression plus faible chez SM9 par rapport à celle de DSS sur diète NF/NS et sachant que l'hypertension induisant une surcharge pressive est un stimulus de l'hypertrophie cardiaque concentrique, il en découle que la souche SM9 est favorisée par rapport à plusieurs paramètres de la morphométrie cardiaque. Nous avons administré la diète pendant une période de seulement 4 semaines cependant, tout porterait à croire que ces phénotypes s'accroîtraient avec une prolongation de la diète. Or, il a été mentionné que l'hypertrophie du ventricule gauche et l'hypertension artérielle exercent surcharge pressive ayant comme conséquence physiologique l'élargissement de l'oreillette gauche [185-187]. D'autre part, la surcharge pressive et volémique a été caractérisée chez les obèses hypertendus ce qui pourrait donc aussi provoquer un élargissement de l'oreillette gauche [169, 188]. Nos résultats indiquent que l'élargissement de l'oreillette gauche origine plutôt d'une surcharge pressive puisque nous n'avons noté aucune différence significative entre les diètes au niveau de leur masse relative (Figure 20A). Néanmoins malgré la correction des valeurs concernant la dimension cardiaque, les marqueurs d'hypertrophie cardiaque et la pression ne sont pas influencés par la masse corporelle ce qui appuie nos données morphométriques. De plus, les différences de masse corporelle entre les souches ne sont pas aussi importantes que celles observées lors de la diète HF/LS. Finalement, il est physiologiquement cohérent que l'hypertrophie de la souche SM9 soit moindre considérant que sa pression est plus faible. Afin d'expliquer

les différences génétiques qui pourraient être à la base de ces différences, rappelons que la souche SM9 possède le gène candidat GCA de provenance normotendue ce qui n'est pas le cas pour la souche DSS. La souche SM12, qui possède la forme hypertendue de GCA a un comportement intermédiaire à SM9 et DSS, quoique parfois plus similaire à DSS. Le ligand de GCA, l'ANP est impliqué à plusieurs niveaux dans les pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertrophie cardiovasculaire [62, 79, 163, 189]. Dans des expériences où GCA a été éliminée par KO, les animaux avaient une augmentation de l'hypertrophie ventriculaire gauche et à l'inverse lorsque GCA était surexprimé, la taille des cardiomyocytes était fortement diminuée [163]. L'ANP, par l'intermédiaire de son récepteur GCA, a plusieurs implications au niveau de la cardioprotection. En plus d'avoir un rôle anti-hypertrophique indépendant de son rôle anti-hypertensif, GCA a aussi un effet inhibiteur contre le système RAAS intracardiaque [79]. Des essais de thérapie génique ayant délivré l'ANP chez le rat DSS, dont l'hypertrophie cardiaque était induite par une diète à teneur élevée en sel, ont démontré une nette diminution de la taille des myocytes [62]. Par l'intermédiaire de GCA, l'ANP intervient également au niveau de la contractilité du cœur mais les données de la littérature sont contradictoires à savoir si l'effet est inotropique ou non [189]. L'expression de l'ANP est compensatoire et augmente avec la sévérité du dommage cardiaque qui passe généralement de l'hypertrophie ventriculaire vers l'infarctus du myocarde menant aux complications souvent terminales de défaillance cardiaque [79].

Pour résumer, nous avons démontré une différence, entre la souche SM9 par rapport à DSS et SM12, au niveau de la morphométrie qui correspondait à la variation des marqueurs d'hypertrophie et aux autres données physiologiques que nous avons recueillies. Cette

différence était présente particulièrement sous diète NF/NS et dans une moindre mesure sous diète HF/LS. La différence génétique entre ces souches, principalement au niveau de GCA, est une piste non négligeable pour expliquer ce phénomène.

3.4.3 Fibrose

Effet de la diète

Nos résultats n'indiquent aucune tendance ou différence dans la fibrose cardiaque entre les diètes (Figure 21). La fibrose interstitielle vient de pair avec l'hypertrophie concentrique mais certaines formes d'hypertrophie pathologique ne sont pas associées à la fibrose [166]. Nous n'avons pas détecté de variation au niveau de la morphométrie cardiaque avec la diète HF/LS, ce qui va dans le même sens que la fibrose. Une étude ayant démontré un effet pro-hypertrophique de la diète riche en gras, a également soulevé la présence de fibrose mais de moindre importance [168]. Nos résultats indiquent une tendance à la baisse de l'expression de TGF- β 1 lors de la diète HF/LS (Figure 19C). Le TGF- β 1 est un facteur stimulant la prolifération de la matrice extracellulaire et par le fait même pro-fibrotique [190]. Lors d'un stimulus pathologique, les fibroblastes du myocarde produisent de manière trop abondante des protéines de la matrice extracellulaire, qui s'accumulent et contribuent à la rigidité, nuisant à la contractilité cardiaque [166]. Le TGF- β 1 pourrait indiquer que les rats sur la diète HF/LS sont moins susceptibles à la fibrose et qu'avec une prolongation de la diète, les rats nourris avec la diète NF/NS développeraient progressivement la fibrose. La détection de la fibrose par quantification avec le logiciel Photoshop est probablement moins sensible que les marqueurs de fibrose [174], ceci pourrait expliquer l'ambiguïté des résultats. Une étude, abordée précédemment, qui avait la particularité d'avoir des conditions de diètes similaires à la nôtre, a également démontré

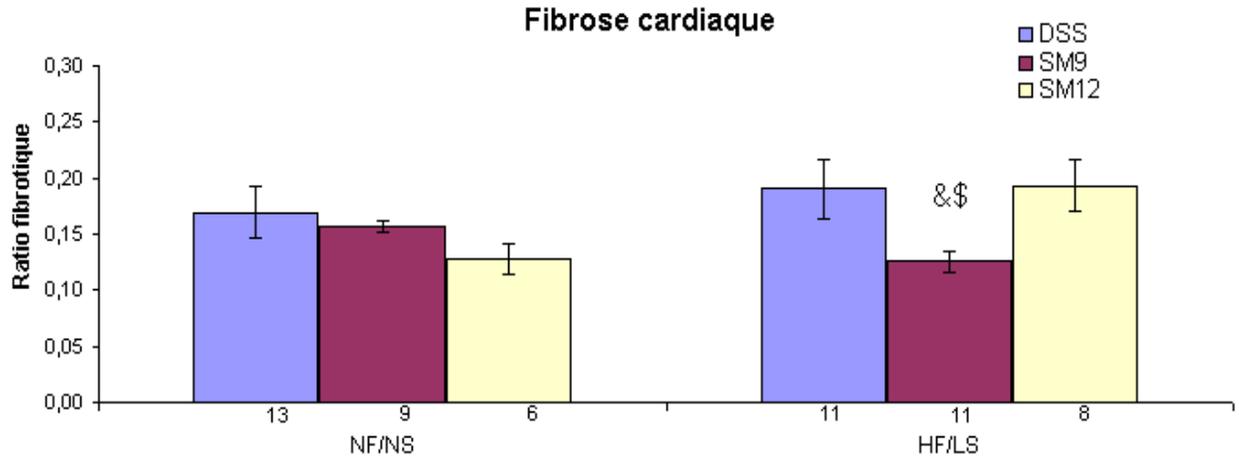


Figure 21 : Fibrose cardiaque déterminée d'après une coloration Trichrome de Masson dans les tissus subendocardique, subépicardique et midmyocardique par quantification avec Photoshop chez les rats congéniques lors de la diète NF/NS et HF/LS. Cinq photos par zone et par coupe pour chacun des groupes de rats ont été analysées. NFNS: "normal fat, normal salt"; HF/LS: "high fat, low salt"; Statistiques ANOVA à un facteur, test de Fisher; * $p < 0,05$ par rapport à la diète NFNS; & $p < 0,05$ par rapport à la souche DSS; \$ $p < 0,05$ par rapport à la souche SM12.

une différence au niveau des marqueurs sans être capable de démontrer une différence au niveau de la fibrose [171]. N'excluant pas des résultats différents sur diète prolongée, nous n'avons observé aucune variation au niveau de la fibrose.

Effet de la souche

La fibrose n'était pas différente entre les souches sur la diète NF/NS alors que SM9 semblait moins fibrotique que ses congénères sur la diète HF/LS (Figure 21). La quantification de la fibrose s'est révélée être une méthode problématique. Des ajustements techniques de la coloration contribueraient à l'analyse de la fibrose. Nos limitations ne nous ont pas permis d'arriver à une conclusion. Des efforts seront apportés.

3.5 Analyses des gènes *in silico*

3.5.1 Diagramme de Venn

Bien que nos hypothèses initiales étaient basées sur trois gènes candidats principaux, il est possible que d'autres gènes présents dans les mêmes segments chromosomiques ou des segments adjacents puissent contribuer aux phénotypes observés. D'ailleurs, la souche SM12 présentait fréquemment des phénotypes intermédiaires entre SM9 et DSS. Tous les effets observés ne sont peut-être pas dus uniquement à l'action directe ou indirecte d'un gène. Nous avons répertorié tous les gènes contenus dans les segments chromosomiques des souches congéniques. À l'aide des marqueurs génétiques qui déterminent les extrémités des segments et à l'aide de la base de données provenant du séquençage du génome de *Rattus norvegicus* (Rat genome database), la liste de ces gènes a été établie (Figure 3). Avec les connaissances actuelles en physiologie, biologie moléculaire et cellulaire, nous

avons fait des liens par rapport aux gènes recensés et les phénotypes présentés dans ce travail.

La classification des gènes, à l'aide d'un diagramme de Venn, a permis d'ordonner les gènes par rapport à leur origine afin de mieux discerner leur impact probable sur les phénotypes. Bien que nos hypothèses de départ se voulaient axées plutôt sur le gène candidat GCA, une réponse dichotomique en physiologie est rarissime de par la complexité des mécanismes de signalisation cellulaire, des interactions protéine-protéine qui demeurent toujours non-identifiées et de nos méconnaissances de la fonction de nombreuses protéines. La disposition des gènes d'origine normotendue (Figure 22A) ou hypertendue (Figure 22B) par rapport aux souches congéniques et à leur souche parentale y sont illustrés.

Les sections suivantes présentent quelques gènes présents dans les segments chromosomiques dans les fonctions pouvant expliquer les différents phénotypes entre les souches.

3.5.1.1 Différence entre SM9 et SM12 par rapport à DSS

3.5.1.1.1 Le récepteur de l'ANP, GCA comme candidat principal

L'importance physiologique de GCA a été décrite à maintes reprises par rapport aux différents systèmes que nous avons explorés dans ce mémoire. GCA a une fonction importante dans le système rénal, cardio-vasculaire et même par rapport à l'obésité ce qui se traduit par son expression dans de nombreux tissus [191]. D'où l'intérêt d'étudier ce gène dans un contexte de syndrome métabolique induit par une diète riche en gras chez le

rat DSS. Les résultats de séquençage de GCA chez le rat DSS et MNS montrent une différence au niveau de leur promoteur mais aucune au niveau de la région codante [161]. Les différences que nous avons rapportées au niveau de l'expression de GCA entre les souches pourraient, du moins en partie, expliquer les différences physiologiques que nous avons observées entre les souches.

3.5.1.1.2 Canal d'hyperpolarisation activé par les nucléotides cycliques, HCN3

Les canaux HCN1-4 jouent un rôle important pour l'activité des pacemakers cardiaques [192]. Le canal HCN3 est le moins bien connu des quatre mais il a été caractérisé récemment [192]. L'ARNm de HCN3 a été détecté au niveau du ventricule cardiaque sans que sa protéine puisse être décelée, ce qui suggère une faible expression dans ce tissu et que HCN3 n'est pas l'isoforme principale au niveau du cœur [192, 193]. HCN3 a une activation moins rapide que ses homologues. Contrairement aux autres canaux HCN, les nucléotides cycliques tels que le GMPc et l'AMPc inhibent le courant engendré par son canal lui conférant une réponse unique aux nucléotides cycliques [192]. Les myocytes peuvent moduler certaines de leurs propriétés électrophysiologiques comme l'augmentation de leur potentiel d'action lors d'état pathologique incluant l'hypertrophie ou la défaillance cardiaque [194]. Une augmentation du courant d'hyperpolarisation au niveau des ventricules pourrait être associée à différentes pathologies cardiaques dont l'hypertrophie cardiaque [192]. Chez les congéniques, l'activation de HCN3 se fait probablement différemment entre les souches SM12 et DSS par rapport à SM9. Un type de protéine effectrice de GCA, de par l'action du GMPc, est l'activation de canaux activés par les nucléotides cycliques. Nos résultats démontrent une différence entre les souches au niveau de l'hypertrophie cardiaque, qui semble plus convaincante au niveau cellulaire

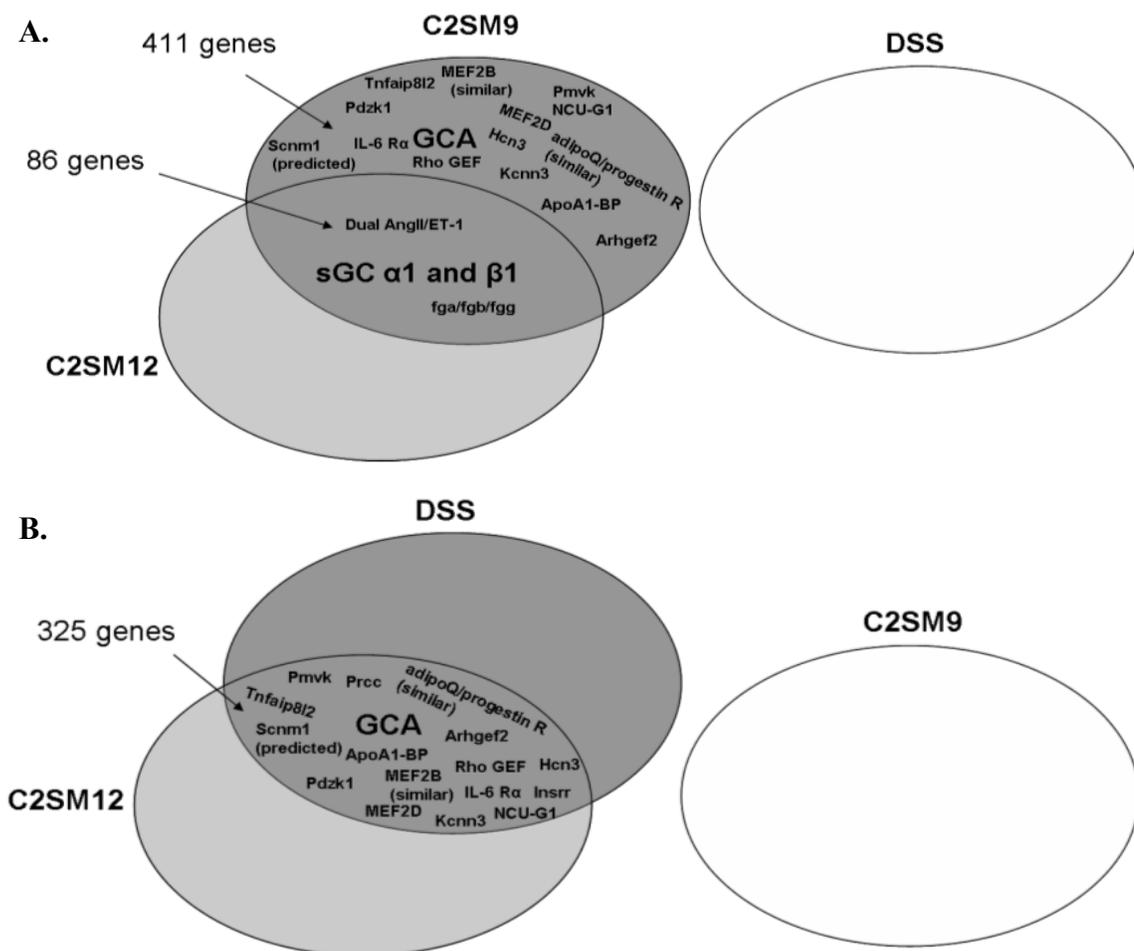


Figure 22 : Diagramme de Venn montrant les gènes normotendus (A) et hypertendus (B) communs entre les souches congéniques et la souche parentale DSS.

(Figure 20-22) et varie dans le même sens que l'origine génétique de ces souches; l'étude de l'implication de HCN3 est à poursuivre.

3.5.1.1.3 Les facteurs de transcription MEF2B et MEF2D

Les facteurs de transcriptions MEF2 (acronyme provenant du terme anglais : « myocyte enhancer factor ») régulent l'expression des gènes dans le tissu cardiaque durant le développement [195]. MEF2A et MEF2D forment des hétérodimères exprimés dans le cœur mature [195]. La délétion de MEF2D chez la souris provoque une réponse anormale au stress et les souris KO sont atteintes d'hypertrophie cardiaque et de fibrose menant à des cardiomyopathies sévères [195]. Le segment chromosomique de SM9 contient MEF2D et un gène apparenté à MEF2B qui provient de la souche MNS mais celle de SM12 est d'origine de DSS. Connaissant la complexité de la régulation de certains facteurs de transcription : un contexte différent entre les souches, qu'il soit génétique ou environnemental, pourrait certainement être responsable d'une divergence au niveau de la régulation de l'expression des gènes. Ainsi, la perturbation d'un système par la modification de l'expression de certains gènes, pourrait avoir un impact sur l'hypertrophie cardiaque mais également sur la pression artérielle. L'implication de ces facteurs de transcription expliquant les différences de phénotypes entre les souches n'est pas négligeable puisque nos résultats et le patron d'expression des gènes dans les souches concordent bien avec cette hypothèse.

3.5.1.1.4 Le récepteur associé au récepteur de l'insuline, InsR

Le récepteur associé au récepteur de l'insuline est toujours orphelin et aucune interaction n'a été identifiée contrairement au récepteur de l'insuline et de l'IGF [196]. L'InsR est

exprimé dans peu de tissus cardiaques et sa fonction est incertaine [196]. De plus, la fonction de InsR serait moins importante au niveau des voies de signalisation de l'insuline et de l'IGF. De nouvelles propriétés de ce récepteur pourraient permettre son implication dans le contexte expérimental de notre étude.

