

Université de Montréal

Localisation d'un locus pour trait quantitatif pour l'hypertension
sur les chromosomes 16 et 17 du rat *Dahl Salt-Sensitive*

par

Myriam Moujahidine

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

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

août 2003

© Myriam Moujahidine, 2003



QH

506

U54

2004

V. 010



AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Localisation d'un locus pour trait quantitatif pour l'hypertension
sur les chromosomes 16 et 17 du rat *Dahl Salt-Sensitive*

Présenté par :
Myriam Moujahidine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean Vacher
Président-rapporteur

Dr. Alan Y. Deng
Directeur de recherches

Dr. Tim Reudelhuber
Membre du jury

Je dédie ce mémoire à mon père et ma mère,
merci de me transmettre cette curiosité
scientifique et soif d'apprentissage.

Une pensée spéciale pour Tarek qui m'a
soutenu tout au long de cette étape de ma vie.

Un gros merci!

À toute cette jeune équipe du laboratoire plutôt féminine! Julie D mon mentor, Julie R, Annie, Zsuzsa, Brigitte, Ana, Kalyani, Raphaëlle, Anita, et Anh-Suong. Alors, comment vont les rats?

À mon directeur de recherche, Alan Y. Deng. Un merci tout spécial pour ce support d'une personne incroyablement brillante. Ce fut une intense expérience scientifique. Merci de m'avoir donné la chance de voyager et assister à des congrès nationaux et internationaux à travers le monde.

À ma famille et mes amis les plus chers. Mes parents et leur support et encouragements inconditionnels, Jacques, Mélanie et Caroline, Christina, Anne-Martine, Coquine et un merci tout spécial à Étienne pour son inlassable motivation scientifique et critique de mes écrits.

Sans vous, je n'y serais pas arrivée!

Résumé Français

L'hypertension artérielle affecte un grand pourcentage de la population humaine. La pression artérielle (PA) chez les animaux est influencée à la fois par des facteurs environnementaux et génétiques. L'étude de gènes impliqués dans cette pathologie souvent héréditaire (essentielle) est limitée chez l'humain par la nécessité du maintien vigoureux des diverses composantes influençant la PA. L'hypertension est définie en génétique comme étant un trait quantitatif et multifactoriel sous contrôle polygénique. Il est maintenant possible d'utiliser une stratégie de modèles animaux congéniques de rats visant à exploiter la recherche de loci pour traits quantitatifs (QTL) pour la PA.

Des études de liaison génétique pour la PA effectuées sur une population de rats *Dahl Salt-Sensitive* a précédemment permis l'identification d'une région sur le chromosome (chr.) 16 et sur le chr. 17 associée à la PA. Dans le cadre de cette étude, des lignées congéniques nommées C16S.L1, C16.S.L2, C16S.L3 et C16S.L4 (chr.16) et C17S.LA, C17S.LB, C17S.LC et C17S.LD (chr.17) ont permis d'associer une région chromosomique (du chr. 16 et 17) à des changements de PA. Des analyses moléculaires comprenant notamment le séquençage d'un gène candidat et l'analyse d'expression génique différentielles par micro-puces à ADN ont été entreprises pour les QTL localisés.

Mots clefs

Hypertension essentielle, pression artérielle, pression sanguine, rat congénique, liaison (génétique), modèle animal, génétique moléculaire, chromosome 16, chromosome 17

Résumé Anglais

(Abstract)

Hypertension affect a high pourcentage of human population. In animals, blood pressure (BP) is influenced by both environmental and genetical factors. The study of genes implied in this pathology wich can be hereditary (essential), is limited in humans by the necessity of keeping vigourous BP influencing components. In genetic, hypertension is defined as a quantitative and multifactorial trait under polygenic control. It is now possible to use an animal congenic model of rat, constructed to exploit the searching of BP quantitative trait loci (QTL).

BP linkage studies done on *Dahl Salt-Sensitive* rats have permitted the association of a chromosomal region of Chromomose (Chr.) 16 and Chr.17 with BP. In this project, congenic strains named C16S.L1, C16.S.L2, C16S.L3 and C16S.L4 (for Chr.16), C17S.LA, C17S.LB, C17S.LC and C17S.LD (for Chr.17) have permitted the association of a particular Chr. region (for Chr.16 and Chr.17) with a BP change. Molecular analysis including sequencing of a candidate gene and differential espression profiling with DNA chip technology also started for the localised QTL.

Mots clefs

(Key words)

Essential hypertension, arterial pressure, blood pressure, congenic rat, linkage (genetic), animal model, molecular genetic, Chromosome 16, Chromosome 17

TABLE DES MATIÈRES

	Page
DÉDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ FRANÇAIS ET MOTS CLEFS	iii
RÉSUMÉ ANGLAIS ET MOTS CLEFS	iv
TABLES DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xi

Partie I – Introduction et recension de littérature

Objectif et stratégie	2
CHAPITRE 1 – Génétique de l’hypertension	4
1.1 Introduction à l’hypertension	4
1.2 Multifactorialité de l’hypertension	5
1.3 Hypertension essentielle	6
1.4 Notions de locus pour trait quantitatif (QTL)	7
CHAPITRE 2 - Un modèle animal de l’hypertension : le rat	8
2.1 Introduction au modèle animal	8
2.2 Utilisation du rat comme modèle de l’hypertension	9
2.3 Délimitation génétique	12
2.3 Analyse de populations par liaison génétique	14
2.5 Souches de rats congéniques	18
2.6 Analyses physiologiques	23
2.7 Analyses statistiques	26

CHAPITRE 3 – Recherche et analyse moléculaire de gènes candidats	28
3.1 Recherche de gènes candidats	28
3.2 Analyse moléculaire des gènes candidats	30

Partie II – Publication scientifique et résultats additionnels

CHAPITRE 4 – Publication scientifique	34
CHAPITRE 5 – Résultats expérimentaux additionnels	50
Volet A : Résultats pour l'étude du chromosome 16	50
A.5.1 Construction de congéniques et études de PA	50
A.5.2 Études d'homologie	54
A.5.3 Gènes candidats des micro-puces à ADN	54
A.5.4 Séquençage du gène candidat Arf4	56
Volet B : Résultats pour l'étude du chromosome 17	57
B.5.1 Construction des congéniques et études de PA	57
B.5.2 Gènes candidats des micro-puces à ADN	61

Partie III – Discussion, critiques et perspectives

CHAPITRE 6 – Un modèle animal de l'hypertension : le rat	63
6.1 Choix des souches de rat pour l'étude de l'hypertension.	63
6.2 Délimitation génétique	64
6.3 Analyse de populations par liaison génétique	64
6.4 Souches de rats congéniques	64
6.5 Analyses physiologiques	65
6.6 Approche statistique	70
Volet A : Localisation de QTL du chromosome 16	71
Volet B : Localisation de QTL du chromosome 17	79

CHAPITRE 7 - Recherche et analyse moléculaire de gènes candidats	87
7.1 Recherche de gènes candidats	87
7.2 Analyse des gènes candidats	88
Volet A : Analyses moléculaires du chromosome 16	92
Volet B : Analyses moléculaires du chromosome 17	96
CHAPITRE 8 - Stratégie générale pour identifier un QTL pour la PA :	99
Considérations pratiques	
8.1 Population ciblée	99
8.2 Arrière plan génomique	101
8.3 Évènements génétiques non contrôlés	102
8.4 Multifactorialité de l'hypertension	103
8.5 Comparaison et reproductibilité des QTL	104
Conclusion	106
Références	107

LISTE DES FIGURES

	Page
CHAPITRE 1	
Figure 1. Schéma représentant la complexité de l'étude des facteurs influençant la pression artérielle (PA)	4
CHAPITRE 2	
Figure 2. Schéma hypothétique de la construction de populations ségrégantes F2 pour analyses de liaison génétique	15
Figure 2a. Modèle d'exemple d'un graphique de LOD	17
Figure 3. Schéma explicatif de la construction d'une lignée congénique (a) dans le contexte du ciblage d'un QTL pour la PA (b)	20
CHAPITRE 4 – Publication scientifique	
Figure 1. QTL mapping.	45
Figure 2. Comparisons in BP components between LEW, S.L1, S.L2 and the S strains.	46
Figure 3. Comparisons of cardiac, renal and aortic parameters between the LEW, congenic and S strains.	46
CHAPITRE 5	
Figure 4. Cartographie physique du QTL du chromosome 16	51
Figure 5. Comparaisons des composantes de la pression artérielle (PA) entre les souches congéniques du chromosome 16.	53
Figure 6. Cartographie comparative du chromosome 16 du rat, pour la souris et l'humain	55
Figure 7. Cartographie du QTL du chromosome 17	58
Figure 8. Comparaisons des composantes de la pression artérielle (PA) entre les souches congéniques du chromosome 17	60
CHAPITRE 6	
Figure 9. Implant de télémétrie et cathéter de Data Sciences Inc.	67
Figure 10. Schéma explicatif de l'implantation d'une sonde de télémétrie de Data Sciences International	68

Figure 11. Mesure de la longueur d'une aorte de rat à l'aide d'une règle graduée	68
Figure 12. Carte génétique du chromosome 16 et localisation du QTL pour la PA provenant de deux études indépendantes de liaison génétique	73
Figure 13. Diagramme démontrant la stratégie de substitution pour la cartographie du QTL pour la PA du chromosome 16 avec l'utilisation des souches congéniques	74
Figure 14. Construction de combinaisons de souches congéniques du chromosome 10 et 16	77
Figure 15. Carte génétique du chromosome 17 et localisation du QTL pour la PA provenant de trois études indépendantes de liaison génétique	80
Figure 16. Diagramme démontrant la stratégie de substitution pour la cartographie du QTL pour la PA pour le chromosome 17 avec l'utilisation des souches congéniques.	82

CHAPITRE 7

Figure 17. Cartographie physique du chromosome 16 par BAC et YAC pour les souches congéniques C16S.L2, C16S.L3 et C16S.L4	92
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE 8

Figure 18. Diagramme présentant les QTL pour la PA communs ou reproductibles identifiés dans différentes expériences indépendantes.	105
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTE DES TABLEAUX

	Page
CHAPITRE 2	
Tableau I. Quelques souches de rat développées pour l'étude de l'hypertension	10
Tableau II. Loci pour trait quantitatifs (QTL) chez le rat <i>Dahl salt-sensitive</i> (S) révélés par la souche contrastantes <i>Lewis</i> (LEW)	12
CHAPITRE 4 – Publication scientifique	
Table 1. Chromosome markers used to make congenic strains.	43
CHAPITRE 6	
Tableau III. Tableau de deux des trois principales méthodes de prises de la PA chez le rat ainsi que leurs avantages et leurs désavantages d'utilisation	66
Tableau IV. Nouveaux marqueurs domestiques construits à partir de supercontigs du chromosome 16 du rat	71
Tableau V. Nouveaux marqueurs domestiques construits à partir de supercontigs du chromosome 17 du rat	79
CHAPITRE 7	
Tableau VI. Profil de l'expression génique différentielle par micro-puces à ADN entre la souche S et la souches LEW pour le chromosome 17	97

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AL	Longueur aortique (<i>aortic length</i>)
ARF4	Facteur 4 de ribosylation de l'ADP
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide riboxynucléique messenger
AW	Poids aortique (<i>aortic weight</i>)
BAC	Chromosome artificiel de bactérie (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
BC	Croisement retour
BN	Brown Norway
BRCA1	Gène de prédisposition au cancer du sein 1
BW	Poids du corps (<i>body weight</i>)
chr	chromosome
CHUM	Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
cM	centi-Morgan
cR	centi-Rad
CRFG	Gène de l'insuffisance rénale chronique (<i>Chronic Renal Failure Gene</i>)
DAP	Pression artérielle diastolique (<i>diastolic arterial pressure</i>)
EST	Étiquette de séquence exprimée (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
GTP	Guanosine triphosphate
HW	Poids du cœur (<i>heart weight</i>)
kDa	Kilodalton
KW	Poids du rein (<i>kidney weight</i>)
kpb	kilo paire de bases
LEW	Rat <i>Lewis</i>
LKW	Poids du rein gauche (<i>left kidney weight</i>)
LVW	Poids du ventricule gauche (<i>left ventricle weight</i>)

MAP	Pression artérielle moyenne (<i>mean arterial pressure</i>)
Mb	Mega paires de bases (6×10^6 pb)
mmHg	Millimètres de mercure
MNS	<i>Milan Normotensive</i>
Na ⁺	Ion sodique
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	Centre national pour l'information en biotechnologie (National Center for Biotechnology Information)
NEDD4	Précurseur neuronal exprimé dans les cellules "rétro-régulées" lors du développement
PA	Pression artérielle
PAC	Clones de Phages P1
Parg	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase
pb	Paires de bases
PCR	Amplification en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ppif	Peptidylpropyl isomérase F
QTL	Locus ou loci pour trait quantitatif (<i>Quantitative Trait Locus or Loci</i>)
R	Rat <i>Dahl salt-resistant</i>
RH	Hybride de radiation (<i>Radiation Hybrid</i>)
RKW	Poids du rein droit (<i>Right Kidney Weight</i>)
RVW	Poids du ventricule droit (<i>Right Ventricle Weight</i>)
S	Rat Dahl salt-sensitive
SAP	Pression artérielle systolique (<i>Systolic Arterial Pressure</i>)
SBH	Rat <i>Sabra hypertensive</i>
SBN	Rat <i>Sabra normotensive</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SHRP	<i>Spontaneously hypertensive rat stroke-prone</i>
SNPs	Polymorphisme simple de nucléotides (<i>Single polymorphism nucleotides</i>)
WKY	Rat <i>Wistar-Kyoto</i>
YAC	Chromosome artificiel de levure

PARTIE I

**INTRODUCTION ET
RECENSION DE LITTÉRATURE**

Objectif et stratégie

Objectif général du projet de maîtrise

Identification de loci pour traits quantitatifs (QTL) pour l'hypertension sur le chromosome 16 et le chromosome 17 du rat *Dahl Salt-Sensitive*.

Les études pour le chromosome 16 et le chromosome 17 du rat Dahl sont séparées et indépendantes. Le nom assigné aux souches et sous-lignées congéniques a été adapté afin de les dissocier clairement.

Stratégie générale pour identifier un QTL

Deux préalables sont nécessaires afin d'initier l'analyse génétique d'un trait quantitatif (1). Tout d'abord, il faut avoir à sa disposition deux souches contrastantes, donc opposées du phénotype étudié. Ensuite, il faut disposer une méthode adéquate de délimitation génétique pour isoler la région chromosomique contenant le gène impliqué dans le phénotype voulu.

Étant donné que les rats d'une souche donnée ont une différence de PA marquée par rapport à celle qui l'oppose, il est évident qu'il y existe une base génétique pour ces différences qui sont transmises de générations en générations. Partant de ce concept, une méthode génétique a été développée pour définir et expliquer ces différences génétiques.

- 1) Localiser le QTL pour la PA en régions chromosomiques grâce à la méthode d'analyse de **liaison génétique** utilisant l'approche par gène candidat ou la délimitation génomique totale (**chapitre 2 – section 2.3**).
- 2) Établir plus finement les régions chromosomiques contenant le QTL pour la PA en créant les **souches congéniques** (**chapitre 2 – section 2.4**).
- 3) Raffiner la localisation du QTL à une distance de 1-2 cM grâce à l'établissement de **sous-lignées congéniques** (**chapitre 2 – section 2.4**).
- 4) Éventuellement, identifier les candidats potentiels pour le QTL pour la PA par clonage positionnel (**chapitre 3 – section 1**).
- 5) Procéder aux études moléculaires d'analyses des gènes candidats pour prouver que ces gènes interviennent dans le contrôle de la PA. (**chapitre 3 – section 2**)

CHAPITRE 1

Génétique de l'hypertension

1.1 Introduction à l'hypertension

L'hypertension se définit en général comme une pression sanguine de plus de 140 mmHg systolique ou 90 mmHg diastolique. Cette classification demeure toutefois tronquée et arbitraire puisque l'hypertension, généralement essentielle, démontre une distribution continue et augmente avec l'âge (2). L'hypertension essentielle se décrit comme une haute pression sanguine sans cause apparente et possède une composante génétique importante (3;4). Ce trait affecte 15% à 30% de la population humaine (5) et approximativement 50 millions d'américains (6). Une haute pression sanguine prédispose aux crises cardiaques, maladies coronariennes, maladies vasculaires périphériques et insuffisance rénale (7). Jusqu'à 30 à 50% de la variation de la pression sanguine est complexe, multifactorielle et polygénique i.e. causée par plusieurs gènes (4). Ainsi, la pression sanguine varie en fonction de l'influence de l'environnement, des gènes ainsi que l'interaction continue entre ces deux paramètres

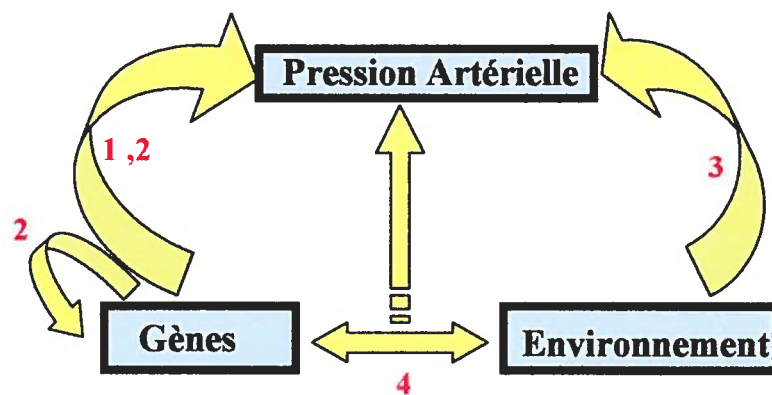


Figure 1. Schéma représentant la complexité de l'étude des facteurs influençant la pression artérielle (PA). Les flèches (jaunes) représentent les influences possibles des différentes composantes sur la PA (indiquées en bleu). Le trajet 1 représente l'influence directe des gènes sur la PA. Le trajet 2 représente l'influence de gènes sur d'autres gènes qui font varier la PA. Le trajet 3 représente l'influence de l'environnement sur la PA. Finalement, le trajet 4 représente l'interaction continue entre les gènes et l'environnement sur la PA.