3.5.1.1.5 La protéine liant l'apolipoprotéine A-I, APOAIBP

L'apolipoprotéine de type A1 (Apo-A1) est la forme majeure dans les HDL. Sa fonction est au niveau de la régulation de la stabilité, du transport des lipides et du métabolisme du HDL [197]. Une protéine de 29 kilodaltons (kDa) pouvant interagir avec Apo-A1 et nommée ApoA1-BP, a été identifiée par la technique de double-hybride dans la levure [197]. Elle est exprimée dans le cœur, le foie, les reins, les glandes surrénales, la thyroïde et les testicules [197]. D'autre part, la stimulation des tubules rénaux par l'Apo-A1 ou par le HDL induisent une hausse concentration-dépendante de ApoA1-BP, ce qui suggère un rôle au niveau de la dégradation ou la réabsorption tubulaire de Apo-A1 [197]. Le gène d'ApoA1-BP est situé sur un locus associé à l'hyperlipidémie chez l'humain et la souris, supportant le rôle de ApoA1-BP dans l'efflux du cholestérol [198]. Nos connaissances actuelles ne permettent pas d'entrevoir pour le moment, un lien direct entre ApoA1-BP et les résultats de cette étude.

3.5.1.1.6 Le récepteur α de l'interleukine 6, IL6ra

La cytokine IL-6 est largement distribuée au sein de l'organisme et les niveaux sont augmentés lors de la résistance à l'insuline et lors de l'obésité [199]. Après la liaison sur son récepteur IL6ra, ce complexe interagit avec GP130 pour la transduction du signal [200]. De plus, l'augmentation de l'expression de l'IL-6 et de son récepteur pourrait être

impliqués dans la prolifération cellulaire et jouer un rôle critique pour l'initiation des maladies glomérulaires [201]. Récemment, un nouveau mécanisme de résistance à l'insuline a été caractérisé. Une dérégulation de la protéolyse membranaire par l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE) et l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-3 (TIMP3) au niveau du IL-6R et du TNF- α , serait un facteur important pour le développement de la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique chez les diabétiques de type 2 obèses [199]. L'implication d'IL-6Ra au niveau de notre étude est à explorer.

3.5.1.2 Similarités entre SM9 et SM12 par rapport à DSS

3.5.1.2.1 Les sous-unités de GCs: GCs α 1 et GCs β 1

L'implication du système de l'oxyde nitrique dans la pathogénèse du rat DSS est souvent discutée en lien avec sa sensibilité au sel, induite sur une diète riche en sel mais les évidences indiquent que l'impact de GCs est secondaire [202]. Les voies de signalisation du NO semblent jouer un rôle dans la gestion du sel. Le rat DSS aurait une production insuffisante de NO pouvant être en partie responsable de la faible excrétion du sodium par rapport à la souche DSS résistante (DR) sur la diète riche en sel [202]. Nos résultats démontrent que la souche DSS a le taux de cholestérol le plus élevé (Figure 8). Il est bien connu que l'hypercholestérolémie est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires tant et aussi bien que la dysfonction endothéliale agit sur les parois vasculaires et contribue à l'athérosclérose [38]. De plus, il a été suggéré que l'hypercholestérolémie inhibe la GCs ce qui nuirait aux effets bénéfiques du NO sur la paroi vasculaire tels que la prolifération des VSMC, l'apoptose et l'effet anti-oxydant. Une augmentation compensatoire de GCs au niveau de l'aorte a été observée et pourrait participer au mécanisme [38]. Une dérégulation du système vasodilatateur du NO, pourrait

contribuer à l'augmentation de la pression artérielle chez le rat DSS et ses congéniques. Nous n'avons noté aucune variation au niveau de l'ARNm des sous-unités $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ dans le cortex rénal. Il n'est pas à exclure que l'intervention d'un autre mode de régulation puisse moduler différemment le système du NO entre les souches. L'effet bénéfique du NO sur le système cardiovasculaire ne proviendrait qu'en partie de la production de NO [37]. Le fait que les souches SM9 et SM12 possèdent les sous-unités d'origine normotendue pourrait fournir une raison aux phénotypes intermédiaires de SM12 par rapport à SM9 et DSS; soulignons le score de dommage rénal et la stimulation de la guanylate cyclase par l'ANP dans les glomérules isolés, comme base à approfondir.

3.5.1.2.2 Les chaînes fgg/fga/fgb du fibrinogène

Une étude de protéomique chez des patients hypercholestérolémiques a démontrée une augmentation de l'isoforme 1 de la chaîne fgg et une réduction des isoformes 1 et 3 de la chaîne fgb par rapport aux patients avec un taux normal de cholestérol [203]. Lors de la thrombose, les niveaux de fibrinogène plasmatique sont particulièrement élevés permettant l'évidence potentielle de l'importance du fibrinogène dans les maladies cardiovasculaires [203]. Les chaînes fgb limiteraient la synthèse de fibrinogène mature [203]. Le fibrinogène est essentiel à la coagulation sanguine, mais est également un facteur de risque des maladies cardiovasculaires; il est donc possible qu'une anomalie ou différence génétique affecte la fonction cardiaque.

3.5.1.2.3 Récepteur Dear double AngII/ET-1

Un nouveau récepteur, nommé Dear pour « dual ET-1/AngII receptor », ayant la capacité de lier à la fois l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (AngII) a été caractérisée récemment [107]. Le gène Dear serait impliqué dans l'angiogénèse lors du développement et aurait un rôle différent du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire [204]. Le Dear a une variante S44P/M74T qui lui confère une incapacité à lier AngII, a été identifiée chez le rat DSS résistant au sel par rapport à la souche DSS [107]. Plusieurs souches de rats, dont SHR, WKY et BN possèdent l'allèle de Dear du DSS mais l'information est manquante concernant le rat MNS. L'observation de cette variation chez les souches congéniques qui possèdent ce gène pourrait expliquer partiellement les phénotypes de la fonction rénale. Le séquençage de ce gène chez les souches congéniques a révélé l'absence de cette variante chez toutes les souches de cette étude (Tableau 9). Cette hypothèse est donc infirmée jusqu'à ce que de nouveaux éléments permettent d'approfondir nos connaissances sur cette protéine découverte récemment.

Souche	Variante S44P	Variante M74P
DSS	Absente	Absente
SM9	Absente	Absente
SM12	Absente	Absente
Dahl résistant	Présente *	Présente *

Tableau 9 : Présence des variantes génétiques dans le gène du récepteur Dear Dual AngII/ET-1 chez le rat DSS et les souches congéniques déterminé suite au séquençage et comparaison avec la séquence de référence NP_001004448. S : serine; P : proline; M : méthionine; * d'après la publication de Kanedo Y [107]

4. Conclusion

Dans ce travail, nous avons comparé des souches congéniques, SM9 et SM12, dont un segment du chromosome 2 de la souche normotendue MNS a été substitué dans la souche parentale DSS. Ces souches congéniques représentaient un modèle de choix pour l'étude du gène candidat GCA, le récepteur du peptide natriurétique. La comparaison de la réponse physiologique de ces souches, par rapport à la fonction rénale, à la fonction cardiaque, au bilan lipidique et aux valeurs anthropométriques, nous a permis d'étudier la composante génétique de ces paramètres. La dissection du segment a permis d'attribuer de nouvelles fonctions à notre gène candidat principal et de discuter de l'influence de d'autres gènes contenus dans le segment chromosomique. Dans un deuxième temps, l'influence des composantes lipidiques et sodiques de différentes diètes sur ces paramètres a permis d'étudier le rat DSS et ses congéniques dans un contexte d'obésité et de syndrome métabolique.

4.1 Effet de la diète

La diète riche en gras HF/LS s'est avérée être globalement néfaste pour tous les paramètres étudiés dans ce projet. Il n'est pas surprenant qu'au niveau des valeurs anthropométriques, nous ayons observé une augmentation de la masse corporelle, du tissu adipeux ainsi que du ratio de la masse adipeuse/masse maigre reflétant la composition corporelle. Ces phénotypes vont généralement de pair avec les régimes hypercaloriques comme une diète riche en gras. L'observation d'une amélioration du bilan lipidique lors de la diète HF/LS (cholestérol total, HDL, LDL) le fut d'avantage. Nous croyons que cette diminution est attribuable à la qualité des lipidiqes de la diète HF/LS, particulièrement riche en acide

oléique et en acide gras mono-insaturés. Toutefois, sur la diète HF/LS les rats demeurent hypercholestérolémiques. Nous croyons également que l'augmentation de la masse ventriculaire absolue lors de la diète HF/LS pourrait être attribuable à des dépôts ectopiques de lipides, indiquant une perturbation du métabolisme des lipides. Dans le même sens, la diète HF/LS s'est avérée néfaste pour les paramètres relatifs à la fonction rénale. En plus du score de dommage rénal, les paramètres relatifs aux fluides corporels (natriurie, natrémie, aldostéronémie, kaliurie) avaient un profil pathologique sous la diète HF/LS. Lors d'une diète normale en sel, la diurèse normale sur une période de 24 heures, était plus basse sur la diète HF indicateur d'une différence au niveau de la fonction rénale. Parallèlement, les diètes HF inhibent la clairance de la créatinine indépendamment de la concentration en sel des diètes de notre étude. Une inhibition de la stimulation par l'ANP dans les glomérules a été observée pour la souche DSS lors de la diète HF/LS.

L'effet de la diète HF/LS pourrait être attribuable à la composante lipidique, sodique ou à leur effet synergique. Pour la majorité des paramètres qui ont été étudiés sur 4 diètes permettant donc de dissocier les composantes lipidiques et sodiques, la majorité des effets pouvaient être attribuables à la composante lipidique. Ces effets comprennent la masse corporelle/l'apport alimentaire, le ratio masse adipeuse/masse grasse, la clairance de la créatinine, la masse des organes et la prise hydrique. Par contre, l'effet inhibiteur de la natriurèse par la diète HF/LS pourrait être attribuable à la synergie des matières grasses et du sel contenu dans la diète. Nos résultats démontrent que le sel inhibe davantage la diurèse sur une période de 24 heures lors de la diète HF seulement. Pour faire le lien avec l'influence de l'obésité par rapport au système du peptide natriurétique, la diète HF/LS a inhibé la diurèse, la natriurèse et les niveaux de GMPc en réponse à l'ANP. Cet effet

pourrait être en lien avec les taux d'ARNm de pre-pro ANP qui sont plus bas dans les oreillettes et ventricules toujours lors de la diète HF/LS. En revanche, une diminution des taux d'ARNm de GCA et du ratio d'ARNm GCA/NprC a été observée permettant d'expliquer ce phénomène. Ceci appuie des études qui ont démontré que les niveaux circulants d'ANP sont plus faibles chez des individus obèses. L'ensemble de ces résultats démontre que les composantes du système de l'ANP sont inhibées par la diète. Les taux d'ARNm suggèrent que l'ANP circulant est plus faible, le récepteur GCA ne varie pas significativement mais la réponse physiologique en réponse à l'ANP est perturbée, voire inhibée, lors de la diète HF/LS. Le second messenger, GMPC, est également inhibé, et ce malgré une stimulation par l'ANP, ces résultats suggèrent une perturbation du système soit au niveau du récepteur GCA ou en aval, puisque malgré la stimulation par l'ANP la réponse demeure inhibée. Un mécanisme de régulation de l'activité de GCA ou de protéines effectrices dépendantes du GMPC pourrait expliquer cette inhibition de la réponse physiologique. Nos résultats contribuent à l'hypothèse de la perturbation du système du peptide natriurétique ayant un rôle central dans les troubles métaboliques en lien avec le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires [44].

4.2 Effet de la souche

Au cours de ce projet les différences entre souches révélaient une différence génétique pouvant être attribuable aux différents segments chromosomiques. Nous avons été intéressés de découvrir une différence entre la souche SM9 et les souches SM12 et DSS, au niveau de plusieurs paramètres des fonctions rénales et cardiaques et des données anthropométriques. La portion du segment chromosomique normotendue (12,9 MB) et unique à SM9 contenait 411 gènes pouvant possiblement avoir une influence directe ou

indirecte avec ces phénotypes. Des travaux antérieurs de notre groupe nous ont permis de suspecter un impact majeur de GCA en ciblant certaines expériences de manière à confirmer ou infirmer son rôle sur ces phénotypes.

Au niveau de la fonction rénale, nous avons démontré une diminution de la pression moyenne, une amélioration du score de dommage rénal et une augmentation de la capacité diurétique de SM9 en réponse à l'ANP lors d'un gavage, tous indiquant une amélioration de la condition de SM9 par rapport à DSS et SM12 lors de la diète NF/NS. Au niveau de la gestion des fluides corporels, la souche SM9 présentait une natriurie, une natrémie et un ratio Na/K urinaire plus élevés que DSS lors de la diète HF/LS mais une protéinurie plus basse.

Au niveau de la fonction cardiaque, les myocytes de SM9 étaient de plus petite taille que ceux de DSS et SM12 ce qui concordait avec les marqueurs d'hypertrophie cardiaque et de fibrose (pré-proANP, β -MHC, TGF- β 1) lors de la diète NF/NS. Et ce, malgré l'absence de phénotype au niveau de la morphométrie macroscopique suggérant un stade précoce au niveau du remodelage cardiaque lors de la diète NF/NS. Ces différences coïncident avec la taille des myocytes lors de la diète HF/LS malgré la discordance d'avec les marqueurs d'hypertrophie ou des différences détectables au niveau macroscopique. Dans ce sens, nos résultats démontrent une hypertrophie de l'oreillette gauche chez SM12 et DSS en réponse à une surcharge pressive qui découle soit d'une hypertrophie cardiaque, soit de l'hypertension artérielle ou soit d'une combinaison des deux.

Au niveau des valeurs anthropométriques, nous avons observé que la souche DSS avait un plus petit poids corporel que SM9 et SM12 et ce malgré le même apport alimentaire. Le ratio de la masse adipeuse était plus élevé chez SM9 lors des diètes riche en gras, ceci a été confirmé avant et après la diète, ce qui suggère que la souche SM9 engraisse plus et est génétiquement plus enclinte à l'obésité (étant donné son ratio de masse adipeuse/masse maigre plus élevé), par rapport aux autres souches.

Au niveau génétique, les ARNm de GCA et de GCA/NprC se sont avérés être moins abondants dans le cortex rénal et dans le tissu adipeux rétropéritonéal pour la souche SM9 sur diète NF/NS. Le nombre de répétitions du dinucléotide TA dans la région promotrice de GCA pourrait fournir une explication à cette différence puisque notre groupe a démontré que ce nombre était inversement proportionnel à l'activité transcriptionnelle de GCA [86]. Suite au séquençage du promoteur et de la partie codante de GCA dans les souches DSS et MNS, la variation dans le nombre de répétition TA est la seule différence génétique que nous avons recensé [161]. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'expression du pré-pro ANP dans les oreillettes entre les souches.

Considérant l'ensemble de ces résultats : SM9 est avantagé à plusieurs niveaux par rapport à son état cardiovasculaire et ce, particulièrement sur la diète NF/NS. De plus, la stimulation de la guanylate cyclase par l'ANP est moins forte chez SM9, ce qui concorde avec l'expression de GCA dans plusieurs tissus cibles lors de la diète NF/NS. Ceci démontre donc un dysfonctionnement dans le système ANP/GCA/GMPc pour les souches SM12 et DSS qui influencerait leur réponse pathophysiologique. Nos résultats suggèrent une augmentation compensatoire de GCA qui s'avère cependant insuffisante. En somme, il

existe bien de différences phénotypiques entre les souches qui suggèrent que le segment contenant le gène GCA d'origine normotendue protège la souche DSS sur les diètes normales et riches en gras. Selon la même logique, des différences entre la souche DSS par rapport aux congéniques (DSS < ou > SM9~SM12) indiquent une implication du segment commun à SM9 et SM12 qui comprend 86 gènes dont entre autres, le récepteur du NO.

Au niveau du bilan lipidique, les souches SM9/SM12 ont démontré avoir un avantage important et indépendant de la diète. Ces résultats suggèrent l'implication de cette région du segment dans le métabolisme et peut-être au niveau du transport du cholestérol.

Au niveau de la fonction rénale, les souches SM9/SM12 avaient une masse rénale relative plus faible que DSS. Ceci concorde avec le score de dommage rénal également plus élevé chez DSS lors de la diète HF/LS, et la réponse plus importante à la stimulation glomérulaire par l'ANP lors de la diète NF/NS. Le récepteur du NO, ayant le GMPc comme second messager commun avec GCA pourrait intervenir dans les phénotypes rénaux. D'autre part, l'hypercholestérolémie qui inhiberait l'activité de GCs au niveau de l'endothélium [38] est une explication qui semble prometteuse et qui permettrait de faire un lien entre l'hypercholestérolémie et le profil cardiovasculaire moins favorable de DSS.

En disséquant les gènes contenus dans la partie du segment qui est unique à SM9, le gène candidat GCA apparaît en premier lieu comme l'explication la plus probante à ces différences génétiques. Bien que nous ayons abordé l'effet possible de d'autres gènes (HCN3, les facteurs de transcription MEF2B/MEF2D, InsR, APOAIBP, et IL6ra) leurs

effets demeurent néanmoins spéculatifs. Des expériences complémentaires ou un raffinement du segment dans les congéniques pourrait aider en ce sens.

4.3 Perspectives

Bien que ce projet ait mené à de nombreuses découvertes intéressantes, il a également permis de soulever d'autres questions d'autant plus intrigantes. Déterminer les mécanismes exacts de l'inhibition de la réponse à l'ANP par la diète HF/LS serait captivant. Il serait également approprié de vérifier si cet effet est spécifique au rat DSS ou si cela est transposable à d'autres souches de rats et même éventuellement à l'humain. L'ANP a une influence importante sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en inhibant la sécrétion de vasopressine (augmentation de la diurèse) et d'ACTH aboutissant à une inhibition du système RAAS (augmentation de la natriurèse) [199]. Il serait intéressant de vérifier si les phénotypes observés dans cette étude sont reliés au système nerveux central.