1.2. Multifactorialité de l'hypertension

Une longue liste de facteurs environnementaux semble avoir une incidence particulière sur la PA : le sexe, l'âge, le tabagisme, l'obésité, la consommation d'alcool, le niveau d'activité physique, une historique de diabète, dysfonction rénale ou de microalbuminurie, les antécédents cardiovasculaires, d'hyperinsulinémie ou d'hyperglycémie, le niveau de lipides et de lipoprotéines sanguines, le niveau sanguin de fibrinogène, l'hormonothérapie, le statut socio-économique, l'ethnie et le lieu de résidence géographique. Plus particulièrement, la diète et le stress ont été reconnus pour avoir un impact significatif sur la PA (8). L'effet de l'environnement peut être spécifique à un temps particulier ou à l'accumulation d'expériences environnementales durant la vie d'un individu (9). L'environnement peut également influencer ce phénotype par la stimulation de l'expression des gènes ou via l'interaction avec des produits de gènes (10). Dans la pathogenèse de traits complexes comme la pression sanguine, les facteurs environnementaux ne sont pas simplement additifs aux facteurs génétiques (8;11). En effet, l'effet d'une variation allélique d'un gène dépend souvent de l'environnement dans lequel le gène est exprimé.

À un niveau plus moléculaire, les principaux systèmes physiologiques qui altèrent la PA sont bien connus. Beaucoup d'agents pharmacologiques ont été développés pour réduire ou augmenter la PA autour de ces systèmes physiologiques. Beaucoup d'expériences chez des souris transgéniques permettent de supprimer ou ajouter un gène spécifique qui influence la PA (12-16). Ces expériences d'analyses d'absence ou ajout d'un gène dans un environnement de systèmes intacts sont très informatives à un niveau physiologique mais ne donnent toutefois aucune information quant aux loci qui contiennent naturellement des allèles suffisamment présentes en haute fréquence dans les populations (17). Il faut donc, tout en tenant compte de cette importante composante environnementale, pousser les études vers les composantes génétiques de la PA.

1.3 Hypertension essentielle

La composante génétique, donc héréditaire de la pression sanguine a été déterminée par les études des familles, jumeaux et enfants adoptés comme l'indique la revue de Ward (18) et autres études: (19-21). La recherche de gènes responsables des désordres héréditaires est basée sur la prémisse fondamentale que les gènes sont défectueux i.e. qu'ils expriment des mutations ou codent pour des protéines non fonctionnelles. Cette composante génétique est polygénique.

En plus de l'hypertension essentielle, il existe plusieurs exemples de maladies polygéniques. L'athérosclérose, certaines formes de diabète ainsi que plusieurs maladies mentales comme la schizophrénie sont causées par plusieurs loci génétiques (22). Contrairement aux maladies polygéniques, une maladie monogénique, par exemple, la dystrophie musculaire de Duchenne est causée par une mutation génétique ponctuelle .

Bien qu'une haute PA se présente comme un trait polygénique dans la population, la plupart des avancements ont été effectués au niveau des formes monogéniques de l'hypertension. Plusieurs syndromes augmentant ou diminuant la pression sanguine ont été identifiés (23-27) notamment le syndrome connu de Liddle (28). Ces syndromes sont reconnus chez l'humain et causés par de rares mutants ainsi qu'associés avec de larges effets quantitatifs sur la PA. Ils en résultent en une perturbation physiologique drastique et assez pénétrante pour être observée comme traits mendéliens ségrégant dans les familles humaines. La plupart de ces gènes impliquent un transport rénal de molécules électrolytes ou une des voies métaboliques des stéroïdes adrénaux contrôlant la balance d'électrolyte du corps (24;29). L'hypothèse a été émise que les gènes impliqués dans la pathogenèse de ces syndromes monogéniques peuvent aussi contribuer au développement de l'hypertension essentielle, fondamentalement polygénique (10).

1.4 Notions de locus pour trait quantitatif (QTL)

La composante génétique d'un trait quantitatif (soit la PA) est due à l'effet cumulatif sur le phénotype de plusieurs loci génétiques (donc polygénique). Chacun de ces loci ségrégue en accord avec les lois de Mendel. Ce trait quantitatif démontre une variation continue des basses aux hautes valeurs, sur une échelle. Cette variation naturelle est retrouvée dans toutes les populations d'eucaryotes (17). Il existe un grand nombre de traits quantitatifs, notamment l'intelligence, le poids corporel, les résistances aux maladies des plantes et animaux ou encore la quantité de graisses des viandes (17).

Le terme locus ou loci pour trait quantitatif (QTL) est utilisé pour décrire une région chromosomique donnée qui peut contenir un ou plusieurs gènes contrôlant le trait quantitatif. Dans cette étude, QTL réfère à la fois à la forme singulière et plurielle de locus (soit loci). Finalement, QTL réfère aussi au locus génétique spécifique participant dans le contrôle du trait quantitatif.

Puisque plusieurs gènes sont impliqués dans la détermination de la pression sanguine, une déféctuosité dans n'importe lequel de ces gènes peut être la cause de la haute pression. De plus, différentes personnes souffrant d'hypertension peuvent avoir une déféctuosité dans différents gènes. Il faut donc développer une analyse génétique permettant de faire une dissection de ces différents gènes, tout en jumelant sa caractéristique quantitative. Bien que ce projet porte sur l'aspect génétique de l'hypertension, il faut toutefois insister sur le fait que des études génétiques peuvent mettre en contraste les gènes causant l'hypertension, elles peuvent ne pas démontrer comment l'hypertension est amenée physiologiquement (1). C'est principalement la combinaison d'approches génétiques et physiologiques qui permet réellement d'élucider les gènes régissant l'hypertension ainsi que ses mécanismes (1).

CHAPITRE 2

Un modèle animal de l'hypertension : le rat

2.1 Introduction au modèle animal

Quand le phénotype approprié est disponible, les modèles animaux constituent un modèle plus opportuniste pour l'avancement des découvertes fondamentales sur la génétique des traits humains complexes. En effet, un modèle animal permettra, par exemple, des croisements contrôlés dans une population donnée. Tous les organismes ne peuvent pas être optés car en plus d'avoir un phénotype approprié, il faut pouvoir développer un grand nombre de marqueurs génétiques pour pouvoir faire la dissection de ces traits en ses composantes génétiques individuelles.

La souris est le modèle animal normalement utilisé en recherche grâce à sa similarité avec l'humain. Elle est largement utilisée pour la compréhension des fonctions des gènes grâce à sa large infrastructure génétique et génomique. Il existe plusieurs études d'hypertensions répertoriées grâce au modèle de la souris (30). Toutefois, la souris ne possède pas nécessairement un phénotype suffisamment contrastant pour l'étude de l'hypertension. En effet, les mesures de PA sont souvent diffuses chez cet organisme (31). La souris accuse un retard par rapport à d'autres espèces du point de vue caractérisation physiologique et ne corrèle pas avec certaines caractéristiques cliniques humaines comme l'hypertension. Tout d'abord, la petite taille de la souris limite les mesures de PA à une méthodologie non invasive (voir discussion section 6.5 sur analyses physiologiques) rendant la détermination du phénotype difficile (31a, 31b). Ensuite, les modèles de souris possèdent un grand nombre d'allèles pour la PA au départ et les mesures de PA semblent démontrer que la souris possède une grande adaptation concernant la régulation de la PA qui rend son étude complexe (17).

2.2. Utilisation du rat comme modèle de l'hypertension

Présentement, le rat devient l'animal clef pour la recherche biomédicale. Depuis 1996, plus de 500 000 manuscrits utilisant le rat ont été publiés [*PubMed, National Center for Biotechnology Information* (NCBI), recherche utilisant « rat » comme mot clef (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PbMed/medline.html>)]. Un grand nombre désordres génétiques ont été repérés chez plus de 200 souches consanguines de rat (32). En plus de l'hypertension, ces modèles génétiques ont intensément servit des études de comportement, auto-immunité, cancer, maladies dentaires, diabète, désordres des yeux, désordres hématologiques, neurobiologie, désordres métaboliques, insuffisance rénale, reproduction, désordres squelettiques et toxicologie (33).

Le rat, génétiquement complètement homogène, engendre une progéniture nombreuse et autorise un contrôle très restreint des influences environnementales (34;35). De plus, ce modèle est habile à produire de larges recombinaisons génétiques permettant la dissection de phénotypes et interactions complexes. Finalement, la région codante du génome du rat partage une similarité de près de 90% avec le génome humain (36). Une fraction potentiellement élevée de gènes liés à un désordre chez le rat ont la chance d'être conservés dans les régions humaines. Ainsi, même si un QTL n'a pas été identifié au niveau moléculaire, l'information contenue dans la région chromosomique du QTL pour la PA peut servir à identifier des gènes candidats lorsque cette région présente une conservation synthétique chez l'humain (37-40).

Un grand nombre de souches de rats ont été développées pour l'étude de l'hypertension. Le **Tableau I** présente une portion de ces souches par ordre chronologique de recensement. Parmi celles-ci, certaines souches consanguines de rat ont été obtenues par croisements sélectifs pour l'hypertension et sont prénommées souches hypertendues. La plupart de ces souches détiennent une souche normotendue

(dont la PA est normale) contrastante. Les souches normotendues sont celles sélectionnées pour une PA basse ou normales développées pour la plupart du temps à partir de la souche originale.

Tableau I. Quelques souches de rat développées pour l'étude de l'hypertension

Souche hypertendue/normotendue	Abréviation	Référence
Lewis	LEW	Lewis 1954-1958 *
<i>Genetically hypertensive</i>	GH	Smirk et al. 1958 (41)
<i>Dahl salt-sensitive</i>	S, DS, SS/Jr	Dahl et al. 1962 (42)
<i>Dahl salt-resistant</i>	R, DR, R/Jr	
<i>Spontaneous hypertensive rats</i>	SHR	Okamoto et al. 1963 (43)
<i>DOCA salt-sensitive (Sabra hypertensive)</i>	SBH	Ben-Ishay et al 1972 (44)
<i>DOCA salt-resistant (Sabra normotensive)</i>	SBN	
<i>Lyon hypertensive</i>	LH	Dupont et al. 1973 (45)
<i>Lyon normotensive</i>	LN	
<i>Lyon low blood pressure</i>	LL	
<i>Spontaneous hypertensive rats-stroke prone</i>	SHRSP	Okamoto et al. 1974 (46)
<i>Milan hypertensive</i>	MHS	Bianchi et al 1974 (47)
<i>Milan normotensive</i>	MNS	
<i>Fawn-hooded hypertensive</i>	FHH	Kuijpers et al 1984 (48)
<i>Fawn-hooded low blood pressure</i>	FHL	
<i>Inherited stress induced arterial hypertension</i>	ISIAH	Markel 1985 (49)
<i>Prague hypertensive</i>	PHR	Heller et al 1993 (50)
<i>Prague normotensive</i>	PNR	
<i>Wistar Kyoto</i>	WKY	Kyoto

Tableau I - Note. * référence pour Lewis : <http://www.informatics.jax.org/external/festing/rat/docs/LEW.shtml> . Éléments du tableau adaptés de Rapp JP (17).

Rat Dahl. La souche *Dahl salt-sensitive* (S) et la souche *Dahl salt-resistant* (R) furent les premières souches contrastantes utilisées pour l'étude de l'hypertension, par Dahl et associés en 1962 (42). Le rat S est un modèle sensible au sel. Il développe l'hypertension soumis à une diète pauvre en sel (51) mais est particulièrement exacerbé lorsque placé sur diète riche en NaCl (42;52). Le processus de sélection a

permet d'enrichir les allèles de ce rat pour une PA élevée. Le rat R est une souche de type normotendue résistante à une diète riche en sel. La souche R servait alors naturellement de contrôle pour la souche S.

Toutefois, aujourd'hui, la souche S versus R est moins analysée. Les souches S et R possèdent d'innombrables différences génétiques entre elles. La plupart du temps, ces différences n'ont rien avoir avec la PA. Celles-ci semblent avoir été fixées dans chacun des allèles contrastants durant le processus de sélection. De plus, les souches S et R affichent des différences dans les caractéristiques physiologiques et biochimiques associées à la PA. Ces caractéristiques ne présentent généralement pas d'effets directs des gènes et ont parfois aboutit à de nombreuses recherches infructueuses, comme par exemple, l'étude des gènes candidats du système oxyde nitrique du rein (53). Ainsi, une fausse croyance dans l'utilisation des souches normotendues est que la différence de PA entre les souches, même consanguines, n'est pas nécessairement toujours génétique. Néanmoins, durant les quelques décennies précédentes de recherches, quatre chromosomes ont démontré des QTL capables que causer une différence de PA entre le rat S et R (1), la progression a toutefois été grandement arrêtée par le manque de polymorphisme entre les souches. Le polymorphisme a été évalué à environ 29% (54) ou 18% (55) selon l'étude.

Rat Lewis (LEW). La souche LEW résiste à l'hypertension induite par le sel (52;56). Cette souche a été étudiée pour bon nombre de pathologies différentes. Concernant le contrôle de la PA, cette souche présente l'avantage de posséder une masse cardiaque relativement faible chez des mâles de 10 semaines (<http://www.informatics.jax.org/external/festing/rat/docs/LEW.shtml>). Parmi les souches pouvant contraster S, la souche du rat LEW a mené à l'identification d'un plus grand nombre de QTL et gènes candidats chez le rat S que le rat R a pu révéler (**Tableau II**).

Tableau II. Loci pour trait quantitatifs (QTL) chez le rat *Dahl salt-sensitive* (S) révélés par la souche contrastante *Lewis* (LEW).

Chromosome	Gène Candidat	Référence
1	S _A Gènes pour les enzymes de CYP450	Garer et al. (57) Harris et al. (58) Gu et al. (59)
3	-	Palijan et al. (60)
5	<i>Endothelin-2</i>	Deng et al. (61)
8	-	Garrett et al. (57)
10	<i>ACE</i>	Deng et al. (62)
16	-	Moujahidine et al.(63)
17	-	Deng et al (61)
18	-	Garrett et al (57)

Tableau II - p.12 - Note. Adapté de Deng AY (1). Le tiret est utilisé lorsque aucun candidat particulier n'a été proposé et un candidat non exclu s'il a été proposé. S_A, gène anonyme; CYP450, cytochrome P450; *ACE*, enzyme de conversion de l'angiotensine. La référence du chromosome 16 est la publication scientifique (voir chapitre 4).

2.3 Délimitation génétique

Le succès de ces études génétiques dépend de la densité de marqueurs disponibles. Un effort collectif des scientifiques a permis l'élaboration de cartes suffisamment denses du rat (55;64-69).

Marqueurs microsatellites. Pour rechercher un QTL, il faut pouvoir effectuer un suivi du génotype des rats entre autre possible grâce à des marqueurs d'ADN basés sur la variation du nombre de courtes répétitions en tandem. Ces marqueurs sont couramment appelés marqueurs d'ADN microsatellites. L'ADN microsatellite est une classe d'ADN répétitif comportant des répétitions de mono-, di-, tri- ou tétranucléotides. Les marqueurs microsatellites sont nombreux et dispersés partout dans l'ADN non codant des eucaryotes et ont l'avantage de posséder plusieurs allèles permettant la cartographie. L'ADN microsatellite est amplifié à l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) puis ensuite analysé en fonction de son poids

(longueurs de nucléotides respectifs) (70). Les ressources génomiques étant plus développées chez la souris que chez le rat au départ, des marqueurs microsatellites de souris étaient conséquemment utilisés chez le rat. Environ 20% des marqueurs de souris sont applicables chez le rat et approximativement 4% des marqueurs de la souris sont polymorphiques chez le rat (71;72).

Cartographie par recombinaison génétique. La cartographie par recombinaison génétique est possible grâce au suivi des différents génotypes avec les marqueurs microsatellites. Les distances sur la carte génétique peuvent être établies en fonction de la fréquence de recombinaison entre deux marqueurs. Le pourcentage (fréquence) de recombinaison est défini en unités de recombinaison, soit en centimorgan (cM). Initialement, la cartographie était obtenue à partir des marqueurs de gènes connus séquencés (73). Subséquemment, de nombreux panneaux de marqueurs ont été développés à partir de bibliothèques de courtes insertions génomiques de tous les chromosomes du rat dont les panneaux et cartes sont disponibles sur maintes bases de données Internet (www.genome.wi.mit.edu; www.well.ox.ac.uk/pub/genetics/ratmap et www.informatics.jax.org/rat/)

Panneaux d'hybrides somatiques de radiation (RH). La cartographie des marqueurs est également possible grâce aux bibliothèques de panneaux d'hybrides somatiques de radiation (RH) de rat (<http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER/>) et peut être très étendue (74). Les cellules somatiques de rat et de hamster sont mises en culture puis fusionnées ensemble et les cellules de hamster peuvent retenir des fragments de chromosomes du rat. Le plus près deux loci se trouvent sur un chromosome de rat, le plus de chance ils ont d'être retenus dans la même lignée cellulaire de RH. Les distances sont évaluées en centirad (cR) et les lignées cellulaires de RH de rat retiennent une moyenne de 25% du génome du rat avec une grandeur de fragment de 3.8 Mb (75).