Est-ce qu'une prolongation de la diète accentuerait les effets observés? Est-ce que de nouvelles différences apparaîtraient? Concernant les phénotypes de la fonction cardiaque, il serait pertinent de mesurer la longueur du tibia comme marqueur étalon de la taille de l'animal. Étant donné que les diètes influencent la masse corporelle, ceci est d'autant plus important. La fonction du système du peptide natriurétique dans l'adipocyte en lien avec le syndrome métabolique est une voie émergente qui mérite plus d'études. Notre collaborateur, le Dr Alan Deng, a généré une nouvelle souche congénique, la souche SM19 qui contient un segment plus court que SM9 et qui ne possède ni GCs ni fgg/fgb/fga d'origine hypertendue. La souche SM19 a montré une capacité diurétique en réponse à l'ANP similaire à SM9, prouvant d'avantage l'importance du gène candidat GCA dans ces

phénotypes. L'expression des gènes dans les tissus d'intérêt pourrait être déterminée à l'aide de micropuces d'ADN ce qui permettrait de mieux comprendre les mécanismes en aval de GCA qui aboutissent aux différents phénotypes observés.

Bibliographie

- (1) McBride MW, Graham D, Delles C, Dominiczak AF. Functional genomics in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15(2):145-151.
- (2) Pravenec M, Kurtz TW. Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies. *Hypertension* 2007; 49(5):941-952.
- (3) Joffres MR, Hamet P, Rabkin SW, Gelskey D, Hogan K, Fodor G. Prevalence, control and awareness of high blood pressure among Canadian adults. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *CMAJ* 1992; 146(11):1997-2005.
- (4) Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem* 2002; 230(1-2):31-47.
- (5) Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(5):F777-F784.
- (6) Ogihara T, Asano T, Fujita T. Contribution of salt intake to insulin resistance associated with hypertension. *Life Sci* 2003; 73(5):509-523.
- (7) Adamo KB, Tesson F. Gene-environment interaction and the metabolic syndrome. *Novartis Found Symp* 2008; 293:103-119.
- (8) Fujita T. Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. *J Mol Med* 2008; 86(6):729-734.
- (9) Shehata MF. Genetic and dietary salt contributors to insulin resistance in Dahl salt-sensitive (S) rats. *Cardiovasc Diabetol* 2008; 7:7.
- (10) Cowley AW, Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nat Rev Genet* 2006; 7(11):829-840.
- (11) Harrison M, Maresso K, Broeckel U. Genetic determinants of hypertension: an update. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10(6):488-495.

- (12) Hamet P, Merlo E, Seda O, Broeckel U, Tremblay J, Kaldunski M, Gaudet D, Bouchard G, Deslauriers B, Gagnon F, Antoniol G, Pausova Z, Labuda M, Jomphe M, Gossard F, Tremblay G, Kirova R, Tonellato P, Orlov SN, Pintos J, Platko J, Hudson TJ, Rioux JD, Kotchen TA, Cowley AW, Jr. Quantitative founder-effect analysis of French Canadian families identifies specific loci contributing to metabolic phenotypes of hypertension. *Am J Hum Genet* 2005; 76(5):815-832.
- (13) Ueno T, Tremblay J, Kunes J, Zicha J, Dobesova Z, Pausova Z, Deng AY, Sun YL, Jacob HJ, Hamet P. Rat model of familial combined hyperlipidemia as a result of comparative mapping. *Physiol Genomics* 2004; 17(1):38-47.
- (14) Seda O, Tremblay J, Gaudet D, Brunelle PL, Gurau A, Merlo E, Pilote L, Orlov SN, Boulva F, Petrovich M, Kotchen TA, Cowley AW, Jr., Hamet P. Systematic, genome-wide, sex-specific linkage of cardiovascular traits in French Canadians. *Hypertension* 2008; 51(4):1156-1162.
- (15) Dumas P, Sun Y, Corbeil G, Tremblay S, Pausova Z, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J. Mapping of quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains. *J Hypertens* 2000; 18(5):545-551.
- (16) Hubner N, Wallace CA, Zimdahl H, Petretto E, Schulz H, Maciver F, Mueller M, Hummel O, Monti J, Zidek V, Musilova A, Kren V, Causton H, Game L, Born G, Schmidt S, Muller A, Cook SA, Kurtz TW, Whittaker J, Pravenec M, Aitman TJ. Integrated transcriptional profiling and linkage analysis for identification of genes underlying disease. *Nat Genet* 2005; 37(3):243-253.
- (17) Agarwal A, Williams GH, Fisher ND. Genetics of human hypertension. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(3):127-133.
- (18) Neel JV. The "thrifty genotype" in 1998. *Nutr Rev* 1999; 57(5 Pt 2):S2-S9.
- (19) Ordovas JM, Corella D. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Kidney Int Suppl* 2008;(111):S10-S14.
- (20) Shah A, Mehta N, Reilly MP. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2008; 32(6):638-644.
- (21) Joy T, Hegele RA. Genetics of metabolic syndrome: is there a role for phenomics? *Curr Atheroscler Rep* 2008; 10(3):201-208.

- (22) Sookoian S, Pirola CJ. Genetics of the cardiometabolic syndrome: new insights and therapeutic implications. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2007; 1(1):37-47.
- (23) Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20(3):284-287.
- (24) Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 1999; 21(1):76-83.
- (25) Lusis AJ, Attie AD, Reue K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nat Rev Genet* 2008; 9(11):819-830.
- (26) Andreassi MG. Metabolic syndrome, diabetes and atherosclerosis: Influence of gene-environment interaction. *Mutat Res* 2009; 667(1-2):35-43.
- (27) Morine MJ, O'Brien C, Roche HM. Session 2: Personalised nutrition. Transcriptomic signatures that have identified key features of metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc* 2008; 67(4):395-403.
- (28) Viswanath K, Bond K. Social determinants and nutrition: reflections on the role of communication. *J Nutr Educ Behav* 2007; 39(2 Suppl):S20-S24.
- (29) Bergvall N, Cnattingius S. Familial (shared environmental and genetic) factors and the foetal origins of cardiovascular diseases and type 2 diabetes: a review of the literature. *J Intern Med* 2008; 264(3):205-223.
- (30) Bezek S, Ujhazy E, Dubovicky M, Mach M. Nongenomic memory of foetal history in chronic diseases development. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29(5):620-626.
- (31) Tremblay J, Hamet P. Impact of genetic and epigenetic factors from early life to later disease. *Metabolism* 2008; 57 Suppl 2:S27-S31.
- (32) O'Toole TE, Conklin DJ, Bhatnagar A. Environmental risk factors for heart disease. *Rev Environ Health* 2008; 23(3):167-202.

- (33) Thifault S, Ondrej S, Sun Y, Fortin A, Skamene E, Lalonde R, Tremblay J, Hamet P. Genetic determinants of emotionality and stress response in AcB/BcA recombinant congenic mice and in silico evidence of convergence with cardiovascular candidate genes. *Hum Mol Genet* 2008; 17(3):331-344.
- (34) Sedova L, Berube J, Gaudet D, Dumont M, Tremblay J, Hamet P, Pausova Z. Diet-induced obesity delays cardiovascular recovery from stress in spontaneously hypertensive rats. *Obes Res* 2004; 12(12):1951-1958.
- (35) Okere IC, Chess DJ, McElfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, Hoit BD, Chandler MP, Stanley WC. High-fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(10):825-831.
- (36) Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes* 2000; 49(7):1231-1238.
- (37) Chikani G, Zhu W, Smart EJ. Lipids: potential regulators of nitric oxide generation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287(3):E386-E389.
- (38) Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammel A, Meyer W, Mayer B, Weber M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation* 2002; 105(7):855-860.
- (39) Grynberg A. Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids. *J Hum Hypertens* 2005; 19 Suppl 3:S25-S33.
- (40) Trichopoulou A, Psaltopoulou T, Orfanos P, Trichopoulos D. Diet and physical activity in relation to overall mortality amongst adult diabetics in a general population cohort. *J Intern Med* 2006; 259(6):583-591.
- (41) Alonso A, Ruiz-Gutierrez V, Martinez-Gonzalez MA. Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutr* 2006; 9(2):251-257.
- (42) Covas MI. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol Res* 2007; 55(3):175-186.

- (43) Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet A* 2007; 143A(24):3016-3034.
- (44) Sarzani R, Salvi F, Dessi-Fulgheri P, Rappelli A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J Hypertens* 2008; 26(5):831-843.
- (45) Roche HM, Phillips C, Gibney MJ. The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. *Proc Nutr Soc* 2005; 64(3):371-377.
- (46) Moro C, Klimcakova E, Lolmede K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, Bouloumie A, Galitzky J, Arner P, Langin D. Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* 2007; 50(5):1038-1047.
- (47) Cook NR. Salt intake, blood pressure and clinical outcomes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17(3):310-314.
- (48) He FJ, MacGregor GA. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J Hum Hypertens* 2009; 23(6):363-384.
- (49) Sanders PW. Salt intake, endothelial cell signaling, and progression of kidney disease. *Hypertension* 2004; 43(2):142-146.
- (50) Pausova Z, Gaudet D, Gossard F, Bernard M, Kaldunski ML, Jomphe M, Tremblay J, Hudson TJ, Bouchard G, Kotchen TA, Cowley AW, Hamet P. Genome-wide scan for linkage to obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 2005; 46(6):1280-1285.
- (51) Swislocki A, Tsuzuki A. Insulin resistance and hypertension: glucose intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty acids in the lean spontaneously hypertensive rat. *Am J Med Sci.* 1993; 306(5):282-6.
- (52) de Jong W. *Handbook of Hypertension Vol.16 Experimental and Genetic Models of Hypertension.* 1984. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier
- (53) Roba JL. The use of spontaneously hypertensive rats for the study of anti-hypertensive agents. *Lab Anim Sci.* 1976; 26(2 Pt 2):305-19.
- (54) Ayachi S. Increased dietary calcium lowers blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism.* 1979; 28(12):1234-8.

- (55) Pace-Asciak CR, Carrara MC. Reduction in dietary vitamin E prevents onset of hypertension in developing spontaneously hypertensive rats. *Experientia*. 1979; 15;35(12):1561-2
- (56) Adams N, Blizard DA. Genetic and maternal influences in rat models of spontaneous and salt-induced hypertension. *Dev Psychobiol*. 1991; 24(7):507-19.
- (57) Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB. Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats. *Hypertension*. 1995; 25(5):928-34.
- (58) Rapp JP, Dene H. Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* 1985; 7(3 Pt 1):340-349.
- (59) Szentivanyi M, Jr., Zou AP, Mattson DL, Soares P, Moreno C, Roman RJ, Cowley AW, Jr. Renal medullary nitric oxide deficit of Dahl S rats enhances hypertensive actions of angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283(1):R266-R272.
- (60) Zicha J, Dobesova Z, Kunes J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens* 2001; 19(2):247-254.
- (61) Rapp JP. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 2000; 80(1):135-172.
- (62) Lin KF, Chao J, Chao L. Atrial natriuretic peptide gene delivery reduces stroke-induced mortality rate in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1999; 33(1 Pt 2):219-224.
- (63) Sakata Y, Yamamoto K, Masuyama T, Mano T, Nishikawa N, Kuzuya T, Miwa T, Hori M. Ventricular production of natriuretic peptides and ventricular structural remodeling in hypertensive heart failure. *J Hypertens* 2001; 19(10):1905-1912.
- (64) Channa ML, Somova L, Nadar A. Facets of the metabolic syndrome in Dahl hypertensive rats. *Cardiovasc J S Afr* 2004; 15(2):61-63.
- (65) Deng AY. In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 1998; 16(12 Pt 1):1707-1717.

- (66) Dutil J, Eliopoulos V, Tremblay J, Hamet P, Charron S, Deng AY. Multiple quantitative trait loci for blood pressure interacting epistatically and additively on Dahl rat chromosome 2. *Hypertension* 2005; 45(4):557-564.
- (67) Duong C, Charron S, Xiao C, Hamet P, Menard A, Roy J, Deng AY. Distinct quantitative trait loci for kidney, cardiac, and aortic mass dissociated from and associated with blood pressure in Dahl congenic rats. *Mamm Genome* 2006; 17(12):1147-1161.
- (68) Martel G, Hamet P, Tremblay J. Central role of guanylyl cyclase in natriuretic peptide signaling in hypertension and metabolic syndrome. *Mol Cell Biochem* 2010; 334(1-2):53-65.
- (69) Calle RA, Bollag WB, White S, Betancourt-Calle S, Kent P. ANPs effect on MARCKS and StAR phosphorylation in agonist-stimulated glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177(1-2):71-79.
- (70) Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin release. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22:310-319.
- (71) Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Garcia R, Thibault G, Gutkowska J, Cantin M, Genest J. Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123(2):515-527.
- (72) Tremblay J, Gerzer R, Vinay P, Pang SC, Beliveau R, Hamet P. The increase of cGMP by atrial natriuretic factor correlates with the distribution of particulate guanylate cyclase. *FEBS Lett* 1985; 181(1):17-22.
- (73) Endlich K, Steinhausen M. Natriuretic peptide receptors mediate different responses in rat renal microvessels. *Kidney Int* 1997; 52(1):202-207.
- (74) Potter L. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. Abbey-Hosch S, Dickey DM, editors. 27[1], 47-72. 2006.
- (75) Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol* 2009;(191):137-162.

- (76) Gao Y, Portugal AD, Liu J, Negash S, Zhou W, Tian J, Xiang R, Longo LD, Raj JU. Preservation of cGMP-induced relaxation of pulmonary veins of fetal lambs exposed to chronic high altitude hypoxia: role of PKG and Rho kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295(5):L889-L896.
- (77) Koyanagi T, Wong LY, Inagaki K, Petrauskene OV, Mochly-Rosen D. Alteration of gene expression during progression of hypertension-induced cardiac dysfunction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(1):H220-H226.
- (78) Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(26):14730-14735.
- (79) Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2006; 69(2):318-328.
- (80) Tokudome T, Horio T, Kishimoto I, Soeki T, Mori K, Kawano Y, Kohno M, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation* 2005; 111(23):3095-3104.
- (81) Lin X, Hanze J, Heese F, Sodmann R, Lang RE. Gene expression of natriuretic peptide receptors in myocardial cells. *Circ Res* 1995; 77(4):750-758.
- (82) Takahashi Y, Nakayama T, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K. Organization of the human natriuretic peptide receptor A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246(3):736-739.
- (83) Yamaguchi M, Rutledge LJ, Garbers DL. The primary structure of the rat guanylyl cyclase A/atrial natriuretic peptide receptor gene. *J Biol Chem* 1990; 265(33):20414-20420.
- (84) Vincent A, Perrais M, Desseyn JL, Aubert JP, Pigny P, Van S, I. Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. *Oncogene* 2007; 26(45):6566-6576.

- (85) Kumar P, Bolden G, Arise KK, Krazit ST, Pandey KN. Regulation of natriuretic peptide receptor-A gene expression and stimulation of its guanylate cyclase activity by transcription factor Ets-1. *Biosci Rep* 2009; 29(1):57-70.
- (86) Tremblay J, Hum DH, Sanchez R, Dumas P, Pravenec M, Krenova D, Kren V, Kunes J, Pausova Z, Gossard F, Hamet P. TA repeat variation, Npr1 expression, and blood pressure: impact of the Ace locus. *Hypertension* 2003; 41(1):16-24.
- (87) Hum D, Besnard S, Sanchez R, Devost D, Gossard F, Hamet P, Tremblay J. Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter. *Hypertension* 2004; 43(6):1270-1278.
- (88) de Leon H, Bonhomme MC, Garcia R. Rat renal preglomerular vessels, glomeruli and papillae do not express detectable quantities of B-type natriuretic peptide receptor. *J Hypertens* 1994; 12(5):539-548.
- (89) Misono K, Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM. [ANP receptor structure and signal transduction mechanism: a novel hormone-induced rotation mechanism for transmembrane signaling]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2005; 50(9):1078-1087.
- (90) Fortin Y, De Lean A. Role of cyclic GMP and calcineurin in homologous and heterologous desensitization of natriuretic peptide receptor-A. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84(5):539-546.
- (91) Ellmers LJ, Scott NJ, Piuholo J, Maeda N, Smithies O, Frampton CM, Richards AM, Cameron VA. Npr1-regulated gene pathways contributing to cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Mol Endocrinol* 2007; 38(1-2):245-257.
- (92) Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, Grigsby CL. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension* 2007; 49(3):419-426.
- (93) Azam M, Gupta G, Chen W, Wellington S, Warburton D, Danziger RS. Genetic mapping of soluble guanylyl cyclase genes: implications for linkage to blood pressure in the Dahl rat. *Hypertension* 1998; 32(1):149-154.
- (94) Deng AY. Is the nitric oxide system involved in genetic hypertension in Dahl rats? *Kidney Int* 1998; 53(6):1501-1511.

- (95) Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34(4 Pt 2):943-949.
- (96) Torok J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol Res* 2008; 57(6):813-825.
- (97) Pechanova O, Bernatova I, Babal P, Martinez MC, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J Hypertens* 2004; 22(8):1551-1559.
- (98) Uitte dW, Doggen CJ, de Visser MC, Bertina RM, Rosendaal FR. Haplotypes of the fibrinogen gamma gene do not affect the risk of myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2006; 4(2):474-476.
- (99) Cheung EY, Bos MJ, Leebeek FW, Koudstaal PJ, Hofman A, de Maat MP, Breteler MM. Variation in fibrinogen FGG and FGA genes and risk of stroke: the Rotterdam Study. *Thromb Haemost* 2008; 100(2):308-313.
- (100) Mannila MN, Lovely RS, Kazmierczak SC, Eriksson P, Samnegard A, Farrell DH, Hamsten A, Silveira A. Elevated plasma fibrinogen gamma' concentration is associated with myocardial infarction: effects of variation in fibrinogen genes and environmental factors. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4):766-773.
- (101) Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, Branco LG, Albuquerque-Araujo WI, de Nucci G, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(1):278-283.
- (102) Willenbrock RC, Tremblay J, Garcia R, Hamet P. Dissociation of natriuresis and diuresis and heterogeneity of the effector system of atrial natriuretic factor in rats. *J Clin Invest* 1989; 83(2):482-489.
- (103) Dahab GM, Kheriza MM, El-Din OA, Fouda AM. Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections: description of a new method by Photoshop software. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19(1):78-85.
- (104) Tremblay J, Huot C, Willenbrock RC, Bayard F, Gossard F, Fujio N, Koch C, Kuchel O, Debinski W, Hamet P. Increased cyclic guanosine monophosphate production and overexpression of atrial natriuretic peptide A-receptor mRNA in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1993; 92(5):2499-2508.

- (105) Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972; 48(2):422-427.
- (106) Biederman J, Yee J, Cortes P. Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2004; 66(6):2308-2314.
- (107) Kaneko Y, Herrera VL, Didishvili T, Ruiz-Opazo N. Sex-specific effects of dual ET-1/ANG II receptor (Dear) variants in Dahl salt-sensitive/resistant hypertension rat model. *Physiol Genomics* 2005; 20(2):157-164.
- (108) Coelho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, Bibancos T, Prada PO, Furukawa LL, Furukawa LN, Fukui RT, Casarini DE, Saad MJ, Luz J, Chiavegatto S, Dolnikoff MS, Heimann JC. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on body weight, food intake and energy balance in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; 16(2):148-155.
- (109) Michikawa T, Nishiwaki Y, Okamura T, Asakura K, Nakano M, Takebayashi T. The taste of salt measured by a simple test and blood pressure in Japanese women and men. *Hypertens Res* 2009; 32(5):399-403.
- (110) Isezuo SA, Saidu Y, Anas S, Tambuwal BU, Bilbis LS. Salt taste perception and relationship with blood pressure in type 2 diabetics. *J Hum Hypertens* 2008; 22(6):432-434.
- (111) Flynn FW, Culver B, Newton SV. Salt intake by normotensive and spontaneously hypertensive rats: two-bottle and lick rate analyses. *Physiol Behav* 2003; 78(4-5):689-696.
- (112) Ferrell F, Lanou A, Gray SD. Salt level in weaning diet affects saline preference and fluid intake in Dahl rats. *Hypertension* 1986; 8(11):1021-1026.
- (113) Mohring J, Petri M, Mohring B. Salt appetite during the early phase of renal hypertension in rats. *Pflugers Arch* 1975; 356(2):153-158.
- (114) Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav* 2004; 83(4):549-555.
- (115) Pigeyre M, Romon M. [Genetic obesities]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2007; 68(6):430-437.

- (116) Trout KK, Homko C, Tkacs NC. Methods of measuring insulin sensitivity. *Biol Res Nurs* 2007; 8(4):305-318.
- (117) Morin Evelyne. Peptide natriurétique auriculaire et monoxyde d'azote: liens possibles entre l'hypertension artérielle et l'obésité? Étude de modèles génétiques de l'hypertension. Université de Montréal, Département des Sciences biomédicales, Faculté de médecine, 2007.
- (118) Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem* 2007; 388(5):547-554.
- (119) Hill MJ, Metcalfe D, McTernan PG. Obesity and diabetes: lipids, 'nowhere to run to'. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116(2):113-123.
- (120) Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Despres JP. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension* 2009; 53(4):577-584.
- (121) Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Moreno JA, Gomez P, Perez-Jimenez F. Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17(2):132-138.
- (122) Howard BV, Hannah JS, Heiser CC, Jablonski KA, Paidi MC, Alarif L, Robbins DC, Howard WJ. Polyunsaturated fatty acids result in greater cholesterol lowering and less triacylglycerol elevation than do monounsaturated fatty acids in a dose-response comparison in a multiracial study group. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(2):392-402.
- (123) Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 2004; 292(12):1440-1446.
- (124) Vokurkova M, Novakova O, Dobesova Z, Kunes J, Zicha J. Relationships between membrane lipids and ion transport in red blood cells of Dahl rats. *Life Sci* 2005; 77(13):1452-1464.
- (125) Zicha J, Sang KH, Kunes J, Devynck MA. Membrane microviscosity, blood pressure and cytosolic pH in Dahl rats: the influence of plasma lipids. *J Hypertens* 1999; 17(6):785-792.

- (126) Chen ZY, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem* 2008; 56(19):8761-8773.
- (127) Fruchart JC, Sacks F, Hermans MP, Assmann G, Brown WV, Ceska R, Chapman MJ, Dodson PM, Fioretto P, Ginsberg HN, Kadowaki T, Lablanche JM, Marx N, Plutzky J, Reiner Z, Rosenson RS, Staels B, Stock JK, Sy R, Wanner C, Zambon A, Zimmet P. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol* 2008; 102(10 Suppl):1K-34K.
- (128) Tresaco B, Moreno LA, Ruiz JR, Ortega FB, Bueno G, Gonzalez-Gross M, Warnberg J, Gutierrez A, Garcia-Fuentes M, Marcos A, Castillo MJ, Bueno M. Truncal and abdominal fat as determinants of high triglycerides and low HDL-cholesterol in adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17(5):1086-1091.
- (129) Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* 2009; 10(2):109-121.
- (130) Do R, Kiss RS, Gaudet D, Engert JC. Squalene synthase: a critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. *Clin Genet* 2009; 75(1):19-29.
- (131) Biggerstaff KD, Wooten JS. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Adv Physiol Educ* 2004; 28(1-4):105-106.
- (132) Karelis AD, Pasternyk SM, Messier L, St Pierre DH, Lavoie JM, Garrel D, Rabasa-Lhoret R. Relationship between insulin sensitivity and the triglyceride-HDL-C ratio in overweight and obese postmenopausal women: a MONET study. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32(6):1089-1096.
- (133) Gaziano JM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Breslow JL, Buring JE. Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96(8):2520-2525.
- (134) Ravussin E, Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967:363-378.
- (135) Lemieux I. Energy partitioning in gluteal-femoral fat: does the metabolic fate of triglycerides affect coronary heart disease risk? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(5):795-797.

- (136) McCormick CP, Rauch AL, Buckalew VM, Jr. Differential effect of dietary salt on renal growth in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* 1989; 13(2):122-127.
- (137) Zhang HY, Reddy S, Kotchen TA. A high sucrose, high linoleic acid diet potentiates hypertension in the Dahl salt sensitive rat. *Am J Hypertens* 1999; 12(2 Pt 1):183-187.
- (138) Jacomelli M, Pitozzi V, Zaid M, Larrosa M, Tonini G, Martini A, Urbani S, Taticchi A, Servili M, Dolaro P, Giovannelli L. Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *J Nutr Biochem* 2009.
- (139) Alonso A, Martinez-Gonzalez MA. Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension: the SUN study. *Lipids* 2004; 39(12):1233-1238.
- (140) Nagae A, Fujita M, Kawarazaki H, Matsui H, Ando K, Fujita T. Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in obesity-induced hypertension. *Circulation* 2009; 119(7):978-986.
- (141) Riazi S, Tiwari S, Sharma N, Rash A, Ecelbarger CM. Abundance of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 is increased by high-fat feeding in Fischer 344 X Brown Norway (F1) rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(4):F762-F770.
- (142) Fan LH, Tian HY, Ma AQ, Hu Z, Huo JH, Cao YX. Altered ATP-sensitive potassium channels may underscore obesity-triggered increase in blood pressure. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29(10):1167-1174.
- (143) Uemura K, Mori N. Influence of age and sex on high-fat diet-induced increase in blood pressure. *Nagoya J Med Sci* 2006; 68(3-4):109-114.
- (144) Kiefer CR, McKenney JB, Trainor JF, Snyder LM. Pulse-pressure-driven neutral lipid accumulation and correlative proinflammatory markers of accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2005; 183(1):17-24.
- (145) Mattson DL, Meister CJ, Marcelle ML. Dietary protein source determines the degree of hypertension and renal disease in the Dahl salt-sensitive rat. *Hypertension* 2005; 45(4):736-741.

- (146) Guyton AC, Hall JE, Coleman TG, Manning RD, Norman RA. Dominant role of the kidneys in long-term arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* 2e édition, 273-281. 1995. J. H. Laragh et B.M. Brenner (New York: Raven Press).
- (147) Berge-Landry H, James GD. Serum electrolyte, serum protein, serum fat and renal responses to a dietary sodium challenge: allostasis and allostatic load. *Ann Hum Biol* 2004; 31(4):477-487.
- (148) Song J, Hu X, Shi M, Knepper MA, Ecelbarger CA. Effects of dietary fat, NaCl, and fructose on renal sodium and water transporter abundances and systemic blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(6):F1204-F1212.
- (149) Lu J, Bankovic-Calic N, Ogborn M, Saboorian MH, Aukema HM. Detrimental effects of a high fat diet in early renal injury are ameliorated by fish oil in Han:SPRD-cy rats. *J Nutr* 2003; 133(1):180-186.
- (150) Packard M, Saad Y, Gunning WT, Gupta S, Shapiro J, Garrett MR. Investigating the effect of genetic background on proteinuria and renal injury using two hypertensive strains. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(4):F839-F846.
- (151) Dumas P, Kren V, Krenova D, Pravenec M, Hamet P, Tremblay J. Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion. *J Hypertens* 2002; 20(2):209-217.
- (152) Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(4 Suppl 2):S81-S85.
- (153) Altunkaynak ME, Ozbek E, Altunkaynak BZ, Can I, Unal D, Unal B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *J Anat* 2008; 212(6):845-852.
- (154) Schlaich MP, Grassi G, Lambert GW, Straznicky N, Esler MD, Dixon J, Lambert EA, Redon J, Narkiewicz K, Jordan J. European Society of Hypertension Working Group on Obesity Obesity-induced hypertension and target organ damage: current knowledge and future directions. *J Hypertens* 2009; 27(2):207-211.
- (155) Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases- insights from animal models. *Kidney Int* 2005; 67(2):404-419.

- (156) Li XM, Ma YT, Yang YN, Liu F, Chen BD, Han W, Zhang JF, Xiao G. Downregulation of survival signaling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac Hypertrophy towards to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009.
- (157) Wilkins MR, Settle SL, Needleman P. Augmentation of the natriuretic activity of exogenous and endogenous atriopeptin in rats by inhibition of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate degradation. *J Clin Invest* 1990; 85(4):1274-1279.
- (158) Charloux A, Piquard F, Doutreleau S, Brandenberger G, Geny B. Mechanisms of renal hyporesponsiveness to ANP in heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003; 33(9):769-778.
- (159) Wei P, Lane PH, Lane JT, Padanilam BJ, Sansom SC. Glomerular structural and functional changes in a high-fat diet mouse model of early-stage Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47(9):1541-1549.
- (160) Deji N, Kume S, Araki S, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Uzu T. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(1):F118-F126.
- (161) Chauvet C, Menard A, Tremblay J, Xiao C, Shi Y, L'heureux N, Cardin S, Tardif JC, Nattel S, Deng AY. Cardiac pathways distinguish two epistatic modules enacting BP quantitative trait loci and candidate gene analysis. *Hypertens Res* 2009; 32(7):631-637.
- (162) Soualmia H, Ayadi I, Omar S, Feki M, Drissa H, Mebazaa A, Kaabachi N. Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release in human essential hypertension. *Clin Lab* 2009; 55(3-4):120-127.
- (163) Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens* 2008; 21(7):733-741.
- (164) Dessì-Fulgheri P, Sarzani R, Tamburrini P, Moraca A, Espinosa E, Cola G, Giantomassi L, Rappelli A. Plasma atrial natriuretic peptide and natriuretic peptide receptor gene expression in adipose tissue of normotensive and hypertensive obese patients. *J Hypertens* 15[12 Pt 2], 1695-1699. 1997.
- (165) Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(10):2023-2039.

- (166) McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34(4):255-262.
- (167) Peterson MC. Circulating transforming growth factor beta-1: a partial molecular explanation for associations between hypertension, diabetes, obesity, smoking and human disease involving fibrosis. *Med Sci Monit* 2005; 11(7):RA229-RA232.
- (168) Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci* 2001; 321(4):225-236.
- (169) Thakur V, Richards R, Reisin E. Obesity, hypertension, and the heart. *Am J Med Sci* 2001; 321(4):242-248.
- (170) Reisin E, Jack AV. Obesity and hypertension: mechanisms, cardio-renal consequences, and therapeutic approaches. *Med Clin North Am* 2009; 93(3):733-751.
- (171) Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess DJ, Sharov VG, Sabbah HN, Hoit BD, Ernsberger P, Chandler MP, Stanley WC. Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. *Hypertension* 2006; 48(6):1116-1123.
- (172) Chess DJ, Lei B, Hoit BD, Azimzadeh AM, Stanley WC. Effects of a high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload. *J Card Fail* 2008; 14(1):82-88.
- (173) Duda MK, O'Shea KM, Tintinu A, Xu W, Khairallah RJ, Barrows BR, Chess DJ, Azimzadeh AM, Harris WS, Sharov VG, Sabbah HN, Stanley WC. Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* 2009; 81(2):319-327.
- (174) Frohlich ED, Varagic J. Sodium directly impairs target organ function in hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20(5):424-429.
- (175) Bartel S, Karczewski P, Morano I, Krause EG. Function of C-protein and troponin I phosphorylation in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 752:243-245.

- (176) Zhang Q, Scholz PM, He Y, Tse J, Weiss HR. Cyclic GMP signaling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction. *Cell Calcium* 2005; 37(3):259-266.
- (177) Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, Shivalingappa V, Ke Q, Chen YS, Rigor DL, Stillman I, Tamez H, Kroeger PE, Wu-Wong RR, Karumanchi SA, Thadhani R, Kang PM. Activated vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(43):16810-16815.
- (178) Sharma N, Okere IC, Duda MK, Johnson J, Yuan CL, Chandler MP, Ernsberger P, Hoit BD, Stanley WC. High fructose diet increases mortality in hypertensive rats compared to a complex carbohydrate or high fat diet. *Am J Hypertens* 2007; 20(4):403-409.
- (179) Avelar E, Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Strong M, Pendleton RC, Segerson N, Adams TD, Gress RE, Hunt SC, Litwin SE. Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension* 49[1], 34-39. 2007.
- (180) Lavie CJ, Milani RV, Patel D, Artham SM, Ventura HO. Disparate effects of obesity and left ventricular geometry on mortality in 8088 elderly patients with preserved systolic function. *Postgrad Med* 2009; 121(3):119-125.
- (181) Reisin E, Jack AV. Obesity and hypertension: mechanisms, cardio-renal consequences, and therapeutic approaches. *Med Clin North Am* 2009; 93(3):733-751.
- (182) Woodiwiss AJ, Libhaber CD, Majane OH, Libhaber E, Maseko M, Norton GR. Obesity promotes left ventricular concentric rather than eccentric geometric remodeling and hypertrophy independent of blood pressure. *Am J Hypertens* 2008; 21(10):1144-1151.
- (183) Diez J. Towards a new paradigm about hypertensive heart disease. *Med Clin North Am* 2009; 93(3):637-645.
- (184) Nevill AM, Bate S, Holder RL. Modeling physiological and anthropometric variables known to vary with body size and other confounding variables. *Am J Phys Anthropol* 2005; Suppl 41:141-153.

- (185) Gerds E, Oikarinen L, Palmieri V, Otterstad JE, Wachtell K, Boman K, Dahlof B, Devereux RB. Correlates of left atrial size in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE) Study. *Hypertension* 2002; 39(3):739-743.
- (186) Vaziri SM, Larson MG, Lauer MS, Benjamin EJ, Levy D. Influence of blood pressure on left atrial size. The Framingham Heart Study. *Hypertension* 1995; 25(6):1155-1160.
- (187) Benjamin EJ, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA, Levy D. Left atrial size and the risk of stroke and death. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1995; 92(4):835-841.
- (188) Koch R, Sharma AM. Obesity and cardiovascular hemodynamic function. *Curr Hypertens Rep* 1[2], 127-130. 1999.
- (189) D'Souza SP, Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 2004; 101(2):113-129.
- (190) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, Tahira Y, Ayame H, Zhang W, Bando T, Sugiyama H, Saito S, Matsumoto K, Mugishima H, Serie K. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the TGF-beta1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(2):422-432.
- (191) Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem* 2002; 230(1-2):31-47.
- (192) Mistrik P, Mader R, Michalakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2005; 280(29):27056-27061.
- (193) Zhou YF, Yang XJ, Li HX. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel gene: the most possible therapeutic applications in the field of cardiac biological pacemakers. *Med Hypotheses* 2007; 69(3):541-544.
- (194) Tomaselli GF, Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 42(2):270-283.

- (195) Kim Y, Phan D, van Rooij E, Wang DZ, McAnally J, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(1):124-132.
- (196) Hanke S, Mann M. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(3):519-534.
- (197) Ritter M, Buechler C, Boettcher A, Barlage S, Schmitz-Madry A, Orso E, Bared SM, Schmiedeknecht G, Baehr CH, Fricker G, Schmitz G. Cloning and characterization of a novel apolipoprotein A-I binding protein, AI-BP, secreted by cells of the kidney proximal tubules in response to HDL or ApoA-I. *Genomics* 2002; 79(5):693-702.
- (198) Jha KN, Shumilin IA, Digilio LC, Chertihin O, Zheng H, Schmitz G, Visconti PE, Flickinger CJ, Minor W, Herr JC. Biochemical and structural characterization of apolipoprotein A-I binding protein, a novel phosphoprotein with a potential role in sperm capacitation. *Endocrinology* 2008; 149(5):2108-2120.
- (199) Monroy A, Kamath S, Chavez AO, Centonze VE, Veerasamy M, Barrentine A, Wewer JJ, Coletta DK, Jenkinson C, Jhingan RM, Smokler D, Reyna S, Musi N, Khokka R, Federici M, Tripathy D, Defronzo RA, Folli F. Impaired regulation of the TNF-alpha converting enzyme/tissue inhibitor of metalloproteinase 3 proteolytic system in skeletal muscle of obese type 2 diabetic patients: a new mechanism of insulin resistance in humans. *Diabetologia* 2009.
- (200) Lara-Ramirez R, Segura-Anaya E, Martinez-Gomez A, Dent MA. Expression of interleukin-6 receptor alpha in normal and injured rat sciatic nerve. *Neuroscience* 2008; 152(3):601-608.
- (201) Moutabarrik A, Nakanishi I, Ishibashi M. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells. *Scand J Immunol* 1994; 40(2):181-186.
- (202) Deng AY. Is the nitric oxide system involved in genetic hypertension in Dahl rats? *Kidney Int* 1998; 53(6):1501-1511.
- (203) Alonso-Org, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Caceres PJ, Sacristan D, Perez-Vizcaino F, Segura A, Tamargo J, Lopez-Farre A. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res* 2006; 5(9):2301-2308.