Intégration des cartes. Ainsi, l'infrastructure génétique requise pour connecter le phénotype et le génotype chez le rat demeure incomplète et parsemée.

Conséquemment, plusieurs cartes génomiques ont été intégrées en une carte dense de liaison génétique et de RH (75). La juxtaposition de ces deux cartographies a également permis l'estimation de la taille totale de la carte génétique du rat à environ 1 500-2 000 cM (65;75;76) .

2.4 Analyse de populations par liaison génétique

John Rapp a été le pionnier de l'analyse de liaison génétique comme étape initiale pour localiser un QTL pour la PA chez le rat *Dahl salt-sensitive* (77;78). La stratégie de départ s'appuie sur l'hérédité des fameux marqueurs microsatellites qui se comportent comme des traits mendéliens simples, et ainsi, ségréguent également avec la PA.

Principe de la liaison génétique. Une souche hypertendue et normotendue sont croisées pour produire une première génération filiale F1 (**Figure 2**). Cette génération est ensuite croisée ensemble (F1 x F1) afin de produire une population ségrégente de génération filiale F2. Un marqueur (M1) d'un locus d'un allèle de la population filiale F2 qui n'est pas génétiquement lié à un QTL ségréguera indépendamment d'un QTL et il n'y aura aucune association significative entre le génotype du marqueur et la PA. Inversement, si ce marqueur est génétiquement lié à un QTL (M2), il ne ségréguera pas indépendamment dudit QTL et il y aura une association significative entre le génotype du marqueur et la PA. L'effet quantitatif d'un QTL associé à un marqueur diminue (à cause des recombinaisons génétiques) à mesure que la distance entre le QTL et les marqueurs augmente. Il est à noter, qu'une population pouvant fournir une information valide requiert que les allèles contrastants d'un QTL pour la PA puissent ségréguer l'un de l'autre dans les gamètes lors de la méiose. De plus, les recombinaisons obtenues diffèrent d'un rat à l'autre et les statistiques sont basées sur les distances (donc fréquences de recombinaison) les plus probables. Un programme largement dominant, « MAPMAKER » a été conçu pour soutenir ce type d'analyse (79).

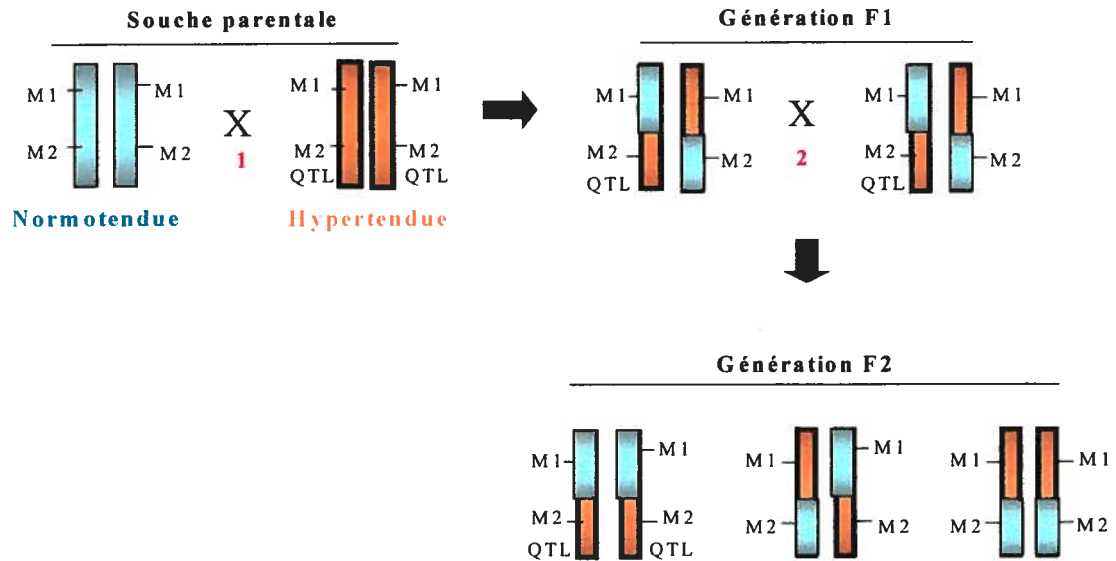


Figure 2. Schéma hypothétique de la construction de populations ségrégantes F2 pour analyses de liaison génétique. 1 - Croisement entre un rat d'une souche normotendue (en turquoise) et un rat d'une souche hypertendue (en rouge) 2 - Obtention d'une génération F1 de génome hétérozygote (comportant des recombinaisons méiotiques) ensuite recroisée pour former une génération F2. La génération F2 ne comporte pas de recombinaisons pour simplification schématique. M1 et M2 réfèrent à des marqueurs hypothétiques et QTL, un locus pour trait quantitatif pour la PA hypothétique.

Approches analytiques de la liaison génétique. Il existe principalement deux approches pour identifier une région chromosomique liée à la PA (10) . Ces approches sont la stratégie d'approche par délimitation génomique et l'approche par gènes candidats.

La délimitation génomique « repêche » littéralement les désordres complexes, polygéniques sans avoir d'hypothèse de départ concernant les gènes candidats, tout en tenant cependant compte de l'existence d'une spécificité dans la population choisie au départ. La délimitation est insuffisante si la quantité de marqueurs s'avère insuffisante ou si l'effet d'un locus n'est pas assez important pour être détecté selon

les critères statistiques astringents appliqués à cette approche. Ainsi, pour une recherche sur le génome total effectué avec des croisements de génération F2, il faudra suivre le génotype d'une moyenne de 100-200 animaux pour approximativement 500 marqueurs et ainsi, de 50 000 à 100 000 génotypes devront être déterminés. Ce procédé de génotype intensif sur un grand nombre de rats requiert un support technique spécifique et les études de liaison génétique de souches contrastantes couvrant le génome entier sont peu nombreuses. Un exemple de cette approche ayant servi pour cette étude peut être recensé (57).

L'approche par gène candidat sous-entend un choix de gènes basé à priori sur une connaissance de la pathophysiologie du trait en question. Elle est influencée par les données physiologiques et biochimiques sur la façon dont la PA est régulée à travers le système nerveux, endocrinien et rénal/cardiovasculaire. Cette approche est ciblée sur un ou plusieurs chromosomes d'intérêt uniquement. Toutefois, elle peut entraîner des résultats trompeurs car elle pourrait manquer le QTL recherché. Par exemple, une corrélation génotype-phénotype significative pour un marqueur d'un gène candidat peut refléter l'effet d'un autre gène localisé en proximité du gène candidat. Elle demande toutefois un moins grand support technique.

Approche statistique: notions de LOD score. Un *LOD score* représente le résultat de la probabilité statistique de l'existence d'un QTL à une localisation donnée sur une carte chromosomique. Ce *LOD* fait intervenir des marqueurs (dont les distances sont connues) choisis d'un chromosome ainsi que les mesures de PA de population F2. Le résultat de cette probabilité s'évalue à l'aide d'une échelle numérique où un *LOD* de 0 indique qu'il n'y a aucune probabilité de QTL au marqueur ou entre deux marqueurs choisis. Mathématiquement, le *LOD score* représente le logarithme du ratio de la proximité d'un QTL versus l'absence d'un QTL à proximité d'une position particulière de la carte. Il est calculé à plusieurs points sélectionnés dans un intervalle entre les marqueurs puis associés à la position de la carte. L'ensemble des points et *LOD* sont mis en graphique cartographique en fonction de chaque valeur correspondante de *LOD*. Si un ou plusieurs QTL se situe(nt) sur le chromosome, on

observera un tracé où la courbe atteindra son maximum à l'emplacement du QTL (pic). Toutefois, un maximum d'une valeur approximative de $LOD > 3$ est considérée comme significative alors qu'autour de 2, suggestive quand à la présence d'un QTL. De cette façon, il est possible de localiser l'emplacement cartographique le plus susceptible de contenir un QTL (22) (Figure 2a).

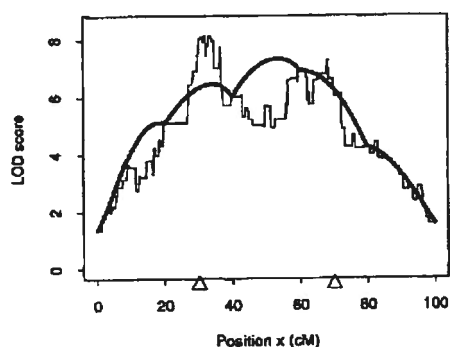


Figure 2a. Modèle d'un graphique de LOD. En ordonnée, se trouve le LOD score et en abscisse la position sur la carte en cM. La carte chromosomique est établie grâce à des marqueurs dont chaque LOD correspondant est relié sous forme de graphique. Une courbe est alors tracée à partir de ce graphique. Les extrémités (pics) des courbes représentent alors l'emplacement le plus probable du QTL.

Pour interpréter le LOD il faut tenir compte de la taille du génome, des effets intrinsèques du QTL du modèle génétique (i.e. effets additifs, dominance/récessivité, modèles plus ou moins contrastants) ainsi que les paradigmes de croisements (i.e. population F2) (22). Finalement, ces expériences exigent normalement une restriction statistique à un niveau de significatif dans les environs d'un $p < \text{ou} =$ à 0.001 (80). Plus récemment, il a été supposé que le niveau significatif devrait se situer, par exemple, dans les environs de 5×10^{-5} pour un génome de la taille d'une souris en utilisant des populations F2 (34).

Localisation d'un QTL par liaison génétique. En plus de l'imprécision statistique avec laquelle un QTL peut être localisé, il existe toujours la possibilité qu'un QTL ou plus puissent être liés sur le même chromosome. Cela peut ou (ou pas) résulter en des pics multiples dans le graphique des *LOD*, dépendant du rapprochement entre les QTL. Si 2 QTL sont suffisamment éloignés pour ségréguer indépendamment (i.e. éloignés de 80cM), alors deux pics peuvent être observés. Si deux QTL sont près et que leurs allèles sont en répulsion, l'effet des deux QTL peut s'annuler l'un l'autre et aucun pic n'est observé. Si les 2 allèles sont en couplés dans la même phase, on va observer un seul « pic » de *LOD* formant un plateau (84;85). De plus, Les conclusions tirées des analyses de liaisons génétiques ont donc tendance à produire des faux positifs (34;86;87).

Ce type d'analyse permet de cibler une région de 20 à 30 cM (81;82). La confiance d'intervalle de cette localisation est fonction du nombre de la population expérimentale, de la magnitude de l'effet du QTL et de la densité de marqueurs. Il a toutefois été démontré qu'une densité de marqueurs en bas d'un marqueur tous les 5-10 cM n'augmente pas significativement la localisation de QTL (83). De plus, il a été souligné que la plupart des QTL ont un effet individuel modeste d'environ 5 à 15% sur la variance totale de la PA dans des populations expérimentales (17). Ces proportions ne sont pas suffisantes pour déterminer l'emplacement d'un QTL avec certitude. En réalité, chaque animal est génétiquement unique et requiert un suivi du génotype et du phénotype pour chaque individu.

2.5 Souches de rats congéniques

L'analyse par liaison génétique ne demeurant qu'une suggestion statistique, il est nécessaire de disposer d'analyses pour prouver la présence ou l'absence d'un QTL. Tout comme l'analyse par liaison génétique, la méthode des congéniques est basée sur l'utilisation de deux souches contrastantes. Normalement, les résultats obtenus grâce à l'étude des souches congéniques devraient être consistants avec les résultats

obtenus par la liaison génétique. La construction d'un congénique est une procédure standard de génétique expérimentale mammalienne. L'idée de l'utilisation des souches congéniques a été conçue par Snell, sur des locus d'histocompatibilité chez la souris (88) et depuis grandement utilisée dans les études des traits héréditaires (89).

Principe des souches congéniques. Une souche congénique est une souche dans laquelle une petite portion d'un chromosome d'une souche (le receveur) a été sélectivement remplacée par la portion homologue du même chromosome d'une autre souche (le donneur) (**Figure 3a**). Les chromosomes homologues font référence à ceux qui forment des paires durant la méiose alors que les allèles réfèrent à différentes formes d'un gène. Il est donc possible de substituer les fragments chromosomiques de la souche donneuse, par exemple LEW, pour ceux contenant l'allèle homologue de la souche receveuse, par exemple S, par une série de croisements retour (BC) ciblés. Ces BC visent à maintenir la région d'intérêt provenant du donneur alors que la totalité de l'arrière plan génomique (autres chromosomes et région sans intérêt du chromosome cible) redevient homologue et de génotype receveur (par exemple S).

Pour localiser un QTL pour la PA (**Figure 3b**), si les fragments substitués contiennent un QTL pour la PA, on observera une différence de PA entre le congénique et la souche receveuse. Si la PA du congénique qui contient un arrière plan receveur hypertendu (par exemple S) est réduite, on peut conclure que le fragment chromosomique remplacé par le donneur normotendu (par exemple LEW) contient un QTL qui contribue à la différence de PA (entre S et LEW). On peut également effectuer l'expérience dans le sens inverse, en remplaçant l'allèle diminuant la PA avec la l'allèle augmentant la PA et conséquemment, s'attendre à une augmentation de la PA de la souche congénique.

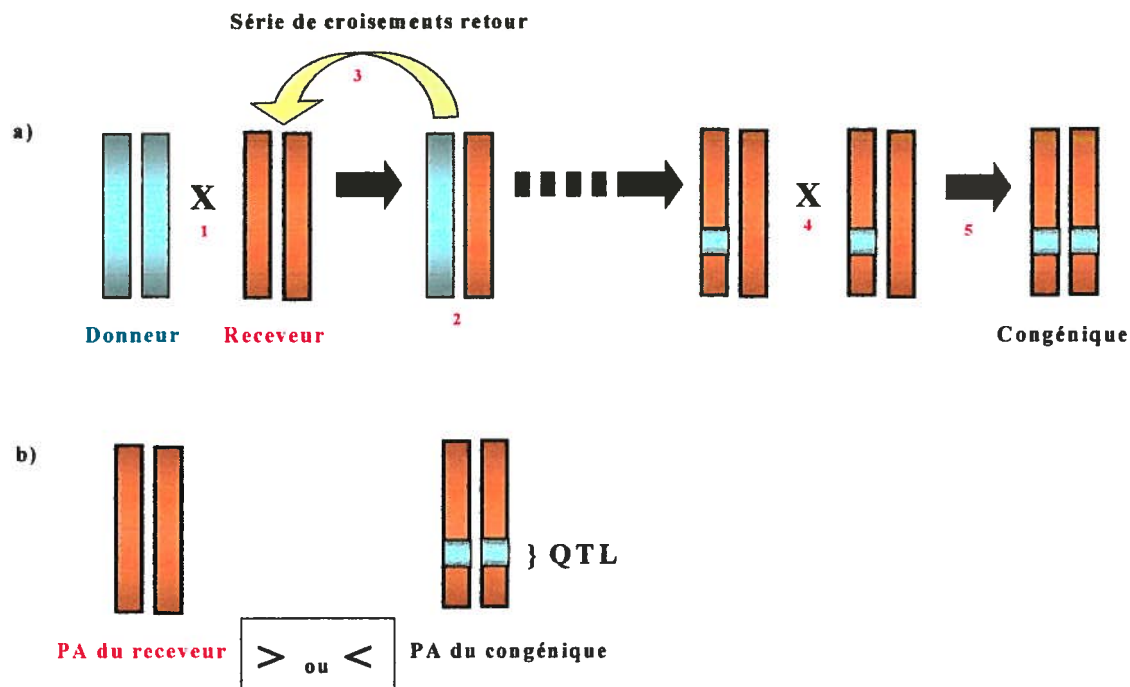


Figure 3. Schéma explicatif de la construction d'une lignée congénique (a) dans le contexte de la délimitation d'un QTL pour la PA (b).

- a) 1 - Croisement entre un rat receveur (par exemple S) et un rat donneur (par exemple, LEW) provenant de deux souches contrastantes. 2 - Obtention d'une première génération de génome hétérozygote. 3 - Série de croisements retour entre le rat présentant une hétérozygotie et le receveur tout en maintenant une portion donneur voulue. 4- Inter croisement de type « frère-sœur » 5- Obtention d'une souche de rat congénique possédant une portion cible homozygote du donneur.
- b) Si la pression artérielle (PA) du receveur est différente de la PA du congénique, on peut conclure qu'un QTL se trouve dans la région cible homozygote du donneur.

Stratégie de construction des congéniques. La stratégie optimale de construction des congéniques est d'initier les procédures à partir de lignées parentales avec des sélections pour plusieurs chromosomes à la fois. Ensuite, il s'agit de chercher des recombinaisons génétiques clefs pour opter pour un seul QTL. Cette méthode exige une moins grande infrastructure au niveau de l'élevage des rats. Elle vient cependant

appuyer le besoin d'effectuer un suivi du génotype complet (tout l'arrière plan génomique). Finalement, cette stratégie permettra éventuellement d'observer s'il y a des interactions entre certains QTL de chromosomes différents.

Croisements retour (BC) et stratégie congénique rapide. Le congénique qui résulte de la sélection d'un seul QTL possède un segment chromosomique flanquant du donneur équivalent en moyenne à $100/N$ cM où N est le nombre de croisements retour (90). Après huit croisements retour, l'ADN flanquant est environ 12,5 cM de chaque côté du marqueur (ou 25 cM de long). Ainsi, suivant les principes mendéliens, entre huit et douze croisements retours sont nécessaires pour s'assurer que plus de 99% du génome du donneur (excluant la région d'intérêt) a été remplacée par le receveur (86). Cette démarche requiert beaucoup de temps pour créer une souche congénique adéquate et a conséquemment entraîné le développement d'une méthode plus rapide exigeant une moins grande quantité de croisements.

La stratégie congénique rapide fut développée par Lander et Schork (34) et introduite avec succès lors de la construction de souches congéniques chez la souris (91;92). L'applicabilité de cette procédure a également été récemment démontrée chez le rat (93). Elle est basée sur un génotype répété des marqueurs polymorphiques distribués le long de l'arrière plan du génome après chaque croisements retour lors de la construction d'une souche congénique. Les rats présentant la plus grande proportion de génome remplacée par le receveur sont sélectionnés pour le BC suivant. Une stimulation par ordinateur a indiqué qu'un suivi de 16 mâles par génération avec 60 marqueurs situés dans l'arrière plan génomique et espacés par 25 cM réduit la contamination non liée du génome donneur à moins de 1% avec seulement quatre croisements retours (94;95).

Principe des sous-lignées congéniques. Les sous-lignées congéniques sont des souches de portions raffinées de la souche congénique de départ qui possèdent encore souvent une large région chromosomique contenant le QTL. Les sous-lignées sont également obtenues par substitutions chromosomiques par recombinaison et on peut

les obtenir soit directement à partir de la lignée congénique de départ ou d'une sous-lignée préétablie.

Les sous-lignées congéniques permettent d'établir une cartographie plus précise d'un QTL et le concept de base est analogue à la cartographie par délétion dont le pionnier est Bridges (96) et perfectionné par Benzer (66). Dans la cartographie par délétion, la perte d'une région chromosomique est associée à un changement phénotypique. Dans cette étude présente, la cartographie est plus précisément soutenue par un phénomène des substitutions successives entraînant ou non un changement phénotypique. Cette méthode a originellement été initiée avec succès dans l'agriculture (97).

En plus de raffiner la localisation d'un QTL par réduction progressive de la région entourant le QTL, les sous-lignées congéniques assurent la reproductibilité des QTL pour la PA chez les souches (contrôle positif). De plus, il est également intéressant d'obtenir une sous-lignée congéniques négatives pour la PA. Les sous-lignées servent alors de contrôles négatifs afin de s'assurer que la différence de PA n'est pas causée par un autre segment du génome. La délimitation de QTL par l'utilisation de sous-lignées congéniques peut rapidement devenir complexe. En effet, une région peut cependant contenir deux QTL ou plus ou avec effets opposés pouvant nuire à la validité des données de PA.

Choix des marqueurs et localisation d'un QTL. L'un des ingrédients essentiels pour la cartographie d'un QTL à l'aide des souches congénique est une bonne méthode de différenciation des allèles et le choix de bon marqueurs est prioritaire. Ainsi, les marqueurs utilisés pour le suivi devraient inclure ceux qui définissent les régions limitantes (qui se trouvent dans le minimum de *LOD* de la liaison), hors de la région chromosomique impliquée ainsi que d'autres adéquatement espacés au cœur de la région d'intérêt. On peut réduire une région chromosomique jusqu'à environ 0.5 cM mais on ne peut pas cibler complètement un gène candidat car une grande densité de marqueurs est requise dans une région de plus en plus petite. Trouver des recombinants pour la petite région demande l'analyse d'un nombre potentiellement

très élevé de rats (1 recombinant sur 100 produits de méiose pour 1 cM). D'autres stratégies seront alors requises.

Utilisations des souches congéniques. Jumelée à la liaison génétique, l'utilisation de souches congéniques a permis l'identification de QTL dans presque tous les chromosomes (excepté le chromosome 6, 11, 12 et 15) (17). De plus, la flexibilité de cette méthodologie permet éventuellement de construire des congéniques ciblant plusieurs QTL en même temps ("multi-congéniques"). La voie des études d'interactions potentielles entre ces QTL peut subséquentement être poursuivie. Par exemple, une étude sur le chromosome 2 et 10 du rat Dahl a démontré l'existence d'interactions entre ces chromosomes sur la PA finale obtenue (98). Le phénomène d'interaction ainsi que les différentes natures d'interactions seront abordées dans la discussion.

2.6 Analyses physiologiques

Mesure de la PA. Il existe plusieurs méthodes de prise de la PA chez le rat. Les trois méthodes principales sont le resserrement de la queue (plethyonographie) (99), la télémétrie (100) et l'usage d'un cathéter rempli de solution saline (101). Chez le rat Dahl, la plupart des QTL pour la PA ont été localisés par liaison génétique utilisant la méthode du resserrement de la queue jusqu'à environ 1998 (1). La procédure utilisée généralement aujourd'hui pour les souches congéniques, qui exigent une moins grande quantité de rats, est la télémétrie.

Mesure d'hypertrophie cardiaque et rénale. L'hypertrophie cardiaque est un indice de la morbidité et mortalité cardiaque indépendant et est communément présent chez les animaux qui affichent une haute pression sanguine (102;103). Il ne semble pas y avoir de déterminant prédominant dans le développement de l'hypertrophie cardiaque qui est influencée par plusieurs facteurs comme l'angiotensine II, la prise de sel, les statuts hormonaux et le moment de la journée ou la pression sanguine est élevée (104). Bien qu'il n'est pas clair quels sont les facteurs qui contribuent majoritairement à l'élargissement cardiaque, il est admis sans aucun doute que la

haute pression sanguine contribue à son développement en augmentant le stress sur la paroi des vaisseaux cardiaques ou en augmentant le travail cardiaque (105). L'hypertrophie cardiaque gauche semblerait alors présente et en partie dépendante de la PA (106). Une étude globale sur l'hypertrophie cardiaque chez le rat récapitule un nombre de gène candidats potentiellement élevé (107).

Des dommages rénaux peuvent se produire en réponse à des manipulations non génétiques visant à induire l'hypertension (par exemple, par la constriction de l'artère rénale). Il peut donc être anticipé que des QTL pour la PA soient associés à des dommages rénaux. Il est toutefois tout aussi logique de déduire que des gènes (adaptifs ou non) contrôlent les dommages rénaux en réponse à un stade de PA donné. Par exemple, des expériences de transplantations entre les rats histocompatibles BN et SHR ont démontré que le rein du rat BN était plus sensible aux inductions à des dommages rénaux que le rein du rat SHR (108).

En se reportant à la croissance rénale dans le contexte de croissance de tout l'organisme, l'hypertension essentielle pourrait également subvenir d'une disproportion entre la croissance rénale et la croissance corporelle (109). Des suggestions différentes basées sur la croissance corporelle humaine actuelle proposent que dans l'hypertension essentielle, le rein est trop petit (110;111) et la masse corporelle trop grande (112). Il faut toutefois souligner que l'hypertrophie, le rein et la prise de sel sont des composantes qui vont souvent de paire. Dans le contexte de l'utilisation du rat Dahl comme modèle, ces composantes sont critiques.

Diète. Une diète riche en sel peut provoquer plusieurs réactions face à l'hypertension, que ce soit l'humain ou le rat. Chez l'humain (comme chez le rat), des études démontrent que des sujets normotendus ou hypertendus peuvent être sensibles ou résistants à l'augmentation de la PA liée à la prise de sel (113). Par exemple, chez la souche normotendue de rat WKY et R, seule l'hypertrophie cardiaque ventriculaire gauche est augmentée par la consommation croissante de NaCl qui demeure indépendante de la PA (114). On peut également remarquer que les rythmes

circadiens des sujets sensibles au sel soumis à une diète riche en sel ont des élévations de PA constantes sur 24h alors que des sujets résistants au sel ont une PA élevée essentiellement durant les heures de sommeil (115).

Beaucoup d'évidences démontrent que le rein joue un rôle prédominant dans l'hypertension essentielle (116) et il également été suggéré que la PA liée à la sensibilité au sel implique centralement le rein. Des d'expériences de transplantations réciproques de reins chez le rat Dahl (S et R) (117) ainsi que le rat WKY et SHR (118) démontrant que l'hypertension suit le rein (i.e., la pression sanguine du receveur du transplant augmente si le donneur est hypertendu) et ce, pour des conditions environnementales semblables. Basé encore sur des études de transplantations rénales, ce lien entre le rein et l'hypertension semble également constant chez l'humain (116;119).

La régulation de la PA via les reins peut être contrôlée par des interactions écogénétiques avec des loci spécifiques via l'hémodynamique rénale en réponse à la prise de sodium. L'hémodynamique rénale comprend notamment le flot plasmatique et sanguin et la filtration glomérulaire. Par exemple, il a été démontré que le flot sanguin de la médulla est important dans la régulation du sodium et l'homéostasie de l'eau ainsi que dans le contrôle à long terme de la pression sanguine. La réduction du flot sanguin médullaire est influencée par des inhibiteurs tels que la nitrique oxyde synthase (120) et par l'infusion médullaire de vasopressine arginine (121) et suffit à produire une hypertension soutenue. De plus, il a été démontré que la sensibilité au sel peut être modifié par une diète en d'autres ions. Un apport supplémentaire en Ca^{2+} (jumelée à une diète en Na^+ élevée) diminue la PA dans la souche normotendue WKY et hypertendue SHR (122).

Influence de l'âge des rats. Il a été souligné que certains effets génétiques sur la PA peuvent avoir des composantes développementales inobservables sans étudier la PA pendant la croissance et le développement (123-125). De plus, il à été noté que

l'étude de rats en début de croissance ciblerait davantage les gènes impliqués dans la cause de l'hypertension plutôt que le simple l'effet (conséquence).

Effet du sexe. Le résultat de plusieurs études physiopathologiques chez le rat ont indiqué que le sexe jouerait un rôle significatif dans le développement de l'hypertension et suggère l'existence de QTL pour la PA également sur les chromosomes sexuels X et Y (126-130).

En conclusion, des facteurs comme la diète, l'âge des rats et l'effet du sexe ont une influence sur les résultats de notre stratégie globale d'identification de QTL pour la PA. Bien que des études indépendantes existent concernant ces facteurs, ceux-ci demeurent indissociables de nos études génétiques car un choix d'âge, du sexe et de la diète doit néanmoins être effectuée. Il demeure toutefois extrêmement difficile de juger l'importance de chacun de ces facteurs sur la localisation de QTL étant donné la nature complexe du contrôle de la PA. Ces sujets seront réabordés dans la discussion au chapitre 6 et regroupés au chapitre 8.

2.7 Analyses statistiques

Liaison génétique. Les études de liaison génétique sont des études suggestives. Elle ne permettent en aucun cas de prouver l'existence d'un QTL. Le LOD score demeure suggestif car les statistiques n'incluent pas la quantité de QTL pouvant être impliqués dans l'étude et la liaison ne possède aucun contrôle (130a).

Souches congéniques. Les souches congéniques sont également soumises à des tests statistiques. Ceux-ci permettent de conclure en des différences ou ressemblances statistiques significatives. Il est à noter que bien qu'un niveau significatif est atteint, la preuve de la présence d'un QTL réside en d'autres méthodes et qu'un mutant doit être obtenu pour valider les mesures statistiques. Il est à noter que dans le cas des congéniques, le génotype des rats est connu et les différences de PA ne sont attribuées qu'à une région déterminée. Si aucun facteur limitant (abordé au chapitre 8) la stratégie n'est présente, le QTL déterminé par l'usage des congéniques est plus

qu'une simple association au même titre que la liaison génétique. Le cas échéant, le QTL serait toutefois également un faux-positif.

Afin de savoir s'il y a une différence significative entre les lignées étudiées, un test d'ANOVA est tout d'abord effectué. Ce test est influencé par la moyenne et la dispersion de chaque groupe en fonction du nombre de groupes comparés et du nombre d'échantillons de chaque groupe. Si un ou plusieurs groupe est différent des autres, d'autres tests nommés "*post hoc*" sont effectués. De plus, puisqu'en télémétrie, les mesures sont étendues sur des périodes de plusieurs jours, l'ANOVA à mesures répétées, une variante de l'ANOVA est utilisée. Le principe est le même que l'ANOVA mais tient compte du fait que les mesures de pression de chacun des rats sont effectuées sur plusieurs jours. L'analyse par ANOVA permet d'éviter d'avoir recours à d'autres tests supplémentaires si tous les groupes sont semblables sans tenir compte du groupe témoin S à part.

Il existe également des tests post hoc de comparaisons par paires. Tout d'abord, il existe le test de Tukey qui permet de comparer toutes les paires possibles. En second, il existe le test de Dunnet afin de comparer chaque groupe à un groupe témoin, soit le groupe du rat S. Le test de Dunnet est un test suffisamment puissant puisqu'il est limité aux comparaisons d'intérêt entre les lignées congéniques et le témoins S. Les lignées sont regroupées entre elles mais sont toutes uniquement comparées au témoin S. Il est également possible d'avoir besoin d'effectuer une comparaison de tous les groupes entre eux, par exemple, lors d'études d'interactions de lignées appartenant à des chromosomes différents. Le test de Dunnet ne permet pas de tirer de conclusion comparant les lignées entre elles. Le test de Tukey peut alors directement succéder l'ANOVA. Il est toutefois important de souligner qu'en raison d'une augmentation du nombre de comparaisons effectuées, ce test est moins puissant.

Chromosome 16 et 17 du rat – Études précédentes.

Très peu d'études ont été effectuées sur le chromosome 16 et 17 en ce qui concerne le contrôle de la PA. Elles seront directement abordées dans la discussion.

CHAPITRE 3

Recherche et analyse moléculaire de gène candidats

3.1 Recherche de gènes candidats

Approches analytiques de gènes candidats : clonage positionnel et clonage par gènes candidats. Lorsqu'on ne connaît pas en profondeur les fonctions physiologiques des gènes candidats contenus dans une région, le clonage positionnel est préféré (131). Il est donc possible d'enclencher les recherches d'un gène candidat à partir de la région cible du congénique. Le principe est d'obtenir une région très petite (environ 1-2 cM) afin de réduire le nombre de gènes candidats possibles. Ainsi, indirectement, le clonage positionnel réfère à l'identification d'un locus causant un phénotype suite à l'utilisation de la liaison génétique et/ou des souches congéniques puis à l'étude de la structure et fonction de l'ADN dans l'intervalle chromosomique définit cette liaison et/ou ce congénique.

Alors que le clonage positionnel s'applique principalement lorsque le QTL pour la PA a été cartographié à 1-2 cM, l'approche par gènes candidats peut débuter à n'importe quel moment dès qu'un gène candidat logique a été découvert dans la région chromosomique d'intérêt. Un candidat logique fait par exemple référence à un gène dont la fonction déjà connue serait liée au contrôle de la PA ou encore à la régulation du sel. Dans ce cas, on peut donc directement créer les souches congéniques à partir dudit candidat.

Cartographie physique. Suite à la création de sous-lignées congéniques qui s'entrecoupent à partir de la souche congénique originale, il est possible de déduire plus finement la position du QTL. Les préalables de base exigent une quantité saturante de marqueurs chromosomiques (environ un minimum d'un marqueur tous les 500 Kb) dans la région d'intérêt et l'obtention de recombinaisons génétiques maximales. Une fois que les marqueurs saturent la carte, il faut obtenir un segment

génomique détaillé à l'aide d'autres outils comme les bibliothèques d'insertion génomique de chromosomes artificiels de levure (YAC), les chromosomes artificiels de bactérie (BAC), les clones de phage P1 (PAC), les cosmides ou les clones de bactériophages. Ces bibliothèques sont utilisées afin de tenter de générer des *supercontigs* en « marchant » d'un marqueur à l'autre afin d'obtenir un segment séquentiel physiquement continu entre les marqueurs qui permettra par la suite de dresser la liste des gènes candidats potentiels. Le recouvrement aisé de la carte physique est hautement fonction de la longueur des insertions d'ADN de rat dans le vecteur, de la stabilité des vecteurs de support ainsi que du pourcentage de recouvrement génomique du génome du rat par ceux-ci. Ce recouvrement est récemment facilité par l'existence de *supercontigs* disponibles par simple homologie de séquences des marqueurs sur NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

Un système de YAC intéressant est constitué de clones de séquences génomiques du rat introduits dans le génome circulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les systèmes de YAC peuvent contenir de 50 à 1000 kbp d'ADN (132) et l'usage de ces clones peut éventuellement permettre le recouvrement de séquences du génome de rat sur plusieurs méga bases (Mb)(133). La bibliothèque de Genome Research (www.resgen.com) couvre 9.8 fois le génome du rat. Le désavantage principal des YAC est la forte propension de 20 à 30% à former des chimères (134). Un clone chimérique contient des séquences non continues du génome inséré.