- (204) Herrera VL, Ponce LR, Bagamasbad PD, VanPelt BD, Didishvili T, Ruiz-Opazo N. Embryonic lethality in *Dear* gene-deficient mice: new player in angiogenesis. *Physiol Genomics* 2005; 23(3):257-268.
- (205) Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PW, Vasan RS. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2004; 109(5):594-600.
- (206) Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev.* 1997;77(2):465-51.

ANNEXE I : Article en préparation

Distinct roles for Nitric oxide and Atrial Natriuretic Peptide receptors in Dahl chromosome 2 congenic rats

Valérie Fillion-Forté^a, Junzheng Peng^a, Alan Y Deng^a, Pavel Hamet^a and Johanne Tremblay^a

^aResearch Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM - Technopôle Angus), Montreal, Quebec, Canada

Running title: sGC and GC-A roles in Dahl congenic rats

Words count : 4904

Abstract

ANP acting via its receptor GC-A and NO acting via its receptor sGC are well known for their vasodilatory, natriuretic and diuretic effects and their role in the control of blood pressure. We studied two congenic strains of Dahl hypertensive rats (DSS) in which short segments of chromosome 2 were replaced by those from Milan normotensive rats (containing GC-A and/or sGC genes) to determine the specific role of GC-A and/or sGC on blood pressure, kidney function, body fat and lipid profile. Kidney function was assessed using creatinine clearance, after ANP stimulation post-water-load (diuresis, natriuresis) and by histopathological analysis. The distribution of body fat was determined by EchoMRI and lipid profile was analyzed. Kidney and fat mRNA levels were measured by real-time PCR. Blood pressure measured by telemetry was lower in C2SM9 than C2SM12 and DSS. Moreover, C2SM9 rats exhibited the highest diuretic response to ANP but only slightly higher natriuretic response. Total cholesterol, HDL and LDL were lower in C2SM12 and C2SM9 than DSS. Creatinine clearance was the lowest in DSS. Renal damage score was the lowest in C2SM9. GC-A and GC-A/NprC mRNA levels were lower in C2SM9 in cortex and retroperitoneal fat. Differences between C2SM9 and C2SM12 could be attributed to the segment containing sGC or GC-A locus. Our results demonstrate a specific implication of GC-A locus in blood pressure, diuretic response to ANP and renal protection. Moreover, our results suggest that cholesterol, HDL and LDL levels are under the control of the chromosome 2 segment containing sGC only.

Condensed Abstracts

The ANP and NO receptor (GC-A and sGC) are well known for their role in the kidney function and for the control of blood pressure (BP). Congenic strains of Dahl hypertensive rats (DSS) in which short segments of chromosome 2 were replaced by those from Milan normotensive rats, were used to determine the role of GC-A and/or sGC on kidney function, BP and obesity. We demonstrated a specific implication of GC-A locus in BP, diuretic response to ANP and renal protection. Moreover, our results suggest that cholesterol, HDL and LDL levels are under the control of the segment containing sGC.

Key words: atrial natriuretic peptides receptor, congenic strains, Dahl S, hypertension, metabolic syndrome, obesity, soluble guanylyl cyclase

Introduction

Metabolic syndrome is defined by a combination of risk factors, including high blood pressure, signs of kidney disease, obesity, hyperlipidemia, diabetes and insulin resistance, which all together increase the risk of heart diseases (American Diabetes Association and the European Association for the study of diabetes, 2005). According to the World Health Organisation, cardiovascular diseases, including coronary heart diseases and hypertension, are the first causes of mortality worldwide. Natriuretic peptides and nitric oxide (NO) are well known vasodilators that play a key role in the regulation of blood pressure (Tremblay, 2002 and Wimalawansa, 2008). Many dysfunctions in the NO system and the ANP (atrial natriuretic peptide) system are associated to hypertension. Both ANP and NO systems are linked by their second messenger cGMP and have common mechanism of regulation such as phosphodiesterase enzymes which degrade cGMP, common effectors such as protein kinase G (PKG), and both receptors have also a guanylyl cyclase enzymatic activity. Some subunits of sGC (soluble guanylyl cyclase) and the GC-A receptor (Guanylyl cyclase subtype A) are both gene found on the rat chromosome 2 (Dutil, 2005).

Atrial natriuretic peptide is a well characterized peptide hormone mainly released after atrial stretch. It induces its action after binding to its receptor GC-A/NPR-A. ANP can also bind to the clearance receptor NPR-C (Guanylyl cyclase subtype C) to regulate its activity via clearance of the peptide from the circulation. Indeed, renal effects of ANP to regulate the blood pressure are to increase fluid and salt excretion, antagonize the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), increase vasodilation and increase the capillary permeability (Tremblay, 2002, Martel 2009). Moreover, a recent study showed that ANP

decreases cytokines involved in inflammation and insulin resistance, including tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 (Moro, 2007). Evidence that ANP as well as RAAS are involved in obesity has increased over the last years. Modulation of GC-A/NprC seems to be involved in the pathophysiology of obesity and hypertension in humans (Sarzani et al., 2008). In humans, but not in rodents, lipolytic activity of ANP has been reported (Sarzani, 2008). This group hypothesized that natriuretic peptides could reduce fat pad volume. In rats, a recent study suggested that ANP may promote adipocyte differentiation and lipolysis via the NPR-A/cGMP/PKG pathway (Nishikimi T, 2008). Our group has identified a polymorphism in the promoter region of GC-A which negatively regulates the transcriptional activity of its gene (Tremblay, 2003, Hum 2004). The number of repetitions of a dinucleotide TA repeat is different between Dahl hypertensive rat (DSS) which have 10 repetitions and Milan normotensive strain (MNS) which have 25-32 repetitions (Tremblay, 2003). Altogether this suggests that GC-A gene is a candidate gene of hypertension and metabolic syndrome in DSS rats.

Nitric oxide (NO) system is another system involved in blood pressure control. It has been suggested that NO system in DSS rat might be of less importance (Deng, 1998). NO released from the endothelium acts on smooth muscle cells to induce vasodilation. Others properties of NO are its natriuretic and diuretic effects. Defects in NO synthesis could be linked to hypertension and insulin resistance and may predispose to cardiovascular diseases (Sherrer, 2000). The receptor of NO, soluble GC is a α/β heterodimer and the combination $\alpha 1/\beta 1$ is recognized as the universal form (Azam M, 1998). In SHR rats, we observed enhanced expression of the alpha1 subunit in aortic smooth muscle cells of SHR compared to Brown-Norway rats. This selective increase of

alpha 1 sGC in aortae coincides with the development of hypertension from 2 to 20 weeks of age (Besnard S Tremblay J, unpublished results). The specific activity of the heterodimer $\alpha 1/\beta 2$ is lower than the universal form (Azam M, 1998). In Dahl rats, the expression of the $\beta 2$ subunits is increased whereas the $\beta 1$ is decreased when compared with Dahl resistant rats (Azam M, 1998), sGC subunits regulation could also be involved in the development of hypertension in DSS.

Fibrinogen gamma gene (fgg) is a fibrin precursor and some haplotype are associated with an higher risk of deep venous thrombosis (Uitte de Willige, 2005) and stroke when combined with fibrinogen alpha (fga) (Cheung EY, 2008) in humans.

Congenic strains of chromosome 2 were used as a tool to improve the knowledge of the natriuretic peptide receptor (GC-A) and the nitric oxide receptor (NO) implication in a context of metabolic syndrome. Dahl hypertensive rats (DSS) harbouring short segments of chromosome 2 from normotensive origin (containing GC-A, sGC subunits and/or fgg genes) were used to determine the shared or distinct roles of GC-A and sGC on blood pressure, kidney function, body fat and lipid profile. As illustrated in Figure 1, C2SM9 contains GC-A and sGC from normotensive origin on the background of DSS while C2SM12 harbours a shorter segment of the normotensive strain which contains sGC but not NPR-A from normotensive origin. It was previously reported that on a high salt diet, the mean arterial blood pressure (MAP) determined by radiotelemetry, was lower in C2SM9 than in DSS and C2SM12 (Dutil, 2005), supporting the hypothesis that these candidates genes are important for blood pressure regulation. We studied these two congenic strains of Dahl hypertensive rats (DSS) in which short segments of chromosome 2 were replaced by

those from Milan normotensive rats (containing GC-A and/or sGC genes) to determine the shared and distinct roles of GC-A and/or sGC on blood pressure, kidney function, body fat and lipid profile.

Materials and Methods

Animals

Congenic strains C2SM9, C2SM12 and DSS are described previously (Dutil, 2005). Breeding was accomplished in our animal facility. Male rats were weaned at 28 days of age and then separated into 2 groups for radio-telemetry and for other measurements including metabolic cages. The rats were kept on a 12-hour light/dark cycle with water and standard laboratory chow (0.23%Na; Teklad, Diet 2018) *ad libitum* until the end of the protocol. Rats were weighed once a week.. All the procedures followed the standards of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the animal ethics committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Centre.

Blood pressure measurement by radiotelemetry

MAP was assessed by radiotelemetry. Rats were anaesthetized with isoflurane and 2% oxygen and then implanted in the femoral artery of 12 week old rats with a TA11PA-C40 probe (Data Sciences international). After surgery, rats were given an analgesic (buprenorphine 0.05g mg/Kg) for 2 days and were left 10 days in isolated cages for post-operative recovery. At 18 weeks, MAP was recorded using Dataquest A.R.T. 2.3 software. Rats were sacrificed 5 days later.

Metabolic cages and ANP response after water-load

Body weight was determined at least once a week. Diuretic and natriuretic responses to ANP were determined as described (Soares, 1999). In brief, after overnight fasting, body weight (BW) was measured and a water-load (5% BW) was administrated by gavage. Rats

were then transferred in metabolic cages (without access to food and water) for urine collection. Forty minutes later, rats underwent light anaesthesia with 4% isoflurane and 1.5% oxygen and injected intravenously with sterile physiological saline (400 μ l) for the baseline condition or ANF (Bachem; #H-2100; 30 μ g/kg; 400 μ l). Diuresis and Natriuresis were determined after 40 and 60 minutes collection time. Quantitative Magnetic Resonance Body Composition Analyzer (EchoMRI-900™, Echo Medical Systems) was used one day prior sacrifice to determine the fat and lean mass. Rats were then placed in metabolic cages for urine collection to determine creatinine and proteinuria. Seric creatinine and aldosterone were measured. Urine and serum samples were sent to the biochemistry services from the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) for quantification. After sacrifice, organs were weighed, quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction. Kidneys were fixed in 4% buffered formaldehyde.

Guanylyl cyclase stimulation

Fresh right kidneys were maintained in an oxygenated Krebs's solution maintained at 4°C. Glomeruli were immediately isolated by successive filtration on 250, 150 and 106 μ m sieve. A pre-incubation with isobutylmethylxanthine (IBMX) 500 μ M (Sigma Aldrich Canada, #cat: I-7018) followed by ANP 5×10^{-8} M or 10^{-12} M (baseline) (Tocris Bioscience, #cat: 1912) diluted in acetic acid 0,1N. Reactions were stopped with pyrrolidone carboxylic acid (PCA) 1N and conserved at -35°C until the dosage (Tremblay J, 1993). Glomeruli were sonicated (Branson sonifier 150, 80W) 3 times for 20 sec. The supernatant was obtained after centrifugation 10 minutes at 1000g, acetylated and the cGMP was

measured using the EIA cGMP kit (Cayman, #cat: 581021). Protein were measured using the Lowry modified method (Hartree EF, 1972) in samples without acid added.

Histology

Fixed kidneys were sent at the Histology Core Facility from Institute for research in Immunology and Cancer (IRIC). Slides were stained with hematoxylin and eosin and a blinded histopathological analysis was performed by a pathologist, Dr Louis Gaboury. Twenty-one parameters, separated into five categories (glomeruli, tubules, pelvis & fornix, vessels and interstitial space) were observed and semi-quantified. Representative pictures were taken.

RNA extraction and Real-Time PCR

Total RNA was extracted using, TRIzol ® reagent (Invitrogen; #cat 15596-026) from retroperitoneal fat, kidney cortex, atria and ventricles. DNA was digested with DNase I (Invitrogen #cat 18047-019) according to the manufacturer's protocol and this was followed by a second Trizol RNA extraction to purify RNA. Reverse transcription were performed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen #cat 28025-013) in the presence of RNase inhibitor (RNase out, Invitrogen, #cat 10777-019) and using 1µg of RNA and according to the manufacturer's protocol. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed with a Rotorgene RG-3000 (Corbett Research) using SYBR-green based technology (Quantitech SyberGreen Mastermix, QIAGEN, #cat. 204143) according to the manufacturer's protocol. To verify genomic DNA contamination qPCR was performed using RNA in the same proportion than samples. A set of primers for GC-A were designed for real-time PCR applications using Primer 3 software and were intron spanning (Fwd-

cctttcaggctgccccaaat; Rev-gatgatattcttcaggccatcc). NprC and pre-pro-ANP primers were as previously described (Rollin, 2005). Because β -actin was validated as a good internal control for conditions similar to ours (Biederman, 2004) and because we found no variation of β -actin mRNA levels between each group, it was used to normalize gene expression. For each primer, a standard curve was constructed by serial dilutions of kidney cortex or retroperitoneal fat cDNA prior to mRNA quantification.

Sequencing of GCA coding region

For the coding region sequencing, primers set were design according to the rat reference sequence (accession number J05677). For the TA repeat region, primers GC-A724-S and GC-A867-AS (fwd 5'-GATAGTAGCCCTCATCTCCG; Rev 5'-GGACAGCTATGTGAAGTGCC) were used to amplify the TA repeat stretch located at position -943 (Tremblay, 20003) . PCR products were extracted from the gel, purified (GE healthcare kit) and sent at the sequencing facility at Notre-Dame -Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

In silico analysis

DNA markers were blast to determine the exact position in the respective contig included in the chromosomic segment for each congenic strains. The size (in MB) for each segment was determined. Using the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database, the genes included in the segment were repertoried and analysed using Venn diagram.

Statistical analysis

The results are expressed as means \pm SEM. The number of rats in each group is indicated in each figure. Comparisons were made by unpaired or paired Student t test using Statview 5.0 software. Differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results

Blood Pressure

18 week-old male rats of the C2SM9 congenic substrain had a mean arterial blood pressure (MAP) of 118.9 ± 3.0 mmHg and it was significantly lower than C2SM12 (136.6 ± 4.0 ; $p=0.0044$) and DSS (143.4 ± 4.5 ; $p=0.0010$) on normal diet (0.23% Na) (Fig. 2). Although slightly lower, the MAP of C2SM12 was not significantly different from DSS ($p=0.3342$) (Fig. 2). These blood pressure values are lower than reported our previous report (Dutil, 2005) when rats were fed a high salt diet. This suggests that the salt-sensitive character of the DSS is not located within these chromosomes segments on chromosomes 2 as the three strains have a higher blood pressure on high and normal salt diets.

Kidney histopathology

At 19 weeks, C2SM9 had a lower total renal damage score (Fig. 3B) than DSS ($p=0.0084$) while C2SM12 had an intermediate score between DSS and C2SM9. Tubules were the most damaged and exhibited highest differences between the strains (Fig. 3A). Damage could also be observed at the level of the glomeruli, again with lower damage score for C2SM9 strain. Representative pictures of kidney damage are shown (Fig 3C).

mRNA levels of pre-pro ANP, GC-A and GC-A/NprC ratio

In kidney cortex, C2SM9 had a lower GC-A ($p=0.0115$) and GC-A/NprC mRNA ratio ($p=0.0047$) than DSS and C2SM12 (Fig. 4A). We observed the same expression pattern in retroperitoneal fat. Indeed, C2SM9 had a lower GC-A and GC-A/NprC mRNA ratio than DSS ($p=0.009$; $p=0.0006$) and C2SM12 ($p=0.0002$; <0.0001) (Fig. 4B). For both tissues,

we observed no significant difference in the GC-A and GC-A/NprC mRNA ratio between C2SM12 and DSS. Pre-pro ANP mRNA levels were not different among the strains in atria (Fig. 5A). However, C2SM9 had lower pre-pro ANP mRNA levels than DSS and C2SM12 in ventricles (Fig. 5B).

Diuretic and Natriuretic response to ANP

Natriuresis and diuresis were determined 60 min after water load of anaesthetised rats injected with 400 μ l saline vehicle or 30 μ g/kg ANP (Sybertz, 1990). C2SM9 had higher diuresis after waterload compared to C2SM12 or DSS (respectively $p=0.0467$ and $p=0.0113$). The diuresis was not different between DSS and C2SM12 ($p=0.8552$) (Fig. 6A). ANP injection increased diuresis and natriuresis compared to saline injection (Fig. 6A-B) and again the diuresis of C2SM9 strain was higher than that of C2SM12 and DSS (respectively $p=0.0271$ and $p=0.0025$). Although not significant, the natriuresis after water-load was also higher in C2SM9 as was the natriuresis after ANP injection (Fig. 5B). Natriuresis of C2SM12 was not different from DSS after water-load or ANP stimulation ($p=0.3374$) (Fig. 6B).

Guanylyl cyclase stimulation

We observed that all the strains were responsive to the glomeruli stimulation by ANP (Fig. 7). The cGMP levels at the baseline levels were not significant among the three strains, but the C2SM9 appears to be slightly higher than DSS and C2SM12. Moreover, the cGMP levels after ANP stimulation were significantly higher in the DSS rats than in C2SM9 while there were no difference between C2SM12 and DSS. Interestingly, the fold increase

of C2SM9 was the lower (2.5 fold), DSS was the higher (13 fold) and C2SM12 (6 fold) appears to be intermediate.

Lipid profile and Body composition

C2SM9 had significantly lower total cholesterol, HDL and LDL levels than DSS (respectively $p=0.0181$; $p=0.0047$; $p=0.0135$) (Fig.8A-C). Lipid levels were not different between C2SM9 and C2SM12 as C2SM12, had also a tendency to have lower total cholesterol, HDL and LDL than DSS (respectively $p=0.0939$; $p=0.0947$; $p=0.1344$). The body weight at the end of the protocol of C2SM9 and C2SM12 was lower than DSS ($p=0.0004$; $p=0.0045$) but were not different all together ($p=0.9537$) (Fig.10B). The body composition measured by the fat/lean ratio was not different between the strains (Fig. 10A).

Creatinine Clearance and proteinuria

The creatinine clearance was not different between C2SM9 and C2SM12 ($p=0.8922$) (Fig. 10A). They both had higher creatinine clearance than DSS ($p=0.0191$; $p=0.0491$). All the strains had hyperproteinuria but we observed no difference among the strains (Fig. 10B). They were no difference among the strains for the seric aldosterone levels (Fig. 10C).

Sequencing of GCA coding region

The analysis of the sequence located at position -943 related to the transcription start site revealed that C2SM12 and DSS contain 10 consecutive TA repeat whereas C2SM9 contains 24 TA repeat (Table 1).

Discussion

As illustrated (Fig.1), the two congenic strains have in common a small chromosome 2 segment from normotensive origin while the rest of the genome is from the parental DSS hypertensive strain. The chromosome 2 segment from normotensive origin is shorter in C2SM12 than in C2SM9 so that the GC-A allele present in C2SM12 is from DSS origin. Thus, when physiological parameters are similar between C2SM12 and DSS but different (superior or inferior) from C2SM9, we can attribute a role for this locus in relation to these parameters. Thus, our results showed that the blood pressure under normal diets, diuresis and natriuresis, kidney damage and mRNA levels of GC-A are at least partially under the control of the locus containing GC-A in this genetic model of hypertension.

Using the same logic we can conclude that, when physiological parameters are similar between C2SM9 and C2SM12 but different from DSS, a specific function can be attributed to this segment which contains sGC and fgg as candidate genes. Thus, our results showed that the locus containing the sGC subunits and fgg is important in determining lipid profile, body weight and creatinine clearance in this rat model and under normal diet. .

Specific roles for the locus containing the ANP receptor, GC-A

Phenotypes of C2SM9 that could be attributed to the GC-A locus might be the consequence of differential expression levels of GC-A. We have sequenced the coding region, 5' UTR of GC-A gene from normotensive (MNS) and hypertensive (DSS) origin (Table 1). We identified few single nucleotide polymorphisms in the coding regions but they were all neutral mutations. Previous work from our group revealed that the numbers of repetitions of a dinucleotide TA present in the promoter of GC-A is inversely correlated

with the transcriptional activity of its gene (Tremblay, 2003). Here we showed that strains harbouring GC-A from hypertensive origin (DSS, C2SM12) have 10 TA repeat but strains that harbour GC-A from normotensive origin (MNS, C2SM9) had 23 TA repeat (Table I). We showed that DSS which contains 10 TA repeats in GC-A promoter has a higher transcription activity, in a gene reporter assay, than MNS that contain 23 TA repeat (Tremblay, 2003). This is the main difference that we found between the two GC-A alleles that could have consequences on its expression levels. Because C2SM9 contains the GC-A allele of MNS origin while C2SM12 harbours GC-A of DSS origin, we can expect that expression pattern of the GC-A receptor in kidney cortex and retroperitoneal fat (Fig. 4) is at least partially the consequence of this difference in the promoter. Indeed, we observed lower GC-A mRNA levels or GC-A/NprC levels in kidney cortex and retroperitoneal fat of C2SM9 compared to DSS and C2SM12 strains. Furthermore, we found no variation among the three strains for the mRNA levels of pre-pro ANP in atria.

Kidneys play a major role in the control of blood pressure. Our results showed that C2SM9 has a lower MAP than DSS and C2SM12 on normal diet (the current study) and on high salt diet (Dutil, 2005) supporting the role of this chromosomal segment in blood pressure regulation but not in its salt-sensitivity component as the difference between the strains is seen in rats fed both diets. The fact that the GC-A mRNA level are higher in C2SM12 and DSS than C2SM9, suggests that the regulation of expression of GC-A is under the control of the GC-A gene itself or genes in its vicinity and that the system is defective in the hypertensive strains DSS and C2SM12. A higher GC-A activity would normally lead to higher vasodilation and thus lower blood pressure. On the other hand, the higher blood pressure of C2SM12 and DSS could be mediated by lower diuretic and

natriuretic capacity, as we observed concomitant with the fact that there is more damage in DSS and C2SM12 kidneys. Finally, we showed that the guanylyl cyclase stimulation by ANP in isolated was only 2.5 fold increased in the C2SM9 strains while DSS had a 13 fold stimulation and C2SM12 had a 6 fold intermediate stimulation.

All together, those results indicate that the locus from normotensive origin improve the cardiovascular status of the Dahl rats. However, the expression level of GC-A mRNA levels and the guanylyl cyclase activity after ANP stimulation do not correlate with its activity either with the blood pressure, suggesting a dysfunction downstream to GCA. Signalisation pathways, downstream to GCA, included dysfunctions in effective proteins such as CNG channel or cGMP-dependant protein kinase (PKG). From the 411 genes from the normotensive origin included in the C2SM9 chromosomal segment, as indicated by the Venn diagram (Fig. 11A), potential gene that might be implicated in the phenotypes have be highlighted.

Until now, implication of GC-A in Dahl hypertensive rat has been generally studied with a high salt diet to induce salt-sensitive hypertension. ANP gene delivery in Dahl rats on high salt diet attenuate hypertension, kidney damage and cardiac hypertrophy (Lin, 1999). Endogenous ANP induce natriuresis more important in hypertensive than in normotensive rats (Wambach G, 1989). We observed that DSS and C2SM12 had higher levels of pre-pro ANP mRNA levels in ventricles. Because ANP is a cardiac hypertrophy markers (Nishikimi T, 2006), we might expect that those strains had different pattern of cardiac hypertrophy related to the different degree of hypertension. However, we did not observed difference among the three strains for either cardiac hypertrophy or fibrosis (data

not shown). One could expect, difference among the strains occurs with time as blood pressure increase with age.

In humans, ANP can inhibit the transcription of GC-A through a cGMP-dependant response element (Hum D, 2004). This element might be present in rat and modulate the expression of GC-A. Previous study in Dahl rats has reveal potential mecanism to explain hypertension including an higher NaCl reabsorption in the loop of Henle resulting in lower sodium excretion (Roman RJ, 1991). Hypertension in DSS has also been attributed to sympathetic system and vasopressin and are dependant of the cGMP concentration in vascular smooth muscle cells (Bayorh, 1998). ANP is a direct antagonist of RAAS and someone could expect that the phenotypes observed here are consequences of RAAS inhibition (Sarzani, 2008). However, we found no variation in the aldosterone levels between the 3 strains and we would expect such a difference to explain a variation in blood pressure and diuresis (Fig. 10C). This support the fact that aldosterone is not the main cause of the variation of BP among the strains.

Up to 320 genes have been identified in this GC-A locus but the majority have not been characterised yet (Fig. 11B). Among theses genes, the myocyte enhancer factor 2D (MEF2D), the kidney predominant protein NCU-G1 and the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3 (HCN3) are others genes that might play a role or influence the phenotype that we have observed. MEF2D is a transcription factor which form heterodimer with MEF2A and are expressed in the adult heart. Mice lacking MEF2D have impaired response to stress signal that lead to cardiac hypertrophy, fibrosis and fetal gene activation and overexpression in the heart induces cardiomyopathy (Kim Y, 2008).

Upregulation of this gene or different haplotype leading to interference with the signalisation pathways might increase cardiac hypertrophy and have an impact on blood pressure. In human, NCU-G1 is widely expressed at the mRNA levels and particularly in kidney (Steffensen KR, 2007). According to the amino acid sequence analysis, NCU-G1 has been characterised as a transcription factor and a nuclear receptor co-activator (Steffensen KR, 2007). Once again, gene expression might affect the function of this protein and modulate blood pressure. HCN3 mRNA is expressed in mouse brain and heart ventricle but is not the main isoform in the heart (Mistrík P, 2005 and Zhou YF, 2007). Others HCN isoforms are modulated by cAMP (Stieber J, 2005). HCN3 has a unique response to cGMP and cAMP as they inhibited the HCN3 current (Mistrík P, 2005). Research papers available on HCN3 are still limited. However, if genetic differences are present between the congenics substrains and the DSS parental strains, this gene could influence the blood pressure, diuresis or kidney damage.

In sums, it appears that a dysfunction downstream to GC-A remains is attributable to the phenotype that we observed regarding the blood pressure, diuresis and kidney physiopathology.

Specific roles for the locus containing the NO receptor and fgg

Interestingly, we report higher body weight and lower total cholesterol, HDL and LDL levels in C2SM9 and C2SM12 than DSS. However, all the rats had hypercholesterolemia according to rat reference values (Boehm, 2007). Also, the creatinine clearance, an indicator of glomerular function was higher in C2SM9 and C2SM12.

Recently, three quantitative trait loci (QTL) for total cholesterol were reported on the chromosome 2 from Dahl rats (Herrera 2004, Herrera 2007). Using, the corresponding reference markers we found that any of them were included in the segment from the congenic strains. However, the QTL TC-5 was relatively close to the segment with no overlapping and we might therefore expect that the phenotype observed in this study result from a gene-gene interaction.

Among the 86 genes includes in the shared segment, candidate gene that could modify the phenotype observed were: soluble guanylate cyclase $\alpha 1$ (Gucy1b3) and $\beta 1$ (Gucy1a3), fibrinogen gene (fgg, fga and fgb) and the dear dual endothelin1, angiotensin II receptor (Fig. 11A)

Nitric oxide system implication in the pathogenesis of DSS rats is often discussed on high salt diet but evidences are showing that its impact is secondary (Deng, 1998). NO and his molecular pathways seems to play a role in the salt management. Dahl S has an insufficient production of NO and could not eliminate sodium as well than the Dahl R on high salt diet (Deng, 1998).

We showed that all the rats in this study had hypercholesterolemia, even if the DSS had the highest levels. Hypercholesterolemia is a risk factor for cardiovascular disease and it was reported that endothelial dysfunction acts on the vascular wall and contribute to atherosclerosis (Laber U, 2001). Moreover, it was suggested that in hypercholesterolemia induces an inhibition of the sGC and this prevent the vasoprotective effects of NO on the vascular wall, including smooth muscle cell proliferation, apoptosis and antioxidative effect.

The mechanism include a compensatory increase of sGC expression in aortic rings (Laber U, 2001). Thus, the vasodilation NO-dependant might be affecting and could contribute to increase the blood pressure in Dahl and congenics substrains. We did not observe any variation at the mRNA levels in the renal cortex for sGC subunits ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$) among the three strains (data not shown), but regulation might be possible at others levels (protein, activity). Also, it was shown that the positive effect on cardiovascular disease is at least in part through the stimulation of NO production (Chikni G, 2004). Hypertension and hypercholesterolemia are two factors that can together contribute to glomerulosclerosis (Tolins JP, 1992). Our results are showing that the glomerular function is decrease in the DSS rats and this is coherent with our results that are also showing higher cholesterol levels for this strain. Moreover, the reference value for proteinuria in normal Wistar rat is between 4 and 6 g/dl (Boehm, 2007). Even if we found no difference in proteinuria among the strains, all the rats had hyperproteinuria.

Interestingly, a proteomic study have demonstrated that hypercholesterolemic patients had increase FGG chain isoform 1, reduced FGB chains (isoform 1 and 3) compared to patient with normal cholesterol levels and their expression is also modified by simvastatin, a cholesterol-lowering medication (Alonso-Orgaz S., 2006). Importance of fibrinogen in cardiovascular diseases could be linked to the high fibrinogen plasma level that is associated with thrombogenesis and inflammation (Alonso-Orgaz S., 2006). It was reported that FGB chains limits the rate of production of mature fibrinogen (Alonso-Orgaz S., 2006).

A receptor that can binds endothelin-1 (ET-1) and angiotensin II (ANG II) was recently reported (Kanedo Y, 2004). Interestingly, S44P/M74T variants was reported in the dual ET-1/ANG II receptor (Dear) from Dahl salt resistant origin compared to the DSS strains and that variant cannot bind ANG II (Kanedo Y, 2004). In rats, SHR, WKY and BN rats have the DSS allele but the information is lacking for MNS. We showed that C2SM9 did not have the variant as Dahl salt resistant but had the same variant than DSS even if C2SM9 harbours the gene from MNS origin. However, this gene cannot explain phenotype between the congenic strains and DSS.

Acknowledgements

We thank Suzanne Cossette for her technical assistance, Dr Louis Gaboury for pathology analysis and Andrée Lesvesque for her secretarial skills.

Grants

This work was supported by grants XXX from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to Johanne Tremblay. Valérie Fillion-Forté was supported by a Masters' fellowship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Disclosures

None

References

Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. *Mol Cell Biochem.* 2002 Jan;230(1-2):31-47. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases.

Moro C, Klimcakova E, Lohmède K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, Bouloumié A, Galitzky J, Arner P, Langin D. *Diabetologia.* 2007 May;50(5):1038-47 Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue.

Sarzani R, Salvi F, Dessì-Fulgheri P, Rappelli A. *J Hypertens.* 2008 May;26(5):831-43. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans.

Tremblay J, Hum DH, Sanchez R, Dumas P, Pravenec M, Krenova D, Kren V, Kunes J, Pausova Z, Gossard F, Hamet P. *Hypertension.* 2003 Jan;41(1):16-24. TA repeat variation, Npr1 expression, and blood pressure: impact of the Ace locus.

Deng AY. *Kidney Int.* 1998 Jun;53(6):1501-11. Is the nitric oxide system involved in genetic hypertension in Dahl rats?

Scherrer U, Sartori C. *Eur J Endocrinol.* 2000 Apr;142(4):315-23. Defective nitric oxide synthesis: a link between metabolic insulin resistance, sympathetic overactivity and cardiovascular morbidity.

Azam M, Gupta G, Chen W, Wellington S, Warburton D, Danziger RS. *Hypertension.* 1998 Jul;32(1):149-54. Genetic mapping of soluble guanylyl cyclase genes: implications for linkage to blood pressure in the Dahl rat.

Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, Bertina RM. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4176-83. Epub 2005 Sep 6. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels.

Cheung EY, Bos MJ, Leebeek FW, Koudstaal PJ, Hofman A, de Maat MP, Breteler MM. *Thromb Haemost*. 2008 Aug;100(2):308-13 Variation in fibrinogen FGG and FGA genes and risk of stroke: the Rotterdam Study.

Dutil J, Eliopoulos V, Tremblay J, Hamet P, Charron S, Deng AY. *Hypertension*. 2005 Apr;45(4):557-64. Epub 2005 Feb 28. Multiple quantitative trait loci for blood pressure interacting epistatically and additively on Dahl rat chromosome 2.

Rollín R, Mediero A, Fernández-Cruz A, Fernández-Durango R. *Mol Vis*. 2005 Mar 18;11:216-24. Downregulation of the atrial natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor-C system in the early stages of diabetic retinopathy in the rat.

Biederman J, Yee J, Cortes P. *Kidney Int*. 2004 Dec;66(6):2308-14. Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis.

Lin KF, Chao J, Chao L. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2):219-24. Atrial natriuretic peptide gene delivery reduces stroke-induced mortality rate in Dahl salt-sensitive rats.

Wambach G, Stimpel M, Bönner G. *Klin Wochenschr*. 1989 Nov 3;67(21):1069-76. Review. German. [Atrial natriuretic peptide and its significance for arterial hypertension]

Hum D, Besnard S, Sanchez R, Devost D, Gossard F, Hamet P, Tremblay J. *Hypertension*. 2004 Jun;43(6):1270-8. Epub 2004 Apr 19. Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter.

Roman RJ, Kaldunski M. *Am J Physiol.* 1991 Sep;261(3 Pt 2):R595-602. Pressure natriuresis and cortical and papillary blood flow in inbred Dahl rats.

Bayorh MA, Ogbolu EC, Williams E, Thierry-Palmer M, Sanford G, Emmett N, Harris-Hooker S, Socci RR, Chu TC, Chenault VM. *Physiol Behav.* 1998 Dec 1;65(3):563-8. Possible mechanisms of salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats.

Kim Y, Phan D, van Rooij E, Wang DZ, McAnally J, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. *J Clin Invest.* 2008 Jan;118(1):124-32. The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice.

Steffensen KR, Bouzga M, Skjeldal F, Kasi C, Karahasan A, Matre V, Bakke O, Guérin S, Eskild W. *BMC Mol Biol.* 2007 Nov 16;8:106. Human NCU-G1 can function as a transcription factor and as a nuclear receptor co-activator.

Mistrík P, Mader R, Michalakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22;280(29):27056-61. Epub 2005 May 27. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides.

Zhou YF, Yang XJ, Li HX. *Med Hypotheses.* 2007;69(3):541-4. Epub 2007 Mar 23. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel gene: the most possible therapeutic applications in the field of cardiac biological pacemakers.

Stieber J, Stöckl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. *J Biol Chem.* 2005 Oct 14;280(41):34635-43. Epub 2005 Jul 25. Functional expression of the human HCN3 channel.

Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K. *Biol Chem*. 2007 May;388(5):547-54. Erratum in: *Biol Chem*. 2007 Nov;388(11):1255-6. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice.

Herrera VL, Ponce LR, Ruiz-Opazo N. *J Hypertens*. 2007 Aug;25(8):1608-12. Genome-wide scan for interacting loci affecting human cholesteryl ester transfer protein-induced hypercholesterolemia in transgenic human cholesteryl ester transfer protein F2-intercross rats.

Herrera VL, Didishvili T, Lopez LV, Myers RH, Ruiz-Opazo N. *Circ Res*. 2004 Mar 5;94(4):446-52. Epub 2004 Jan 22. Genome-wide scan identifies novel QTLs for cholesterol and LDL levels in F2[Dahl RxS]-intercross rats.

Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammel A, Meyer W, Mayer B, Weber M, Kojda G. *Circulation*. 2002 Feb 19;105(7):855-60. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase.