Les BAC peuvent servir de complément aux YAC. Les BAC sont des clones de séquences d'un génome d'intérêt, insérés dans le plasmide F d'*Escherichia coli*. Il est possible de cloner des fragments d'ADN jusqu'à 1 Mb dans les BAC utilisant les facteurs F (133) . Bien que de moins grande capacité que dans les YAC, l'ADN inséré dans les BAC est stable, facile à manipuler, et représente une source d'ADN unique et sans chimères (133). De plus, des bibliothèques de BAC ([http:// bacpac.chori.org/rat230.htm](http://bacpac.chori.org/rat230.htm)) qui couvrent plusieurs fois le génome de rat sont fabriquées (135).

Choix des gènes candidats. Dans le cas du clonage positionnel et une fois que la liste de gènes de la région d'intérêt est disponible, la cartographie comparative basée sur les homologies entre l'humain, la souris et le rat est souvent un point de départ. On peut ainsi procéder plus aisément à la sélection des gènes candidats. De plus, dans le cas du clonage par gène candidat et/ou clonage positionnel, il est astucieux de procéder à la sélection des candidats par analyse différentielle à l'aide de technologies comme le profil d'expression génique différentielle par micro-puces à ADN par exemple. On pourrait également avoir recours à la méthode complémentaire des SNPs (*single nucleotide polymorphism* pour polymorphisme simple de nucléotides). Finalement, la sélection des gènes candidats peut également reposer sur l'étude des fonctions physiologiques ainsi que leurs expressions dans des organes cibles des gènes connus dans la région d'intérêt..

3.2 Analyse moléculaire des gènes candidats

Une fois qu'un gène candidat est sélectionné, on peut débiter différentes analyses qui peuvent être regroupées sous analyses qualitatives et quantitatives

Analyses qualitatives. On peut directement commencer par l'analyse des ADNc (ADN complémentaire) obtenus par amplification d'exon. Pour ce faire, on aligne simplement les séquences afin de détecter la présence de mutations.

Une analyse qualitative complémentaire est également l'utilisation des SNPs. Cette méthode s'apparente aux marqueurs microsatellites dans l'optique où on peut différencier deux allèles mais en utilisant les enzymes de restriction (135a). Les SNPs sont d'ailleurs plus abondants et plus stables que les marqueurs microsatellites (135a). C'est une méthode très prometteuse jumelée à la technologie des micro-puces à ADN (qui sera abordée plus loin). Lorsque jumelée au micro-puces, il est possible de cibler au niveau quasi-génomique toutes les différences ainsi obtenir un profil hypertendu vs normotendu. En plus de pouvoir augmenter la quantité de marqueurs disponibles pour une région donnée, ils permettraient au niveau individuel d'évaluer si une allèle

est ancestrale, sauvage ou variante (mutante). Lorsque les SNPs choisis sont centrés sur les éléments fonctionnels des séquences il pourraient conduire indirectement au choix de candidats. Toutefois, pour identifier les éléments fonctionnels à l'aide des SNPs il faut disposer d'une banque complète chez le rat. Une banque en développement existe sur NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> .

La preuve finale pour démontrer qu'un gène est bel et bien le QTL cherché devrait provenir d'expériences transgéniques. Pour ce faire, il faudrait remplacer uniquement le gène candidat par son homologue contrastant afin d'observer la différence de PA. Malheureusement, les expériences transgéniques chez le rat sont pour le moment inaccessibles.

Il est à noter que le choix des tissus à étudier doit être considéré lors de l'analyse d'un gène candidat, et ce, pour tous les types d'analyses. Le choix des tissus lors de la plupart des analyses sauf celle du séquençage de l'ADN est un choix fondamentalement qualitatif et incontournable. Le choix des tissus est un point extrêmement délicat dans la découverte de gènes pour l'hypertension, il sera abordé dans la discussion.

Analyse quantitative. L'analyse quantitative fait référence aux différents niveaux d'expressions d'un gène. Un PCR en temps réel et l'immunobuvardage sont deux méthodes figurant parmi de nombreuses autres méthodes d'analyses quantitatives d'un candidat. Elles servent de vérificateurs incontournables d'une technologie plus puissante et maintenant accessible qu'est l'étude du profil d'expression génique différentielle par micro-puces à ADN.

Les avancements en biologie moléculaire et la technologie générale ont rendu possible l'évaluation des niveaux d'expression virtuelle de tous les gènes simultanément. Un procédé expérimental très commun est la comparaison des niveaux d'expression dans des animaux modèles expérimentaux qui ont des niveaux différents de PA ou après l'exposition à des stimuli qui affecte la PA dans des lignées cellulaires ou tissus cardiovasculaires (136;137). Ces études génèrent de longues

listes de gènes qui sont différentiellement exprimés entre les groupes expérimentaux, apportant la conclusion que le phénotype d'intérêt est associé avec des altérations du niveau d'expression de ces gènes. Par exemple, une étude comparant SHR avec la souche BN a démontré que plus de 1 % des gènes testés dans le cœur, le cerveau, les reins ou tissus adipeux démontrent des niveaux d'expression différents entre les souches (138).

Une approche qui s'avère moins exhaustive est le profil d'expression par micro-puces combinée avec des stratégies génétiques comme l'utilisation de souches congéniques (139) ou transgéniques (140). Elle permet de réduire la liste des gènes différentiellement exprimés et cible l'attention sur les gènes candidats prioritaires réduisant ainsi le niveau de complexité de l'analyse du profil. Il est à noter qu'encore une fois, les ou les tissu(s) à choisir pour l'analyse est un point délicat à déterminer. Finalement, une autre approche est la combinaison de la liaison génétique avec les micro-puces à ADN permettant ainsi de procéder à une double combinaison statistique et ce, à un niveau génomique complet. Ce procédé est maintenant appelé *genetical genomics* (141).

PARTIE II

**PUBLICATION SCIENTIFIQUE &
RÉSULTATS ADDITIONNELS**

CHAPITRE 4

Publication scientifique

Congenic mapping of a blood pressure QTL on Chromosome 16 of Dahl rats.

Myriam Moujahidine, Julie Dutil, Pavel Hamet, Alan Y. Deng

Research Centre-CHUM, Hôtel Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, Québec, H2W
1T8, Canada

Running head: BP QTL mapping

Corresponding author:

Alan Deng, Ph.D.

Chief of Molecular Genetics and Associate Professor of
Medicine

Research Centre

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
(CHUM)

7-132 Pavillon Jeanne Mance

3840, rue St. Urbain

Montreal, Quebec, H2W 1T8

Canada

Phone: 514-890-8000 ex. 15522

Fax: 514-412-7152

Email: alan.deng@umontreal.ca

Abstract

A Chromosome (Chr.) 16 segment of the Dahl salt-sensitive (S) rat was shown by linkage to contain a blood pressure (BP) quantitative trait locus (QTL). To verify and further narrow down the region harboring the QTL, two congenic strains were made by replacing two segments of the S rats with the homologous segments of the Lewis (LEW) rats. The construction of these congenic strains was facilitated by a genome-wide marker screening. The two congenic strains contained an segment in common and BPs of both were significantly lower than that of the S strain. Consequently a BP QTL could be localized to the overlapping region of about 49.4 centiRay (cR) including the telomere on a radiation hybrid map. Heart weights, left and right ventricular weights, kidney weights and aortic weights over length were all significantly decreased in the congenic strains compared to the S strain. Thus, there appeared to exist an association between the effects of the QTL on BP and on cardiac, renal and vascular hypertrophy.

Introduction

The S rat is an animal model that has been intensely utilized for mapping QTL (singular and plural) for BP (Deng 1998). In our previous genetic studies, a suggestive linkage was detected between a region on Chr. 16 and BP (Garrett et al. 1998). This was consistent with the work of other investigators using another strain of hypertensive rats (Schork et al. 1995). However, linkage alone was not sufficient to establish the authenticity of a QTL. For example, a QTL was initially localized by linkage to a segment on Chr. 17 (Deng et al. 1994). But the region where the QTL most likely resided turned out not to harbor one by the use of a congenic strain (Garrett et al. 1998). Because the construction of a congenic strain involves physically moving a section of a chromosome, it provides more definitive and stringent evidence that the chromosome region in question indeed contains a BP QTL. To prove, and if it exists, to fine map the QTL on Chr. 16, we constructed two

congenic strains. This report provides physical evidence for the involvement of a Chr.16 segment in BP regulation.

Methods

Animals: The SS/Jr rat used for making congenic strains was obtained from Dr. J. Rapp and are customarily designated as S. LEW/CrIBR (LEW) rats were purchased from Charles Rivers (La Salle, Canada). These strains were maintained in our facility and monitored as reported previously (Dutil and Deng 2001). Protocols for handling as well as maintaining animals were approved by our institutional animal committee. All procedures for the experiment were in accordance with the guidelines of local, provincial and federal regulations.

Breeding scheme for generating congenic strains: The breeding procedure and screening protocol were essentially the same as reported previously (Deng et al. 2001). In brief, rats of the S and LEW strains were first bred to produce F₁ rats, which were backcrossed to S rats to produce the first backcross generation (BC1). BC1 rats were genotyped for 92 markers approximately evenly spaced throughout the rat genome with an average spacing of about 18 cM (Table 1). The BC1 rat, which was heterozygous SL for a Chr.16 region but possessed the maximum SS homozygosity for the rest of the irrelevant genome, was selected and designated as the ideal breeder for a subsequent breeding with an S rat to produce BC2. BC2 rats were genotyped and screened exactly as for the BC1 rats to derive an ideal breeder BC2. This process continued until BC5. At this point, it was found that only the markers delineating a Chr. 16 region of interest (Figure 1) was heterozygous SL; whereas the markers for the rest of the genome including those flanking the Chr. 16 region of interest were homozygous SS.

To establish a congenic strain, a BC5 rat was bred to an S rat to duplicate the segment of interest. Subsequently, a female and a male rats were sister-brother

crossed to finally generate rats homozygous LL for the region of interest, but homozygous SS for the rest of Chr. 16 and rest of the genome. Two congenic strains produced are S.LEW-D16Uia2/D16Rat12 and S.LEW-D16Mit2/D16Rat12, and are abbreviated as S.L1 and S.L2 respectively. The chromosome regions homozygous LL in each strain are shown as solid bars in Figure 1. All the markers in the region were genotyped for both congenic strains.

BP measurements: The BP study for the rat is essentially the same as described previously (Dutil and Deng 2001). In brief, the mating pairs of the S and congenic strains to be studied were bred simultaneously. Male rats were weaned at 21 days of age, maintained on a low salt diet (0.2% NaCl, Harlan Teklad 7034) and then fed a high salt diet (2% NaCl, Harlan Teklad 94217) starting from 35 days of age until the end of the experiment. The implantation of telemetry probes, the age of animals and postoperative cares of animal are the same as described previously (Dutil and Deng 2001, Deng et al. 2001).

Tissue extraction: Rats were sacrificed by decapitation at 14 weeks of age. The organs of interest were removed, cleaned from surrounding adventitial connective tissues and fat, blotted to remove excess blood, and weighed immediately. To minimize any potential inconsistency in the collection, one person was designated for harvesting one particular organ and also for the subsequent dissections into sub-portions of interest. The whole heart was then dissected into the left ventricle plus the septum, and into right ventricle. The weight of each section was then recorded and corrected for the body weight of the respective animal.

DNA extraction and Genotyping: DNA for each rat was extracted by tail biopsy using a Qiagen Genome kit and the genotype of each rat was determined by PCR based on the methods previously published (Deng et al. 2001).

Radiation Hybrid mapping: A rat/hamster (RH) panel of 96 radiation hybrids was purchased from Research Genetics (Huntsville, AL, <http://www.resgen.com/>). For

chromosome mapping, each marker was genotyped using RH by PCR according to a previously published protocol (Deng et al. 2001, Dutil and Deng 2001). To locate a marker of interest onto an existing RH framework map, the results of genotyping were entered into a web site, <http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER>.

Statistical analysis: Repeated measures' Analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test in the SYSTAT 9 program (SPSS Sci. Chicago, IL) was used to compare the significance level for a difference or a lack of it in a BP component between a congenic strain and the S strain. The Dunnett correction takes into account multiple group comparisons as well as sample sizes among the comparing groups. In the analysis, a BP component was compared at each day for the period of measurement among the strains.

Results

Congenic constructions: By following the strategy of selecting an ideal BC rat at each generation, the construction of two congenic strains were accomplished in 5, instead of 8, BC generations as used conventionally (Rapp and Deng 1995). The current results are consistent with our previous work (Deng et al. 2001) and the result of other investigators (Jeffs et al. 2000). All the markers (Table 1) except the region of interest (Figure 1) turned out to be homozygous at BC5. The chromosome regions containing LEW substitutions in the congenic rats are shown in Figure 1. In the end, each region of interest from the S rat was replaced by the homologous region of the LEW rat, i.e. a LL region on the SS genetic background.

BP Study: The basic design of raising animals is similar to our previous congenic work regarding the age and sex, and in terms of the timetable of dietary treatments (Dutil and Deng 2001). All the BP components were measured including mean arterial (MAP), diastolic (DAP), and systolic pressures (SAP). For the simplicity of presentation, each point in the graphs in Figure 2 represents averaged 24-hour

readings taken from averaged values at every four hours. One BP reading was taken every 4 hours for all the data points collected within that period of time. Then, these 4-hour readings were averaged for 24 hours or 6 readings were averaged within 24 hours to obtain one data point, which appears as a point on the graph. BP differences between S and LEW rats were significant ($p < 0.0001$) (Figure 2).

Mapping of a BP QTL: Figure 2 shows comparisons of MAP, DAP and SAP of S rats with those of two congenic rats as well as the LEW rat. Congenic strains were compared to each other in the length of the chromosome replacements and for their effects on BP. The region containing the QTL can be localized to the segment shared in two strains that both showed significant decreases in BPs. MAPs, DAPs and SAPs of S.L1 and S.L2 were lower ($p < 0.04$) than those of the S strain in most of the days of measurements (Figure 2).

Evaluation of cardiac, renal and aortic hypertrophy: Tissues of interest for each congenic strain were measured and compared to those of the S strain. Figure 3 shows comparisons of heart weights (HW/BW), aortic weights over aortic length (AW/AL)/BW and kidney (KW/BW) weights (all corrected for body weights, BW) among LEW and congenic strains with those of the S strain. LEW had a lower ($p < 0.001$) HW/BW, (AW/AL)/BW and KW/BW than S. Values of the HW/BW, (AW/AL)/BW and KW/BW and in S.L1 and S.L2 were lower ($p < 0.05$) than S. The decrease in the HW/BW is associated with decreases in both left ventricular (LVW/BW) and right ventricular weights (RVW/BW) in both congenic strains.

Discussion

A BP QTL is mapped to the Chr.16 segment between D16Rat21 and the telomere (Figure 1), which is shared between S.L1 and S.L2 congenic strains. This segment is about 49.4 centiRay (cR) in size. We chose to focus on the radiation hybrid mapping because linkage distances vary from one F2 population to another derived from

various crosses (Deng et al. 1998). A further fine mapping and eventual positional cloning of the QTL will rely on the physical distance, not necessary on the frequency of recombination between markers. It seems that S.L1 has a slightly higher BP than S.L2, but this difference is not significant ($P < 0.10$).

Alternatively, the telomere itself might influence BP, because both congenic strains contained the telomere from, presumably, LEW strain [i.e. the most telomeric marker known on Chr.16, D16Rat12 (<http://www-genome.wi.mit.edu/rat/public/>), is that of LEW (Figure 1)]. Considering potential biological functions of telomeres in aging, apoptosis, and even in essential hypertension (Aviv and Aviv 1997, Hamet et al. 2001), a possible involvement of the Chr.16 telomere in BP regulation can not be ruled out. Constructions of congenic substrains and analyses of the telomere length will be further pursued.

It is noteworthy that HWs/BW, (AWs/AL)/BW, KWs/BW are associated with BP effects of both congenic strains (Figure 3), indicating that the QTL may have direct connections with cardiac, aortic and renal phenotypes. Whether or not these correlations indicate a cause-effect relationship remains to be proven.

There was evidence from linkage analysis using other rat models that genes for BP and left ventricular hypertrophy (LVH) could be separated. For instance, a locus *Hsp27* on rat Chr. 12 was found to cosegregate with LVH in a F_2 cross involving the Spontaneously Hypertensive rats (SHR) (Hamet et al. 1996). Another locus for LVH was found on rat Chr. 14 in SHRSP (Clark et al. 1996). Moreover, LVH can be independent of hypertension. This has been shown as the expression of the locus for the atrial natriuretic peptide (*Anp*) on rat Chr. 5 was linked to LVH in an F_2 cross involving the Wistar-Kyoto (WKY) and WKY-derived hyperactive strains (Masciotra et al. 1999). Both of these strains have a similar BP and both are not hypertensive.

Acknowledgements:

We thank Dr. J. Tremblay for developing the telemetry system at CHUM. The current work was supported by grants from American Heart Associate National Center (0140149N), Heart and Stroke Foundation of Canada (AD-12-FMCQ), Canadian Foundation for Innovation and Canadian Institutes for Health Research (CIHR, MOP36378) to AYD. PH is also supported by CIHR. AY. Deng is an Established Investigator of the American Heart Association. J. Dutil holds a CIHR studentship.