Chikani G, Zhu W, Smart EJ. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Sep;287(3):E386-9. Lipids: potential regulators of nitric oxide generation.

Tolins JP, Stone BG, Raj L. *Kidney Int*. 1992 May;41(5):1254-61. Interactions of hypercholesterolemia and hypertension in initiation of glomerular injury.

Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D, Pérez-Vizcaíno F, Segura A, Tamargo J, López-Farré A. *J Proteome Res*. 2006 Sep;5(9):2301-8. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients.

Kaneko Y, Herrera VL, Didishvili T, Ruiz-Opazo N. *Physiol Genomics*. 2005 Jan 20;20(2):157-64. Epub 2004 Nov 23. Sex-specific effects of dual ET-1/ANG II receptor (Dear) variants in Dahl salt-sensitive/resistant hypertension rat model.

Wimalawansa SJ. *Expert Opin Pharmacother.* 2008 Aug;9(11):1935-54. Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications.

Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, Branco LG, Albuquerque-Araujo WI, de Nucci G, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 5;96(1):278-83. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP.

Sybertz EJ, Chiu PJ, Vemulapalli S, Watkins R, Haslanger MF. *Hypertension.* 1990 Feb;15(2):152-61. Atrial natriuretic factor-potentiating and antihypertensive activity of SCH34826. An orally active neutral metalloendopeptidase inhibitor.

Nishikimi T, Iemura-Inaba C, Akimoto K, Ishikawa K, Koshikawa S, Matsuoka H. *Regul Pept.* 2008 Nov 8;147(1-2):103-11. Stimulatory and inhibitory regulation of lipolysis by the NPR-A/cGMP/PKG and NPR-C/G(i) pathways in rat cultured adipocytes.

Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 1;69(2):318-28. The role of natriuretic peptides in cardioprotection.

Figures and Tables Legend

Tables

Table 1. Mutation in the GCA gene from normotensive (MNS) and hypertensive (DSS) origin and consequences at the protein level. Location is relative to the transcription start site. The rat sequence (accession number J06577, NCBI) was used as reference. MNS – Milan normotensive strain; DSS-Dahl hypertensive rat. C2SM9 have GCA from MNS origin but SM12 have GCA from DSS origin.

Figures

Figure 1. Chromosome 2 segment substitution in congenic strains. Candidate genes from normotensive and hypertensive origin are indicated respectively by a pink or a blue box for each congenic strains. Size of the segment (in megabase) is indicated at the right for each strains.

Figure 2. Mean arterial blood pressure at 18 weeks in congenics substrains and DSS strains. Data were collected each 2 minutes for 6 hours during the day and 6 hours during the night period. Values on the graph represents the mean of the average of the daily reading for each group. & $P \leq 0.05$ for the C2SM9 or C2SM12 group compared with the DSS group; \$ $P \leq 0.05$ for the C2SM9 group compared with the C2SM12 group.

Figure 3. Renal Damage score determined by a blinded and external histopathological study. Glomeruli, tubules, pelvis and fornix, vessels and interstitial space were examined (A) for a total of twenty one parameters and a total score renal damage score was determined (B). An higher score is indicative of more severe kidney

damage. Representative pictures of kidneys damage are shown (C). Cast: hyaline cast; Fib: tubulo-interstitial fibrosis Glom: glomeruli; RT: tubular regeneration. & $P \leq 0.05$ for the C2SM9 group compared with the DSS group.

Figure 4. GC-A and GC-A/NprC ratio mRNA levels in kidney cortex (A) and retroperitoneal fat (B). Data were normalised with endogenous control B-actin. & $P \leq 0.05$ for the C2SM9 or C2SM12 group compared with the DSS group; \$ $P \leq 0.05$ for the C2SM9 group compared with the C2SM12 group.

Figure 5. Pre-pro-ANP mRNA levels in atria (A) and ventricles (B). Error bars represents SEM. The number of rat is indicated under each bar.

Figure 6. ANP response after water-load on diuresis (A) and natriuresis (B). Comparison between each strains and between with the baseline are indicated. Error bars represents SEM. The number of rat is indicated under each bar. & $P \leq 0.05$ for the C2SM9 or C2SM12 group compared with the DSS group; \$ $P \leq 0.05$ for the C2SM9 group compared with the C2SM12 group; * $P \leq 0.05$ for the ANP stimulation compared with the baseline group.

Figure 7. Guanylyl cyclase stimulation by ANP in isolated glomeruli. Comparison between each strains and the fold increase is indicated. Error bars represents SEM. The number of rat is indicated under each bar.

Figure 8. Lipid profile in DSS and congenics substrains. Total cholesterol (A), HDL (B) and LDL (C) were measured in the serum. Error bars represents SEM. The number of rat is indicated under each bar. & $P \leq 0.05$ for the C2SM9 group compared with the DSS group.

Figure 9. Classical biochemistry measure for kidney function evaluation. Creatinine clearance (A) was measured as an index of glomerular function, proteinuria (B) was determined after 24 hours metabolic cages and seric aldosterone was measured (C). Error

bars represents SEM. The number of rat is indicated under each bar. & $P \leq 0.05$ for the C2SM9 or C2SM12 group compared with the DSS group

Figure 10. Fat/Lean ratio (A) determined by EchoMRI and Body weight (B) before sacrifice. Error bars represents SEM. The number of rat is indicated under each bar. & $P \leq 0.05$ for the C2SM9 or C2SM12 group compared with the DSS group.

Figure 11. Venn diagram of the gene from normotensive (A) and hypertensive (B) origin included the chromosomal segment of the congenic strains. AdipoQ/Progestin R: Adiponectine/Progestin receptor (similar); **ApoA1_BP:** ApoA1 binding protein; **arhgef2:** Rho/Rac guanine exchange factor; **arhgef11:** Rho guanine exchange factor; **Calcium BP:** Calcium binding protein; **Dual Et-1/ANG II receptor (Dear):** Dual Endotheline-1/Angiotensin II receptor (Dear); **fga** fibrinogene polypeptide alpha; **fgb** fibrinogene polypeptide bêta; **fgg:** fibrinogene polypeptide gamma; **GCA:** guanylyl cyclase type A receptor; **HCN3:** hyperpolarization activated cyclic nucleotid gated potassium channel 3; **IL-6R α :** Interleukine-6 alpha receptor; **Insr:** insuline related receptor; **KCNN3:** potassium intermediate/small conductance calcium activated channel 3; **MEF2B:** myocyte specific enhancer factor 2B (similar); **MEF2D:** myocyte specific enhancer factor 2D; **NCU-G1:** kidney predominant protein NCU-G1; **Pdzk1:** PDZ domain containing 1; **pmvk:** phosphomevanolate kinase; **prcc:** papillary renal cell carcinoma; **tnfaip8I2:** TNF alpha induced protein 8; **scnm1:** sodium channel modifier 1 (predited); **sGC α 1:** soluble guanylate cyclase alpha 1 subunit; **sGC β 1:** soluble guanylate cyclase bêta 1 subunit.

Table 1

Location	Domain or region	Origin	Description of the mutation	Consequence at the protein level
Between -963 and -944	promotor	MNS	insertion of 13 TA repeat	none
Between -280 and -278	promotor	MNS, DSS	insertion of CC	none
1927 (exon VIII)	kinase-like domain	MNS	T1927C	silent mutation
2434 (exon XIII)	kinase-like domain	DSS	A2434G	silent mutation
2749 (exon XV)	kinase-like domain	DSS	T2749C	silent mutation
3922	5'-UTR	DSS	G2749A	none

Figure 1

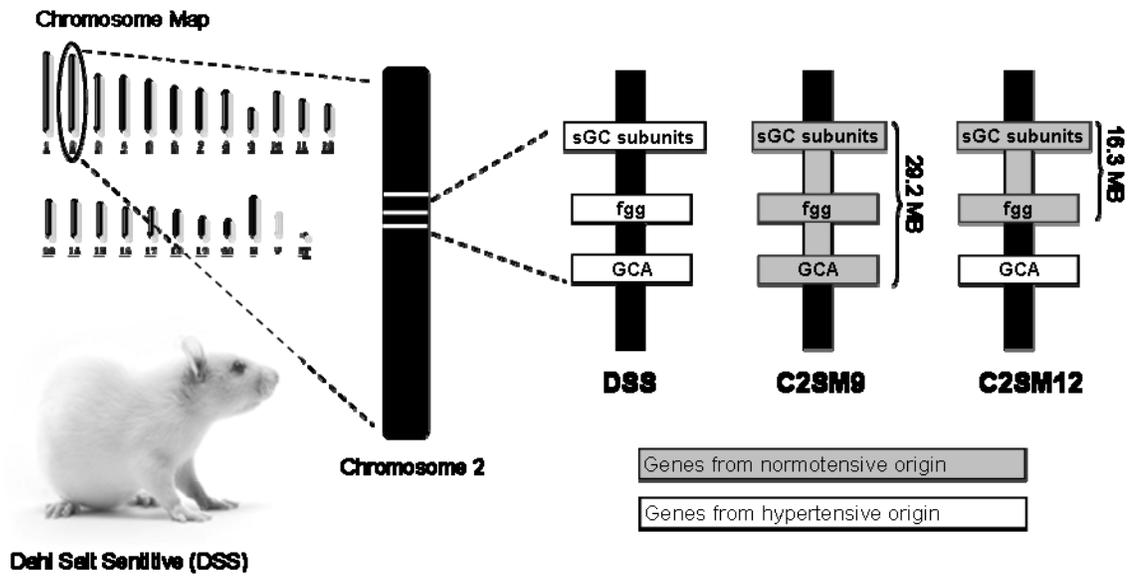


Figure 2

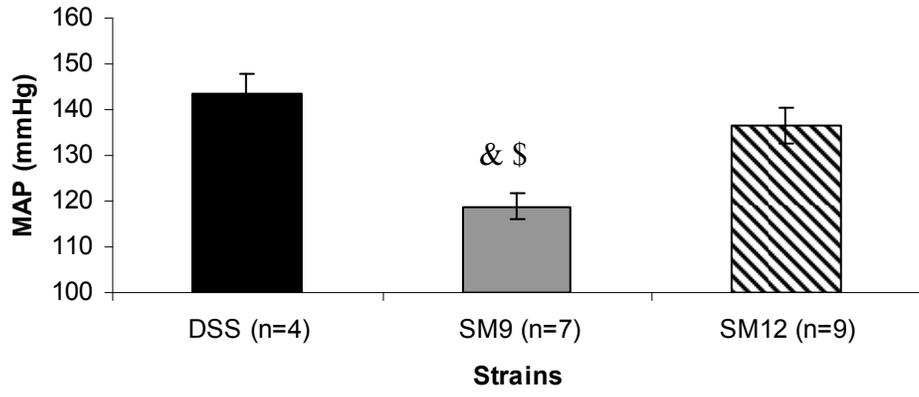


Figure 3

A.

Parameters of kidney damage	Strains		
	DSS	C2SM9	C2SM12
Glomeruli Score	2,0 ± 0,48	1,5 ± 0,82	0,4 ± 0,24
Tubules Score	7,6 ± 0,75	3,0 ± 0,32	6,2 ± 0,80
Pelvis and fornix Score	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Vessels Score	0,64 ± 0,14	1,0 ± 0,45	0,7 ± 0,20
Interstitial space Score	1,2 ± 0,10	0,8 ± 0,37	1,7 ± 0,20

B.

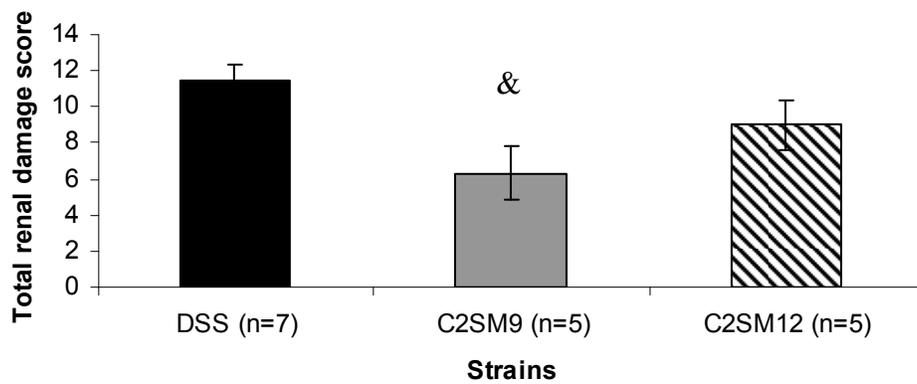


Figure 3 (suite)

C.