References:

- Aviv A, Aviv H. (1997). Reflections on telomere, growth, aging, and essential hypertension. *Hypertension* 29:1067-1072.
- Bihoreau M, Sebag-Montefiore L, Godfrey RF, Wallis RH, Brown JH, Danoy PA, Collins SC, Rouard M, Kaisaki PJ, Lathrop M, Gauguier D. (2001). A high-resolution consensus linkage map of the rat, integrating radiation hybrid and genetic maps. *Genomics* 75: 57-69.
- Clark JS, Jeffs B, Davidson AO, Lee W, Anderson NH, Bihoreau M, Brosnan M, Devlin AM, Kelman AW, Lindpaintner K, Dominiczak AF. (1996). Quantitative trait loci in genetically hypentensive rats, possible sex specificity. *Hypertension* 28:898-906.
- Deng AY, Dene H, Pravenec M, Rapp JP. (1994). Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes. *J. Clin. Invest.* 93:2701-2709.
- Deng AY. (1998). In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertension* 16:1707-1717.
- Deng AY, Smith-Mensah, WH, Hoebee B, Garrett M, Rapp JP. (1998). Linkage mapping of rat chromosome markers generated from chromosome-sorted DNA. *Mamm. Genome* 9:38-43.

- Deng AY, Dutil J, Sivo Z. (2001). Utilization of marker-assisted congenics to map two blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats. *Mamm Genome* 12:612-616.
- Dutil J, Deng AY. (2001). Further chromosomal mapping of a blood pressure QTL in Dahl rats on chromosome 2 using congenic strains. *Physiol. Genomics* 6:3-9.
- Garrett MR, Dene H, Walder R, Zhang Q, Cicila GT, Assadnia S, Deng AY, Rapp JP. (1998). Genomic scan and congenic strains for blood pressure quantitative trait loci using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res* 8:711-723.
- Hamet P, Kaiser MA, Sun Y, Page V, Vincent M, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Tremblay J, Samani NJ. (1996). *HSP27* locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension* 28:1112-1117.
- Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, Dumas P, Tea B, deBlois D, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Sun Y, Tremblay J. (2001). Excess growth and apoptosis: Is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension* 37:760-766.
- Jeffs B, Negrin CD, Graham D, Clark JS, Anderson NH, Gauguier D, Dominiczak AF. (2000). Applicability of a 'speed' congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 2. *Hypertension* 35:179-187.
- Masciotra S, Picard S, Deschepper DF. (1999). Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circ Res.* 84:1453-1458.
- Rapp JP, Deng AY. (1995). Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? *Hypertension* 25:1121-1128.
- Schorck NJ, Krieger JE, Trolliet MR, Franchini KG, Koike G, Krieger EM, Lander ES, Dzau VJ, Jacob HJ. (1995). A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome Res.* 5:164-172.

Table 1. Chromosome markers used to make congenic strains.

Chromosome	Markers tested
1	D1Wox25 - D1Rat304 - D1Mco27 - Sa - D1Uia12 - D1Arb33 - D1Rat19 - D1Mco4
2	<i>Camk2d</i> - <i>Gca</i> - D2Rat302 - <i>Cpb</i> - D2Mco13 - D2Rat199 - D2Uia5
3	D3Rat107 - D3Rat17 - D3Rat24 - D3Rat66 - D3Wox3 - D3Rat52
4	D4Mgh1 - D4Mgh16 - D4Uia1 - D4Mit17 - D4Uia4
5	D5Rat130 - D5Mit5 - D5Uia2 - D5Mco34 - D5Uia8 - D5Rat95 - D5Mco2 - <i>Ela2</i>
6	D6Rat105 - D6Mit1 - D6Mgh3
7	D7Mgh1 - D7Rat152 - D7Rat44 - D7Rat110 - D7Rat18 - D7Rat128 - D7Rat115
8	D8Mgh11 - D8Rat134 - D8Rat43 - D8Uia2 - D8Rat55
9	D9Rat64 - D9Uia9 - D9Wox23
10	D10Mco10 - D10Mco17 - D10Mgh6 - D10Wox6 - D10M11Mit58 - D10Mco15 - D10Rat11 - D10Mgh1
11	D11Rat50 - D11Mit1 - D11Uia1
12	D12Mit6 - D12Rat32 - D12Mit4

13	D13Mgh4 - D13Uia3 - D13Uia8
14	D14Wox10 - D14Uia2 - D14Uia1
15	D15Uia8 - D15Mgh2 - D15Rat126
16	D16Rat14 - D16Rat67 - D16Uia2 - D16Rat21 - D16Mit2 - D16Rat12
17	D17Wox7 - D17Mit5 - D17Mgh5 - <i>Agtr1a</i> - <i>Edn1</i>
18	D18Uia6 - D18Mit8 - D18Mco6 - D18Wox7
19	D19Rat82 - D19Rat25 - D19Rat57
20	D20Wox3 - D20Wox1 - D20Mgh1
X	DXUia2 - DXMco1 - DXRat93

Footnotes for Table 1: All the markers are polymorphic between S and LEW strains. For designations of genes, see Deng et al. (1994) and Dutil and Deng (2001). The rest of the markers are mostly anonymous (Garrett et al. 1998; Deng et al. 1998; <http://waldo.wi.mit.edu/rat/public/>).

Figure 1. **QTL mapping.** The linkage map is essentially the same as published previously (Garrett et al. 1998, Deng et al. 1998) and recently integrated map (Bihoreau et al. 2001). Numbers to the left of the linkage map are units in cM. The order some loci on the map has been initially determined by linkage using the MAPMAKER program, and then verified by scoring crossovers during the construction of congenic strains. RH map refers to that based on rat/hamster radiation hybrids, in which units are in centiRays (cR). Numbers indicate distances in cR between markers. Solid bars under congenic strains symbolize the S chromosome fragments that have been replaced by that of the LEW rat. The entire region indicated by solid bars and junctions between the solid and open bars are homozygous LL on the map for all the markers listed in the corresponding positions. Open bars on ends of solid bars indicate the ambiguities of crossover breakpoints between markers. Junctions between solid and open bars as well as ends of chromosome regions of interest in each strain are connected by dotted lines to the marker positions on the map. The markers are anonymous (Garrett et al. 1998, Deng et al. 1998, <http://waldo.wi.mit.edu/rat/public/>, http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/rat_compar2001_maps.html). S.L1 and S.L2 refer to congenic strains S.LEW-D16Uia2/D16Rat12 and S.LEW-D16Mit2/D16Rat12 respectively. S, the Dahl salt-sensitive strain. MAP refers to the averaged mean arterial pressure during the period of measurement for each strain. ANOVA with the Dunnett correction compares MAPs among S, and the two congenic strains.

Figure 2. Comparisons in BP components between LEW, S.L1, S.L2 and the S strains. Mean arterial (MAP), diastolic (DAP) and systolic (SAP) pressures were significantly different between LEW and S ($p < 0.0001$), and between both congenic strains S.L1 ($n=4$) and S.L4 ($n=4$) and the S strain ($n=11$) ($p < 0.04$). Each time point on the graph represents an average of 24-hour readings. All the numbers on the vertical axes (or Y) are in mmHg. Error bars represent SEM. For strain designations, see the legend for Figure 1.

Figure 3. Comparisons of cardiac, renal and aortic parameters between the LEW, congenic and S strains. HW, heart weight; LVW and RVW, left and right ventricular weight; KW, kidney weight; LKW and RKW, left and right kidney weight; BW, body weight; AW and AL, aortic weight and length respectively; mg, milligram; g, gram. HW, LVW, RVW, KW, LKW and RLW were corrected for BW. Error bars represent SEM. For congenic strain designations, see the legend for Figure 1. For age, dietary treatment and other procedures, see the method section for detail.

Figure 1

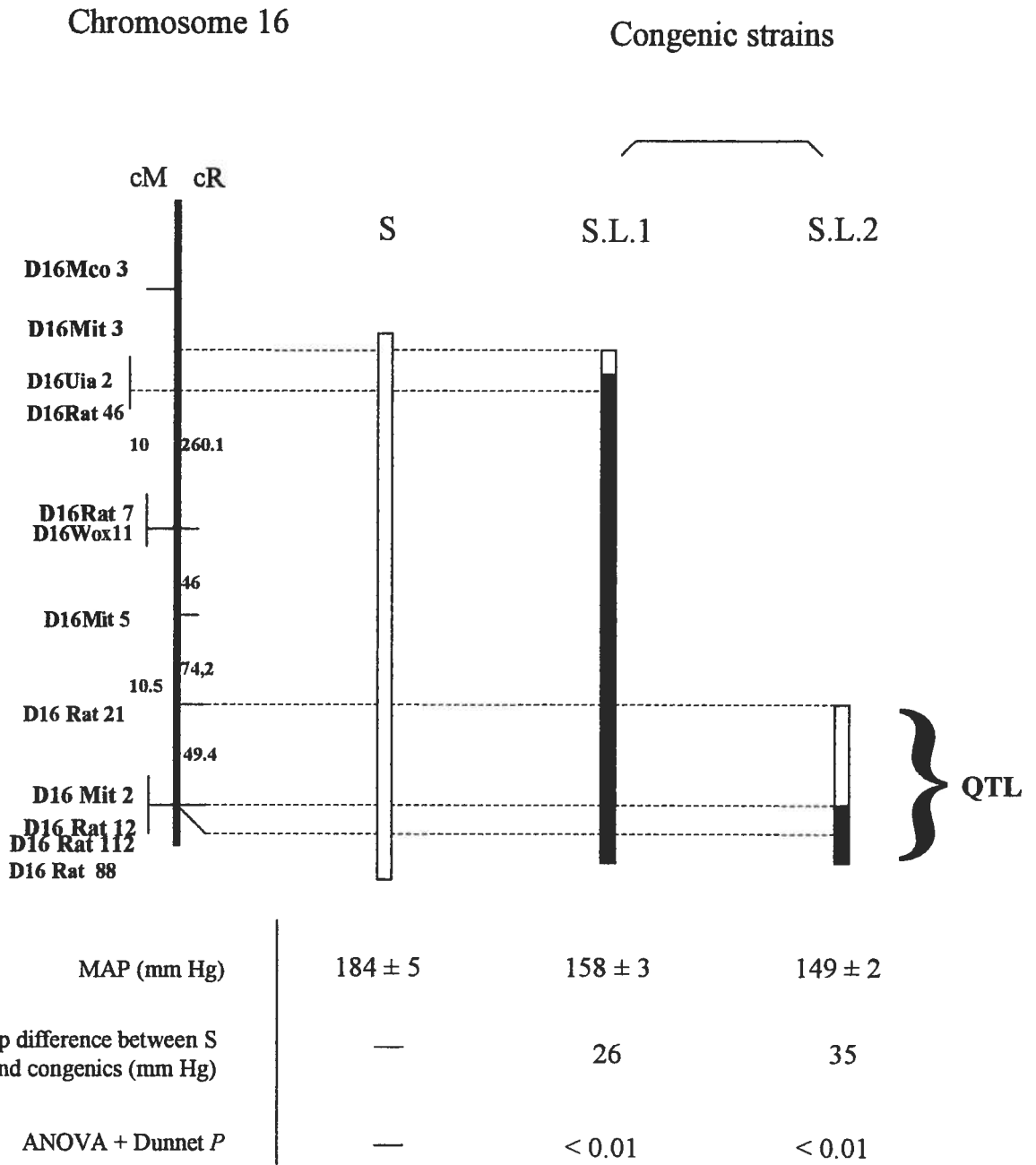


Figure 2

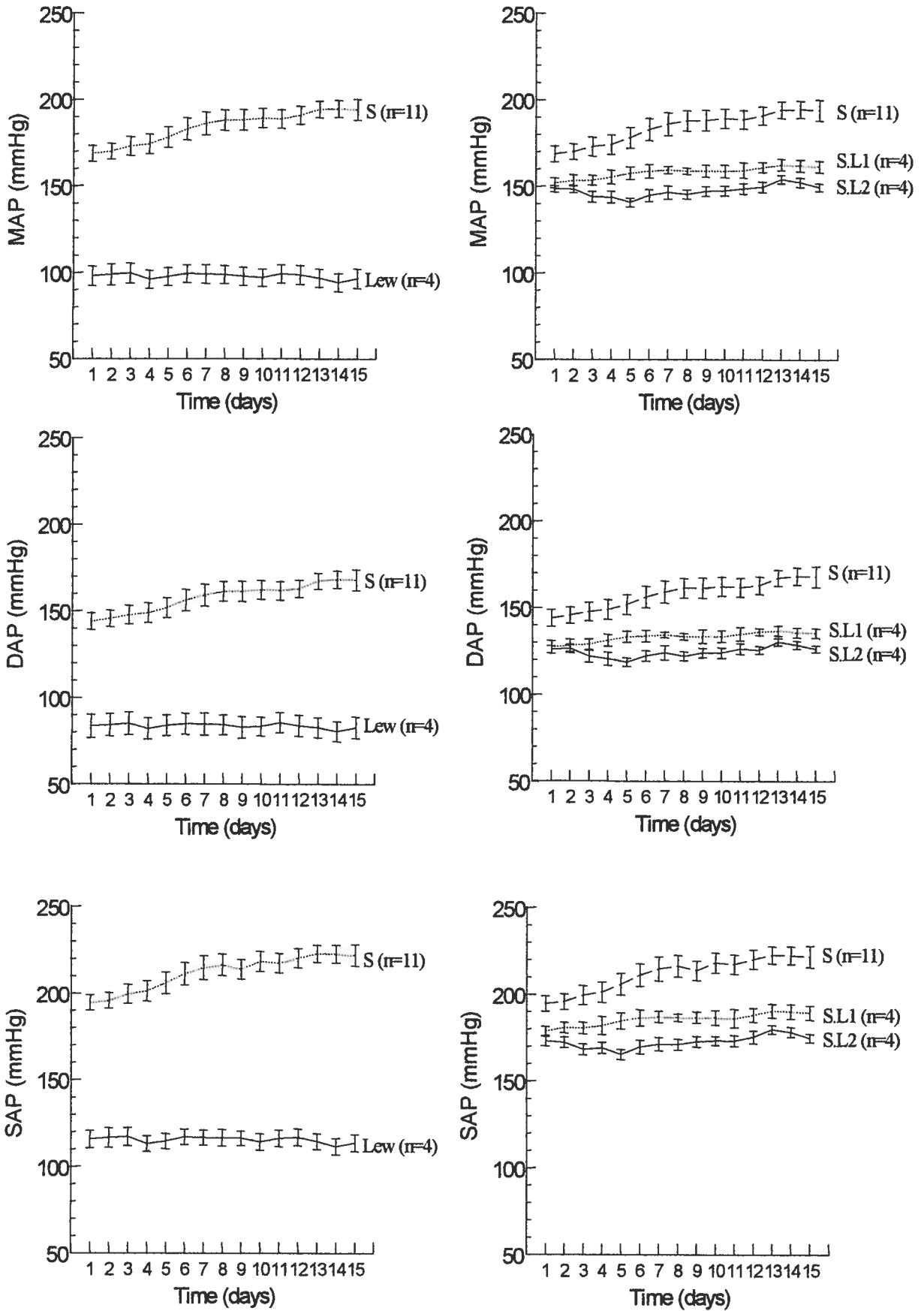
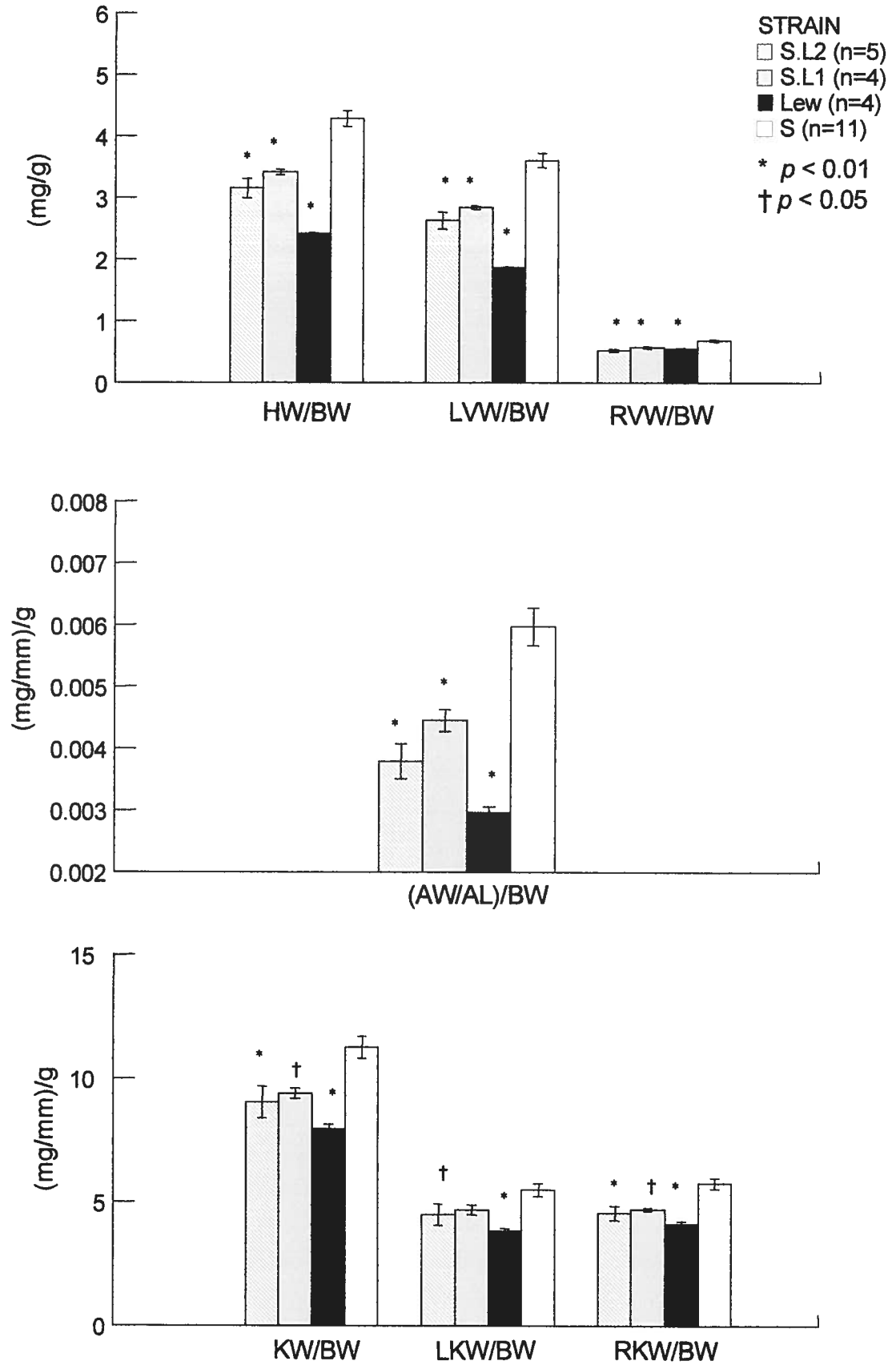


Figure 3



CHAPITRE 5

Méthodologie et résultats expérimentaux additionnels

Volet A: Résultats pour l'étude du chromosome 16

A.5.1 Construction des congéniques et études de PA

Le chapitre 4 résume la stratégie générale de construction des congéniques et de mesures de PA. Deux souches congéniques (C16S.L3 et C16S.L4) ont été ajoutées (**Figure 4**). C16S.L3 et C16S.L4 réfèrent respectivement à la souche congénique S.LEW-D16Chm36/D16Chm23 et S.LEW-D16Rat38/D16Chm66. S réfère à la souche *Dahl Salt-Sensitive* (S). La cartographie réajustée de la figure 4 est en accord avec la publication.

La **Figure 5** démontre la comparaison de la pression artérielle moyenne (MAP), pression artérielle diastolique (DAP) et pression artérielle systolique (SAP) des rats S avec les trois souches congéniques. Les mesures de trois rats ont été ajoutées pour la souche C16S.L2 (correspond à la souche S.L2 de la publication). Le résumé des statistiques de PA des souches apparaît au bas de la figure 4. Seule la MAP a été résumée, la DAP et SAP étant consistantes avec la MAP. La comparaison entre les souches parentales S et LEW apparaît également dans la publication.

Cartographie d'un QTL pour la PA. Les souches congéniques ont été comparées entre elles dans la grandeur de leurs remplacements chromosomiques ainsi que leurs effets sur la PA afin de déterminer la région contenant le QTL. Comme le démontre la figure 4, la cartographie du QTL est maintenant physique et soutenue par des marqueurs domestiques dont le préfixe *Chm* fait référence au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) en accord avec la nomenclature des rats (<http://rgnc.gen.gu.se/Brief.html>). Les détails concernant ces marqueurs sont disponibles au Tableau III du chapitre 7.

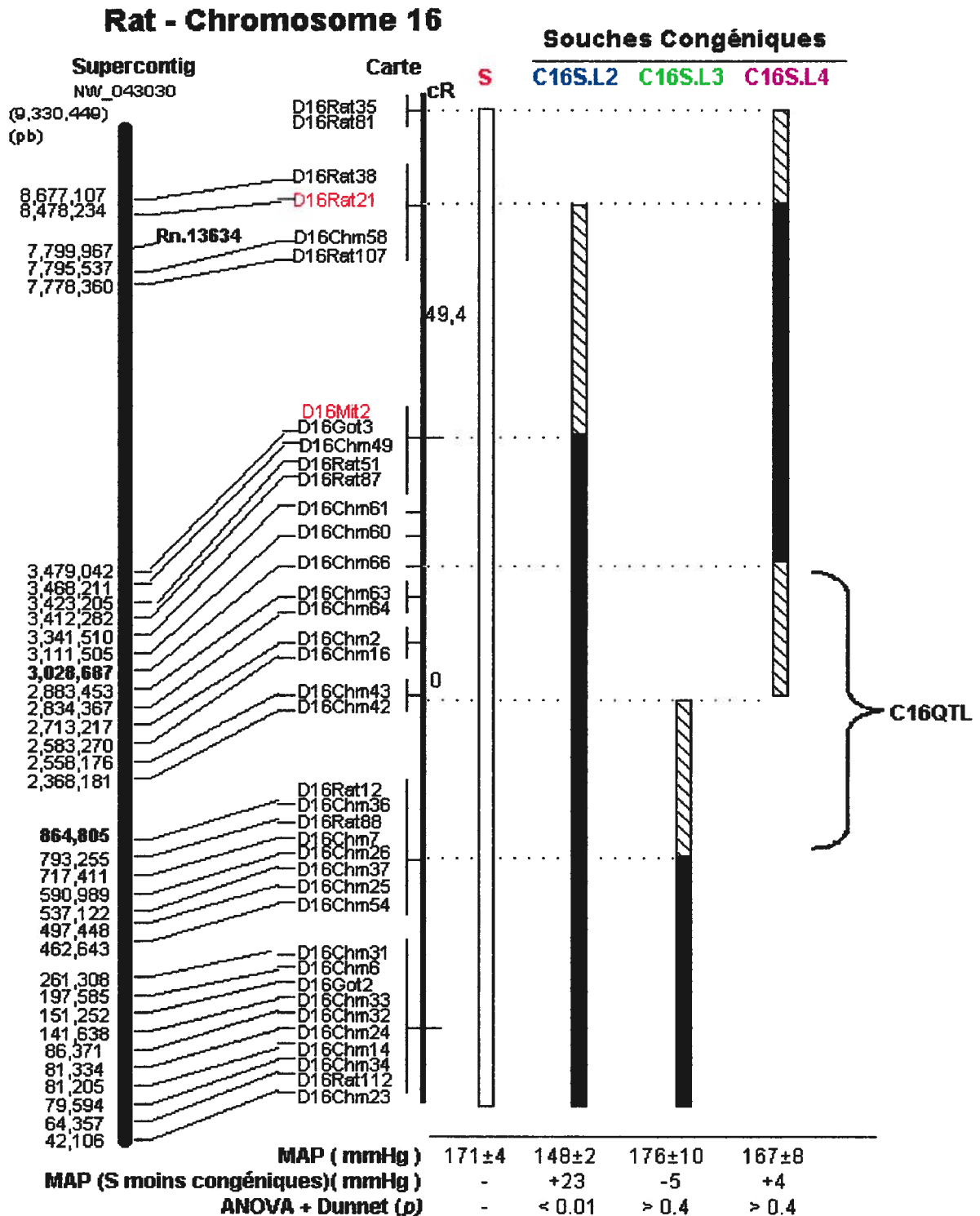


Figure 4. Cartographie physique du QTL du chromosome 16. Les nombres à droite sont en unités centirad (cR) d'hybrides de radiation. L'ordre des marqueurs sur la carte a été déterminé par recombinaison génétique et approuvé par placement des séquences sur le *supercontig* NW_043030 provenant de www.ncbi.nlm.nih.gov dont les positions sont indiquées en paires de base (pb). Les barres solides symbolisent les fragments S qui ont été remplacés par ceux du rat LEW pour les

marqueurs listés aux positions correspondantes. Les barres non remplies indiquent les régions d'ambiguïté de recombinaisons entre les marqueurs. Les jonctions entre les barres solides et non remplies sont associées à leurs marqueurs respectifs en pointillés. Les marqueurs non associés à un pointillé présentaient un génotype incertain. Les marqueurs sont anonymes((1;57); <http://valdo.wi.mit.edu/rat/public/> ; http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/ et tableau III). MAP réfère à la pression artérielle moyenne durant la période de mesure de chaque souche. *p* représente l'ANOVA et la correction Dunnet comparant les MAP entre S et les trois souches congéniques. Rn.13534 réfère au candidat des micro-puces à ADN ainsi que sa position correspondante sur la carte physique. Voir texte pour désignation des souches.

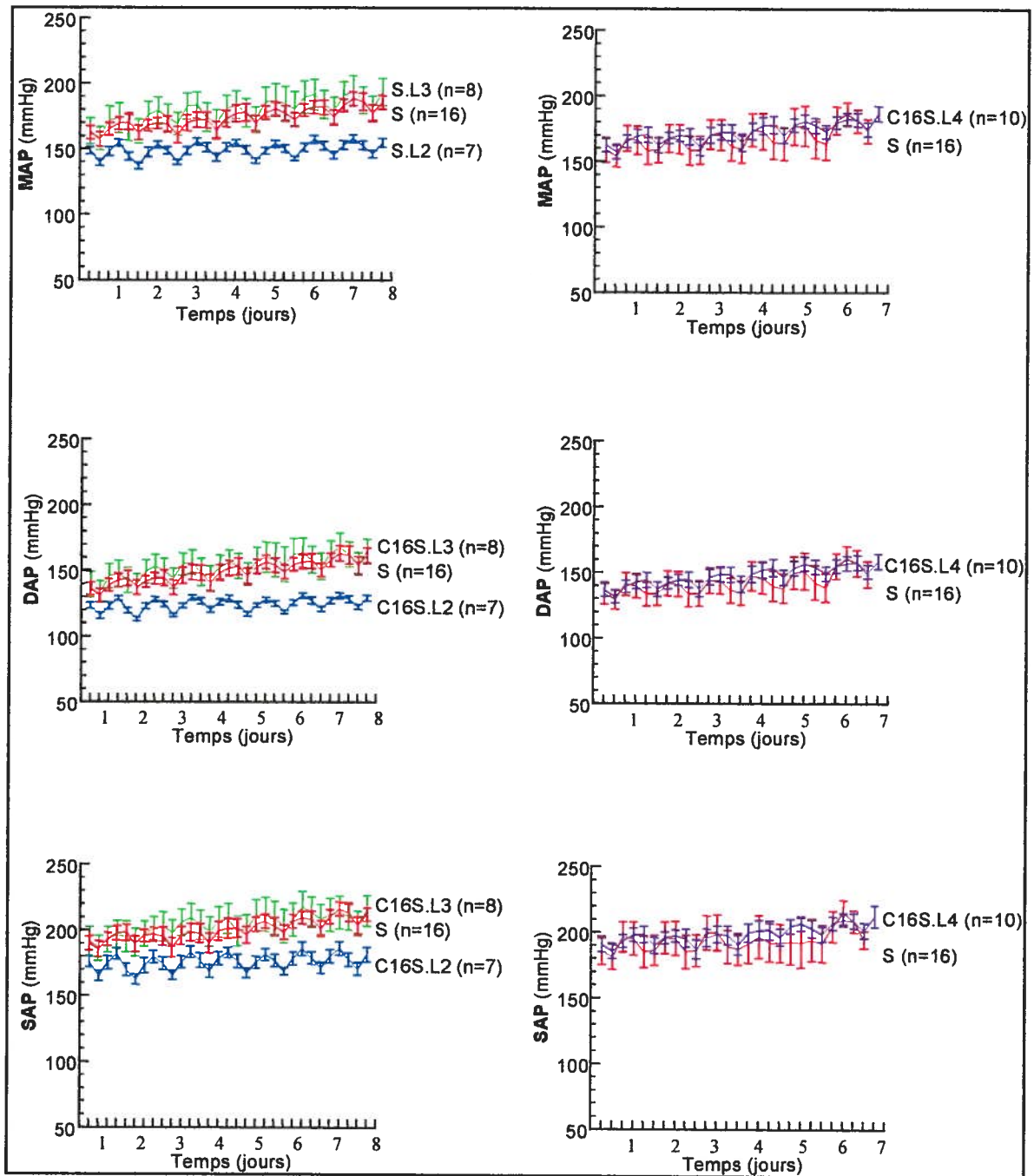


Figure 5. Comparaisons des composantes de la pression artérielle (PA) entre les souches congéniques et S du chromosome 16. En bleu C16S.L2 (n=7), en vert C16S.L3 (n=8), en mauve C16S.L4 (n=10) et en rouge S (n=16). La pression artérielle moyenne (MAP), la pression artérielle diastolique (DAP) ainsi que la pression artérielle systolique (SAP) étaient significative entre S et C16S.L2 ($p < 0.01$) et non significative entre les souches C16S.L3 et S ($p > 0.4$) ainsi qu'entre C16S.L4 et S ($p > 0.4$). Chaque point sur le graphique représente une moyenne lecture de 6h. Tous les nombres sur l'axe verticale sont en millimètres de mercure (mmHg). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

A.5.2 Études d'homologie

Un tracé d'homologie du rat avec la souris et l'humain vient s'ajouter et exploiter la cartographie physique (**Figure 6**). La désignation des gènes connus ou similaires à un gène connu est la suivante: Ppif (PPiase), gène de la peptidylpropyl isomérase F (cyclophiline F); RAI17 Gène d'induction d'acide rétinoïque 17; ANXA11, gène de l'annexine A11; PLAC9, gène spécifique du placenta 9; LOC219346, gène similaire à la double homéoboite 2; SLMAP, gène de la protéine associée au sarcolemme; ARF4, gène du facteur 4 de ribosylation d'ADP; LOC201625, gène similaire à la chaîne lourde d'axonème dynéine 7; ASB14, gène de la répétition d'ankyrine et de la boîte contenant la SOCS protéine 14; APPL, Gène de la protéine adaptatrice contenant un domaine pH, un domaine PTB et un motif leucine zipper; HESX1, gène la l'homéoboite 1; IL17RD (SEF), gène du récepteur D de l'interleukine 17; ARHGFP3, Gène du facteur 3 d'échange de nucléotides Rho guanine; RAP140, Gène de la protéine 140 associée au rétinoblastome; LOC344690, gène similaire à la protéine p110 de la cytomatrice. Les autres locus sont inconnus.

A.5.3 Gènes candidats des micro-puces à ADN

Rats. Les reins de rats mâles des souches S, LEW et un congénique 'double' C10S.L1/C16S.L2 (C10S.L1 couvre presque le chromosome entier soit D10Mgh1/D10Mgh6, voir figure 14 pour cartographie) ont été sélectionnés pour effectuer les analyses de profil génique d'expression différentielle par micro-puces à ADN. Les rats ont été nourris à une diète de 2% NaCl à partir de leur 4e semaine. L'âge des sujets pour les analyses était de 5 semaines pour tenter de cibler les gènes exprimés différemment de type causal plutôt qu'effectif.

Préparation de l'ARN et micro-puces à ADN. Les rats ont été sacrifiés par décapitation. L'ARN a été préparé utilisant le kit RNeasy de Qiagen en triplicata pour S et LEW et en duplicata pour C10S.L1/C16S.L2. Des micro-puces à ADN de rats de la série U34 (a,b et c) de Affimetrix ont été utilisées (<http://www.affymetrix.com>). Chaque puce (a, b ou c) contenait environ 8700 gènes ou étiquettes de séquences exprimées (EST). L'analyse des micro-puces à été effectuée au Genome Center de Montréal (<http://genome.mcgill.ca/>).