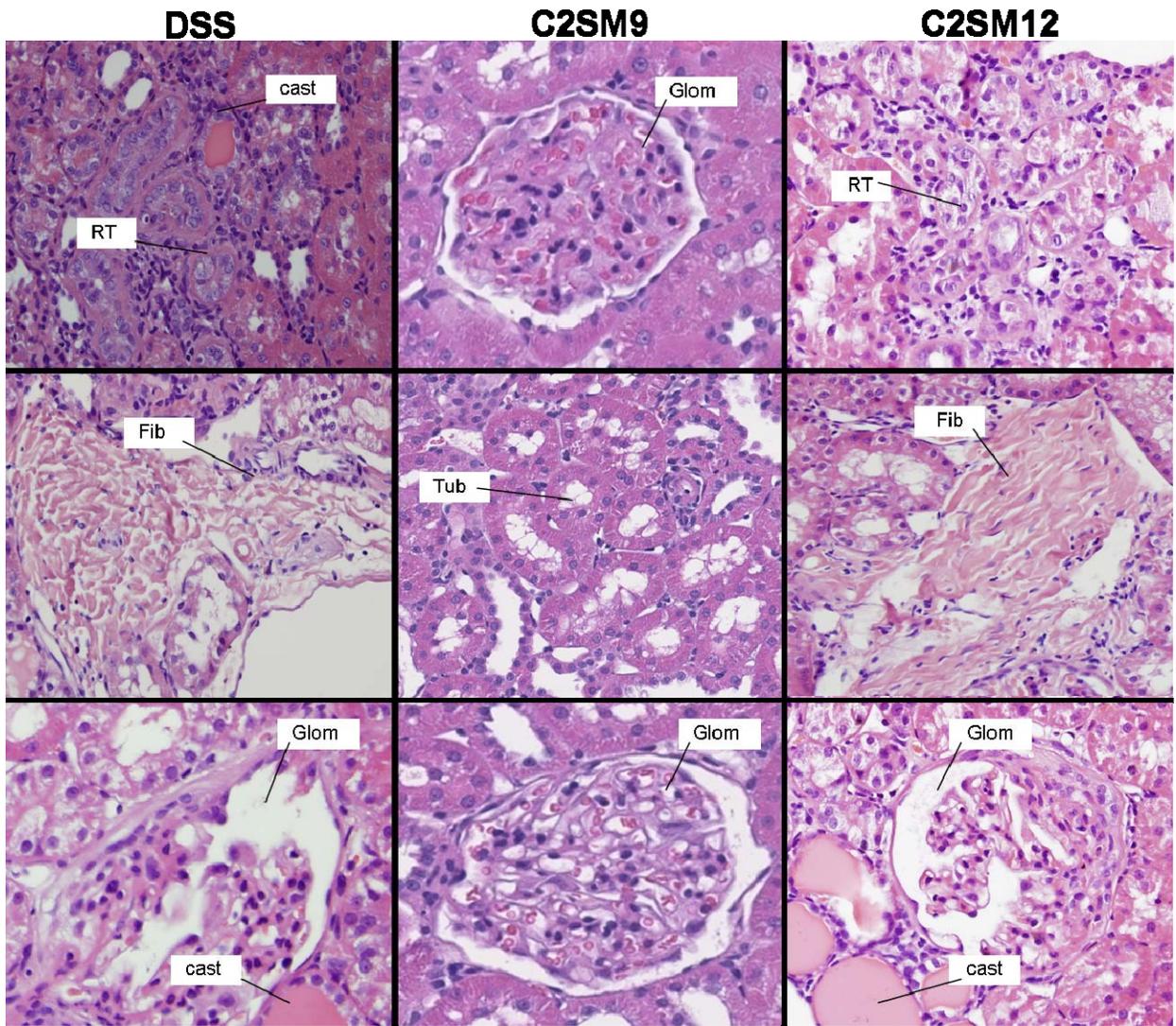


Figure 4

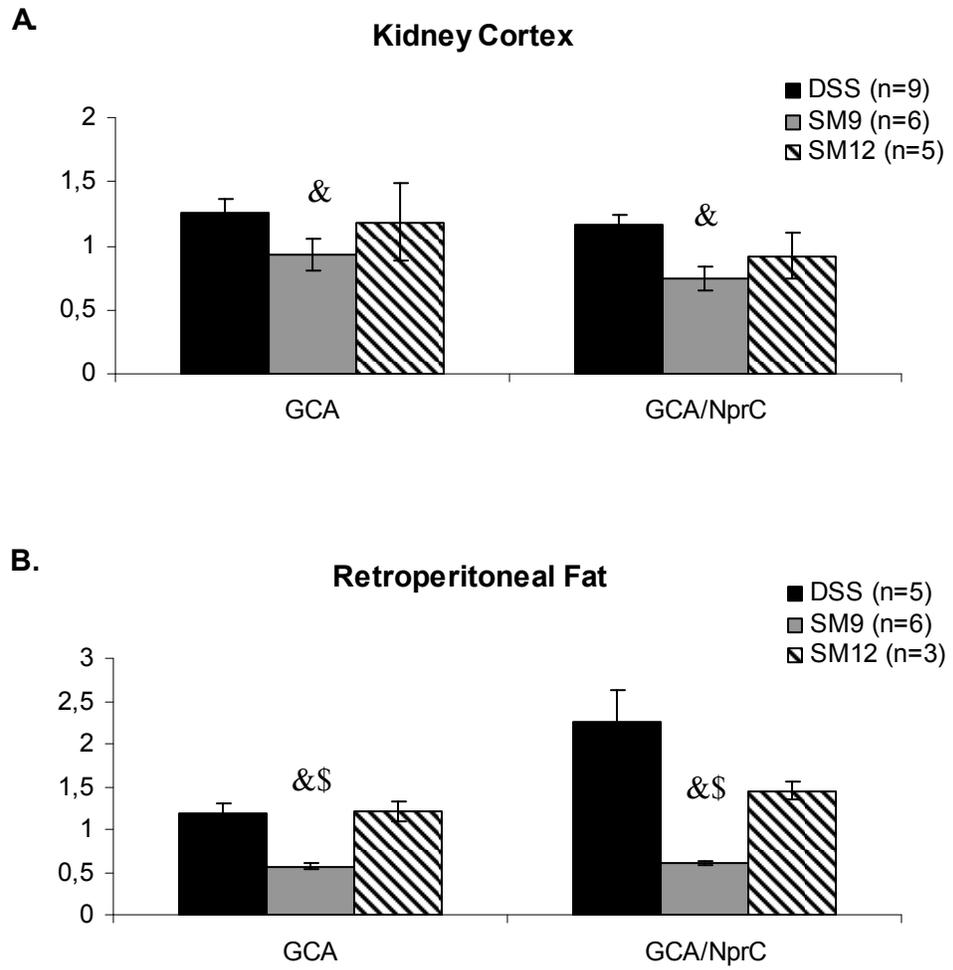


Figure 5

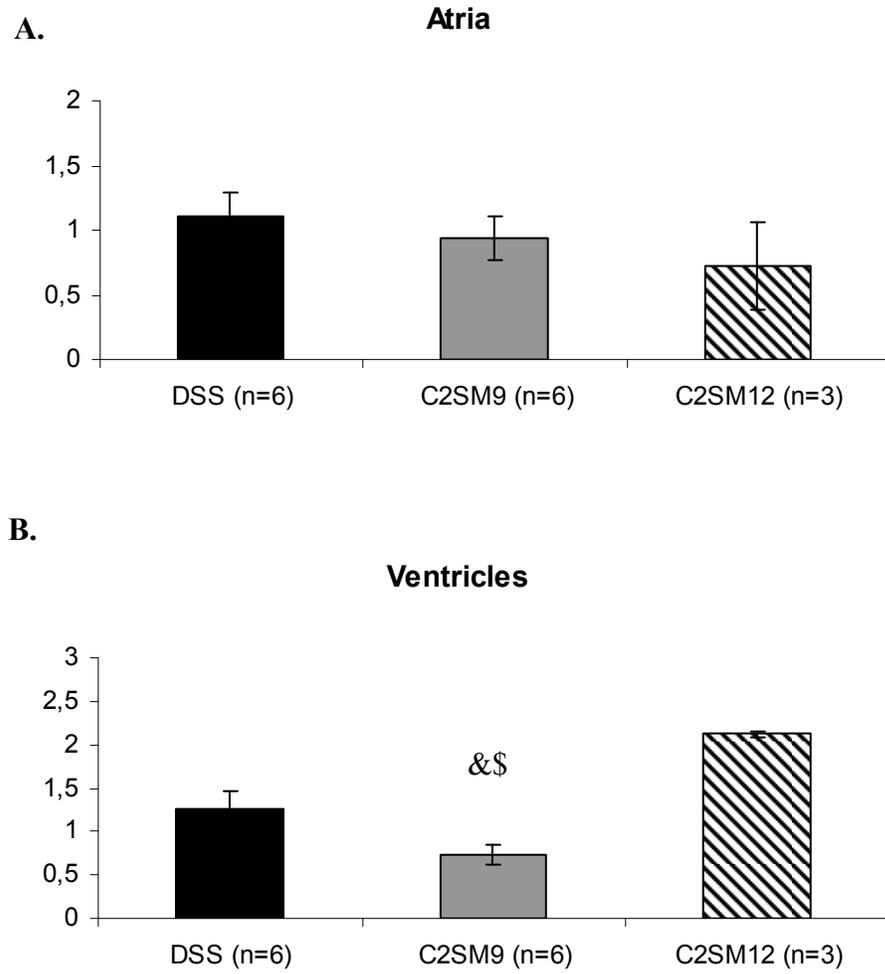


Figure 6

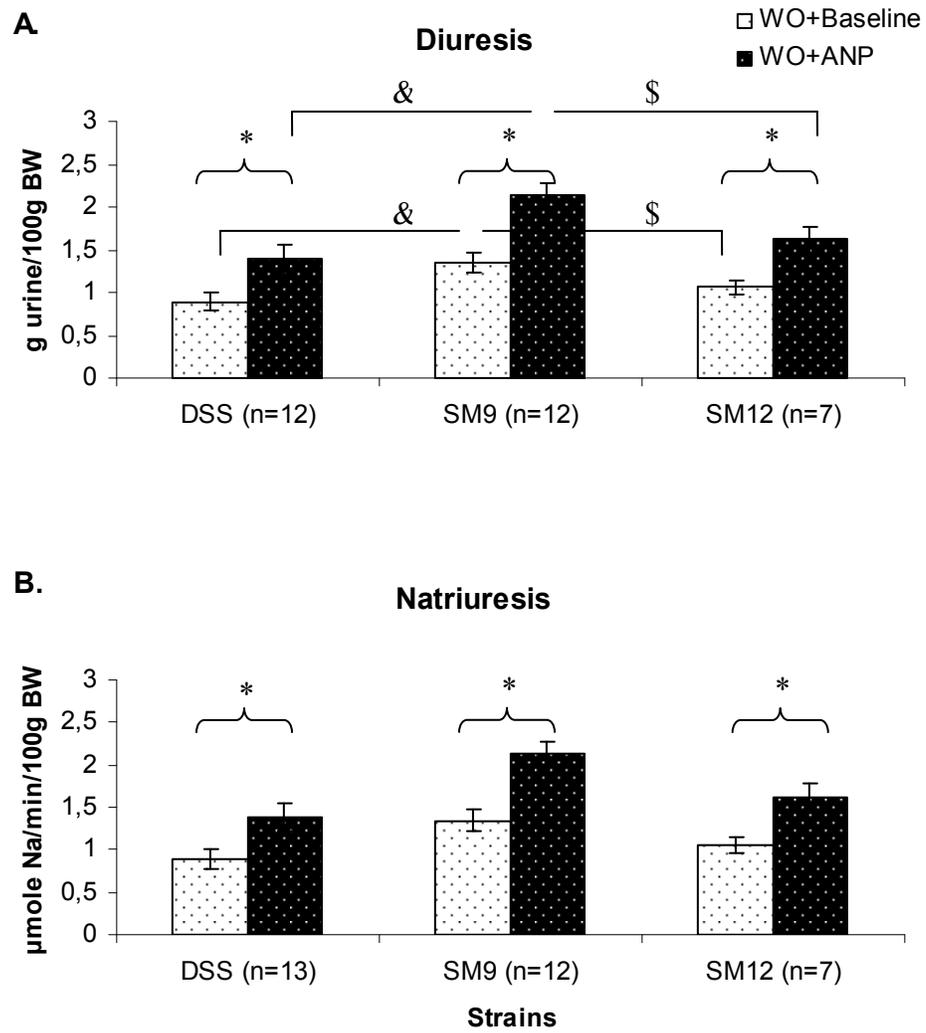


Figure 7

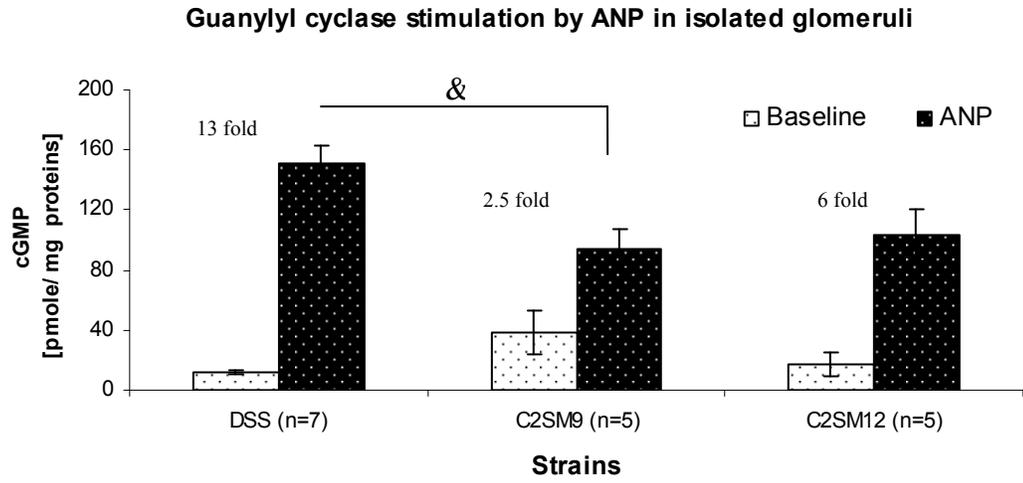


Figure 8

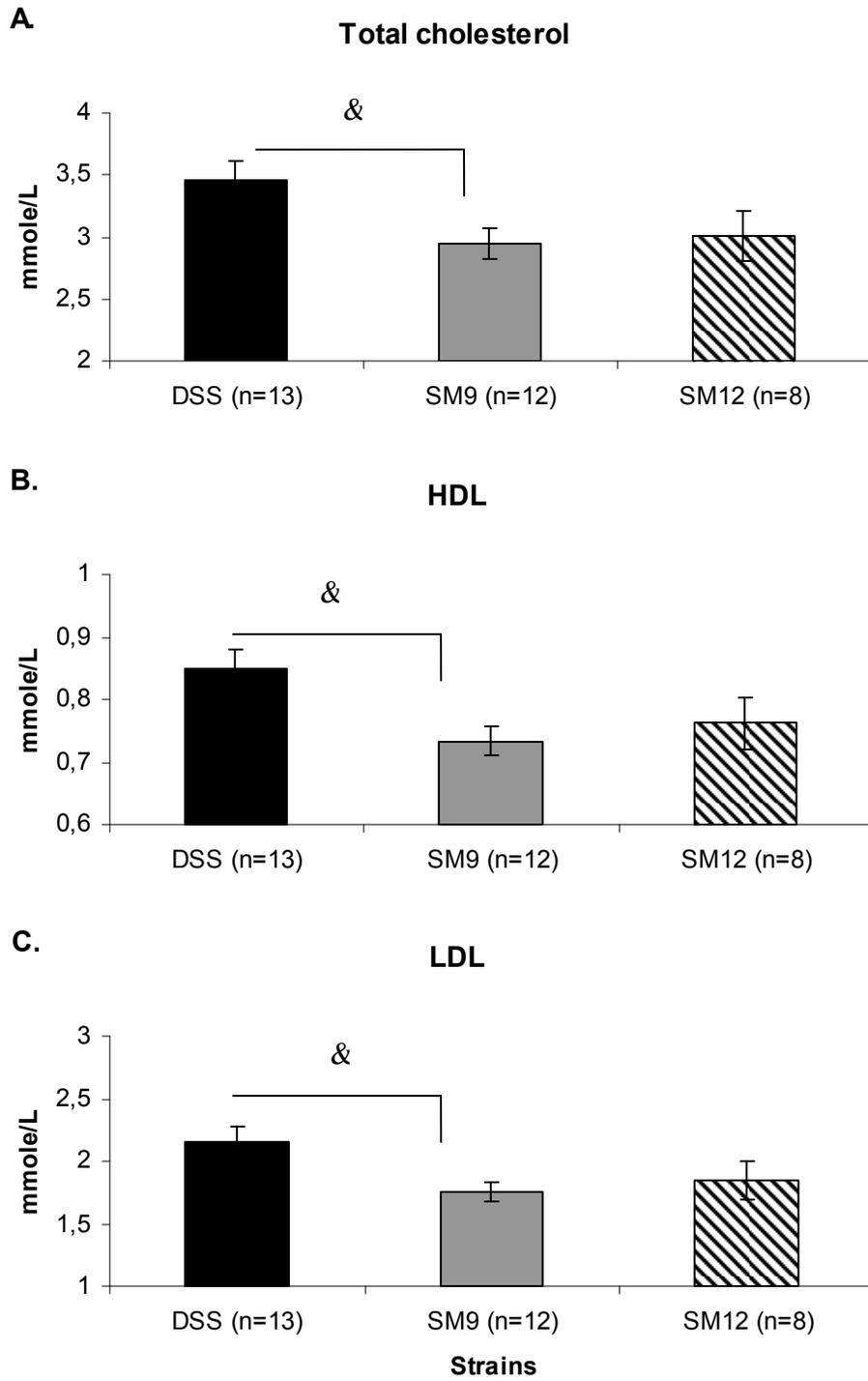
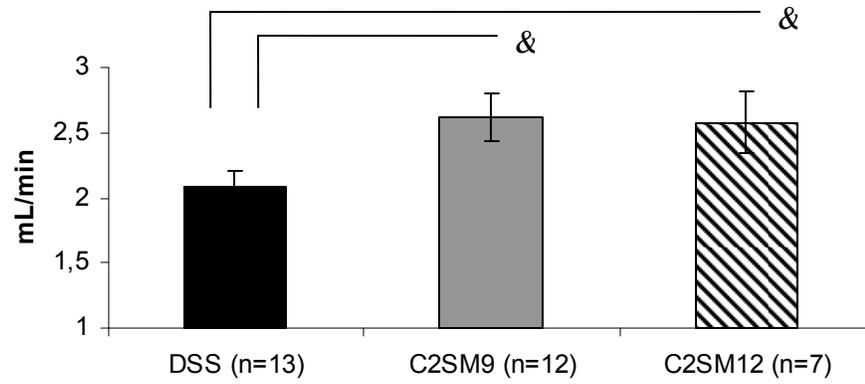
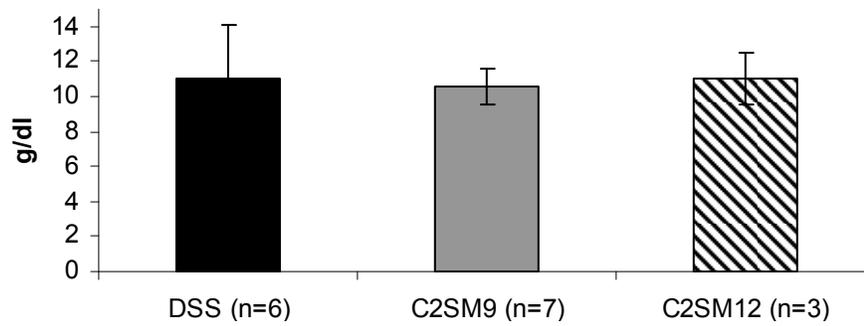


Figure 9

A.



B.



C.

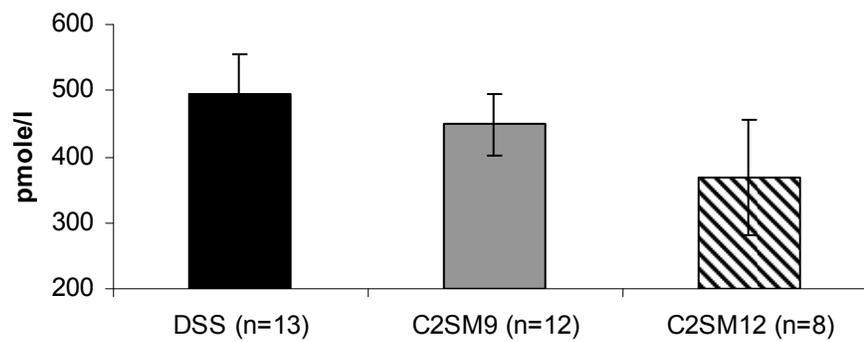


Figure 10

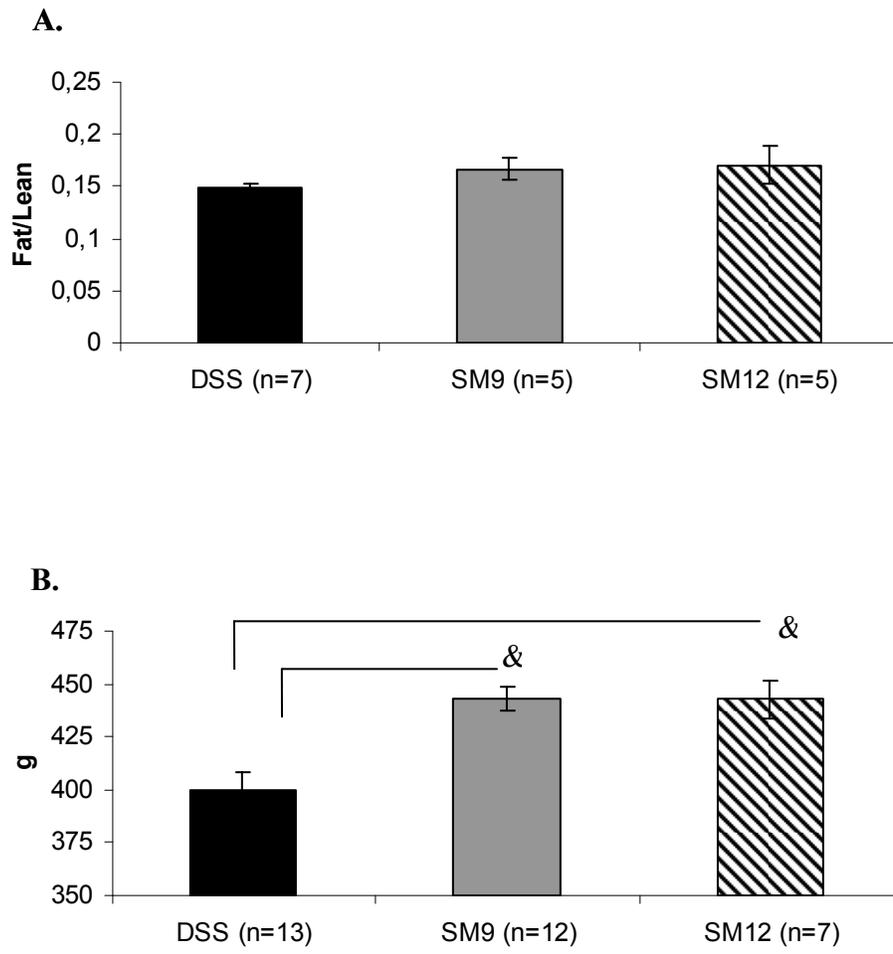


Figure 11