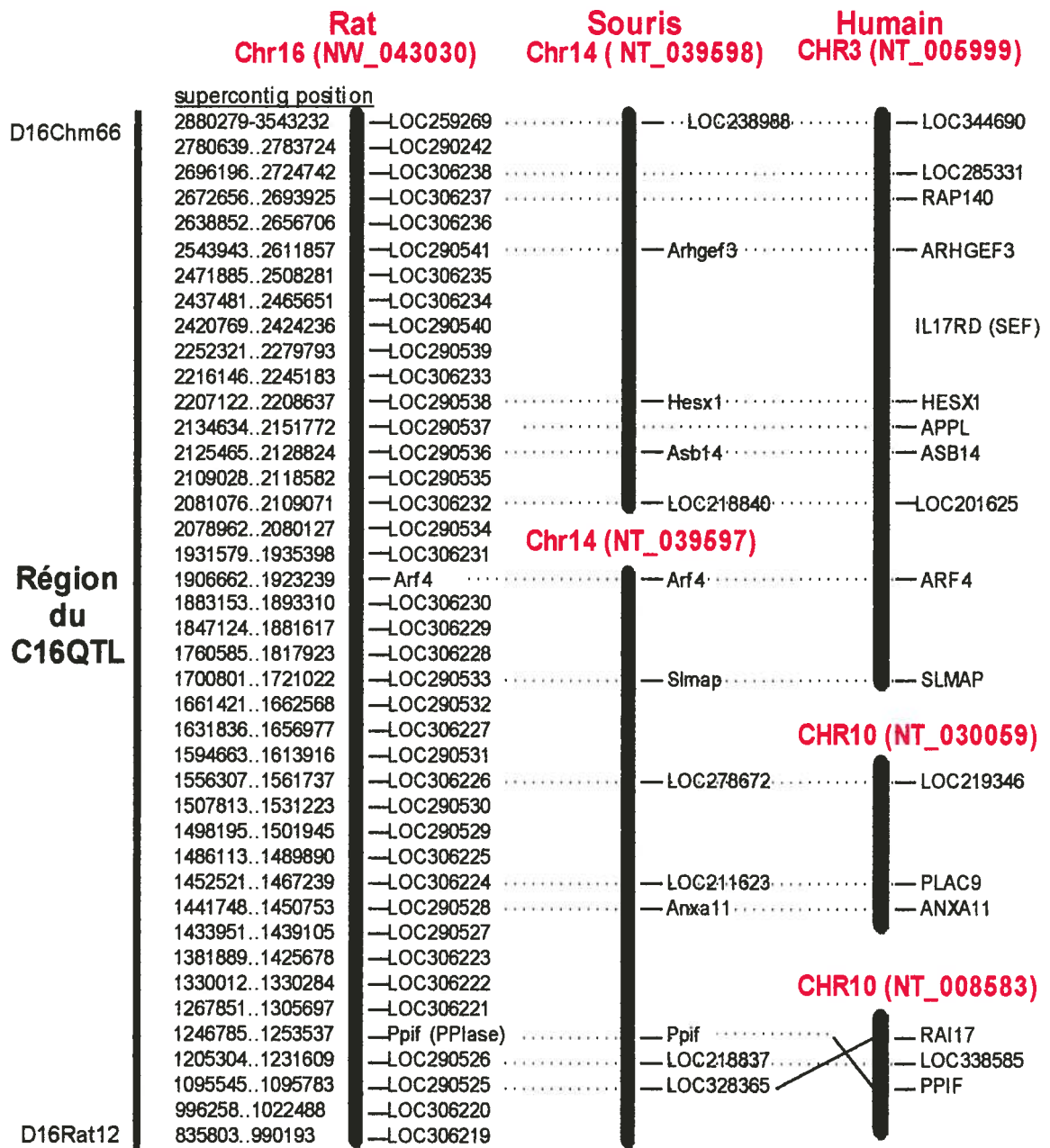


Figure 6. Cartographie comparative du chromosome 16 du rat, pour la souris et l'humain. La barre verticale de gauche représente la région du QTL ainsi que la position des marqueurs flanquants. La première carte à gauche est la carte physique du chromosome 16 du rat. Les nombres représentent la région en paires de bases (pb) couverte par chacun des gènes ou locus sur le *supercontig*. La carte centrale est une représentation de deux *contigs* du chromosome 14 de la souris. La carte de droite est une représentation de trois *contigs* humain du chromosome 3 et 10. Les gènes ou locus sur ces deux cartes sont les représentatifs et/ou homologues à la fois chez l'humain, la souris et le rat. Toutes les cartes ne présentent que les portions d'intérêt des *contigs*. Toutes les données pour le rat, la souris et l'humain proviennent de www.ncbi.nlm.nih.gov. Voir texte pour désignation des gènes et locus.

Candidats. Pour le chromosome 16, les gènes et EST différentiellement exprimés (d'un facteur d'un minimum de 2.5 fois) entre S et C10S.L/C16S.L2 ainsi que S et LEW ont été localisés sur la carte physique à la figure 4 par une combinaison de ces méthodes *in silico*: <http://ratest.eng.uiowa.edu/cgi-bin/database/search>, <http://rgd.mcgw.edu/RHMAPSERVER/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Les gènes ou EST étant exprimés différentiellement entre LEW et C10S.L/C16S.L2 en addition ont été éliminés pour non-validité. Un seul EST correspondait à ces critères et uniquement pour S versus LEW (hors de la région du congénique C16S.L2) soit le EST du cluster Rn.13534.

A.5.4 Séquençage du gène candidat Arf4

Le séquençage du gène du facteur 4 de ribosylation de l'ADP (*Arf4*) a été effectué par le service de séquençage du laboratoire d'immunogénétique du CHUM¹. Une analyse de la séquence de l'ADN complémentaire (ADN) de S et LEW a été effectuée par différents blocs correspondant chacun à un exon. Rapidement, des amorces ont été créées dans la région flanquante de chaque exon puis amplifiées par PCR à partir des extraits d'ADN utilisés pour le génotype. Les séquences ont été alignées ensemble (S et LEW) ainsi qu'avec la séquence *ARF4* de NCBI disponible sur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) à l'aide d'un logiciel disponible en ligne (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>). L'alignement n'a démontré aucune différence au niveau de la séquence.

¹ Service de séquençage, Centre de recherche du CHUM, Campus Notre-Dame, Laboratoire d'immunogénétique, Pavillon Mailloux, M4211-L4, 1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, H2L 4M6, courriel: julie.lacaille.chum@ssss.gouv.qc.ca

Volet B : Résultats pour l'étude du chromosome 17

B.5.1 Construction des congéniques et études de PA

La stratégie de sélection d'un rat BC idéal à chaque génération est la même que pour la publication. La construction des congéniques s'est effectuée en sept BC au lieu de huit comme utilisé conventionnellement (86) grâce à la méthode de congénique rapide. Un total de quatre souches congéniques (C17S.LA, C17S.LB, C17S.LC et C17S.L.D) ont servi à la définition de la cartographie du QTL (**Figure 7**). La souche C17S.LA et C17S.LB réfèrent respectivement à la souche congénique S.LEW- D17Rat51/D17Rat84 et S.LEW-D17Rat51/D17Chm14. La souche C17S.LC et C17S.LD réfèrent respectivement à la souche congénique S.LEW- D17Chm17/D17Rat124 et S.LEW-D17Chm2/D17Rat84. S réfère à la souche *Dahl Salt-Sensitive* (S).

Toutes les mesures de pression sanguine ont été évaluées, incluant la pression artérielle moyenne (MAP), pression artérielle diastolique (DAP) ainsi que la pression artérielle systolique (SAP) (**Figure 8**). Chaque point sur le graphique représente une moyenne de lecture de donnée de 24 h à partir d'une moyenne des valeurs de 4 h pour tous les points de données recueillis dans ces périodes de temps. Le résumé des statistiques de PA des souches apparaît au bas de la figure 7, seule la MAP a été résumée, la DAP et SAP étant consistantes avec la MAP. Les différences de pression sanguine entre les rats S et LEW apparaissent dans la publication du chapitre 4.

Cartographie d'un QTL pour la PA. Les souches congéniques ont été comparées entre elles dans la grandeur de leurs remplacements chromosomiques ainsi que les effets sur la PA. La région contenant le QTL peut être localisée au segment partagé par des souches de rats congéniques démontrant une baisse significative dans les pressions sanguines excluant les régions couvertes par les souches congéniques ne démontrant aucune baisse de pression sanguine significative (figure 7). La cartographie du QTL est soutenue par un survol cartographique physique.

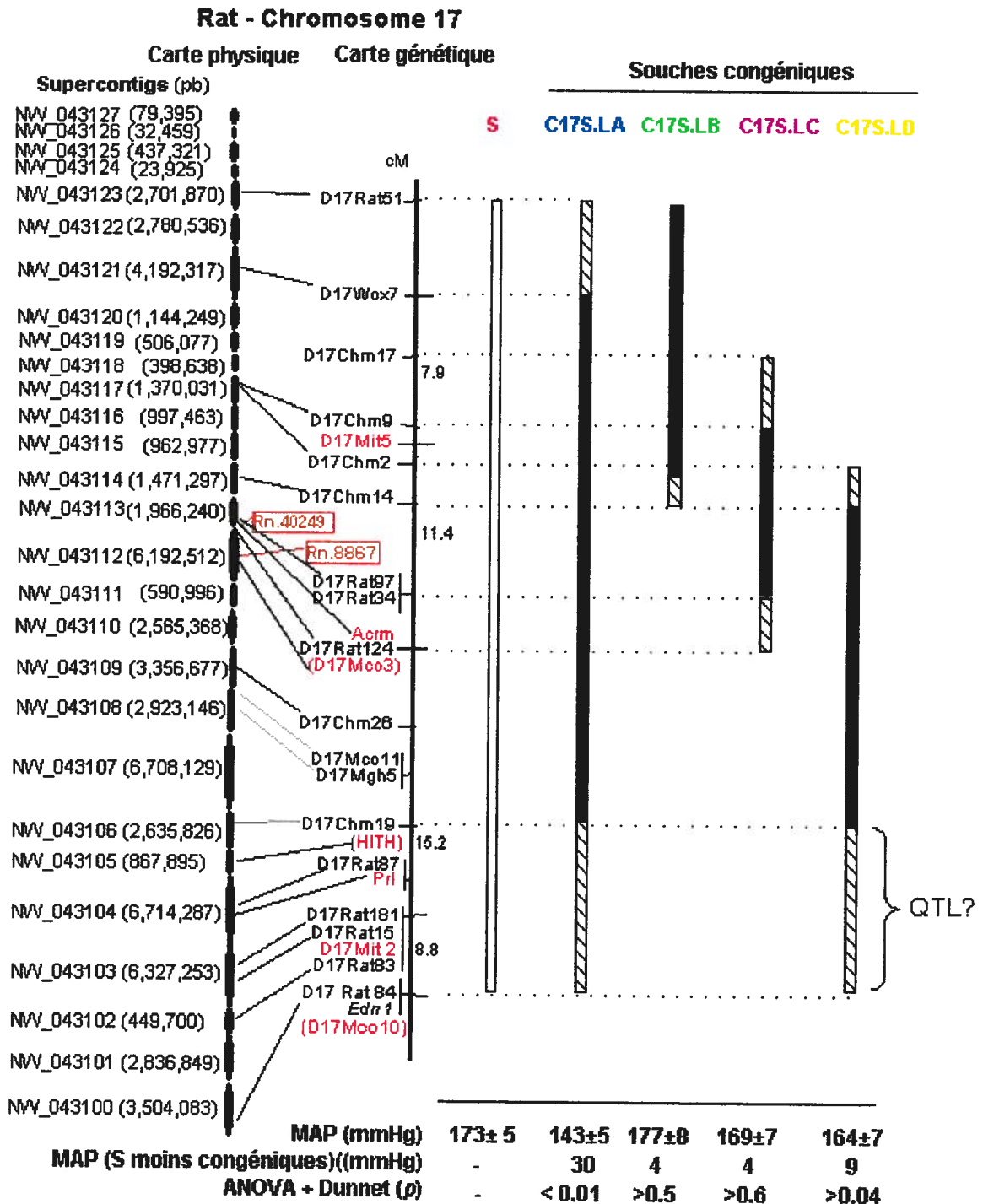


Figure 7. Cartographie du QTL du chromosome 17. Les nombres présentés à droite de la carte sont en unités centimorgan (cM). L'ordre de certains loci de marqueurs indiqués en rouge sur la carte a initialement été déterminé par liaison utilisant le programme MAPMAKER, vérifié par la suite par recombinaison génétique sur les souches congéniques et approuvé (sauf pour les marqueurs entre parenthèses) par placement des séquences sur les *supercontigs* (dont la taille en paires de bases (pb) est montrée entre parenthèses) provenant de www.ncbi.nlm.nih.gov. Les barres solides symbolisent

les fragments S qui ont été remplacés par ceux du rat LEW pour tous les marqueurs listés à ces positions correspondantes. Les barres non remplies indiquent les régions d'ambiguïté de recombinaisons entre les marqueurs. Les jonctions entre les barres solides et non remplies ainsi que la fin des régions d'intérêts du chromosome sont associées à leurs marqueurs respectifs en pointillés. Les marqueurs non associés à un pointillé présentaient un génotype incertain. Les marqueurs sont anonymes ((1;57); <http://waldo.wi.mit.edu/rat/public/>; http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/ et tableau IV). MAP réfère à la pression artérielle moyenne durant la période de mesure pour chaque souche. Finalement, p représente l'ANOVA et la correction Dunnet comparent les MAP entre S et les trois souches congéniques. Rn.40249 et Rn.8867 représentent les candidats des micro-puces à ADN et leurs positions correspondantes sur la carte physique. Voir texte pour désignation des souches.

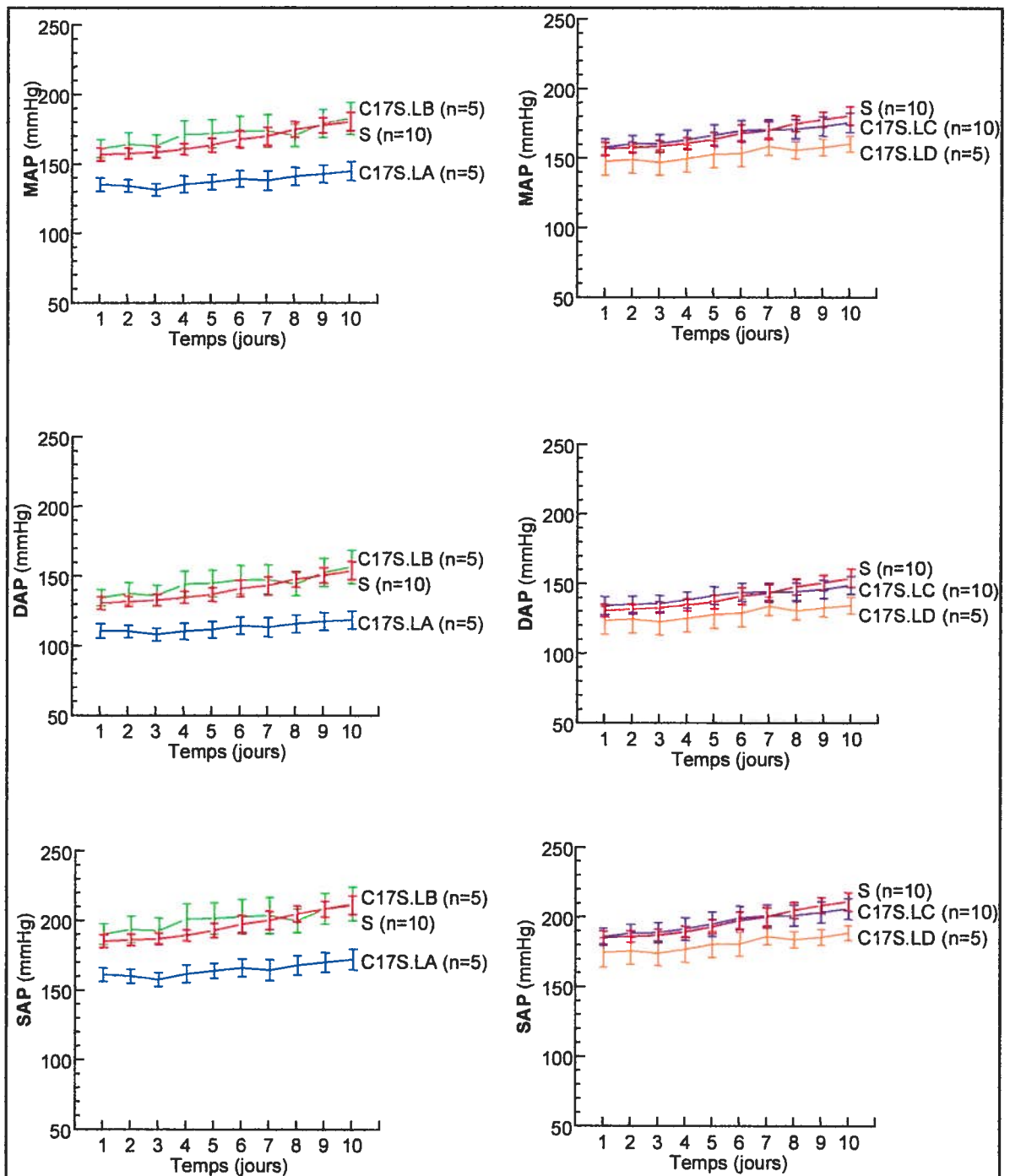


Figure 8. Comparaisons des composantes de la pression artérielle (PA) entre les souches congéniques et S du chromosome 17. En bleu C17S.LA (n=5), en vert C17S.LB (n=5), en mauve C17S.L.C (n=10), en orange C17S.LD (n=10) et en rouge S (n=10). La pression artérielle moyenne (MAP), la pression artérielle diastolique (DAP) ainsi que la pression artérielle systolique (SAP) étaient significative entre S et C17S.L.A ($p < 0.01$) et non significative entre les souches C17S.LB et S ($p > 0.5$), entre C17S.LC et S ($p > 0.6$) ainsi qu'entre C17S.LD et S ($p > 0.04$). Chaque point sur le graphique représente une moyenne lecture de 24 h. Tous les nombres sur l'axe verticale sont en millimètre de mercure (mmHg). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

B.5.2 Gènes candidats des micro-puces à ADN

Les démarches expérimentales pour les rats, la préparation de l'ARN et l'analyse des micro-puces à ADN est la même que pour le chromosome 16.

Candidats. Les gènes et EST retenus étaient ceux différentiellement exprimés d'un facteur minimum de 2.5 fois entre S et LEW ainsi qu'entre C10SL/C16S.L2 et LEW. Les candidats pour le chromosome 17 ont été disposés à leurs emplacements respectifs sur la cartographie physique de la figure 7 en suivant la même démarche que pour le chromosome 16.

PARTIE III

**DISCUSSION, CRITIQUES
ET PERSPECTIVES**

CHAPITRE 6

L'étude de l'hypertension chez le rat

6.1 Choix des souches de rat pour l'étude de l'hypertension

La souche de rat S était disponible au laboratoire au commencement. Ce rat est couramment utilisé dans l'étude de l'hypertension. Il possède l'avantage, lorsque soumis à une diète riche en sel, de développer rapidement une haute PA constante et aisément contrastante avec un rat normotendu. Ainsi, il a fallu faire le choix de la souche contrastante normotendue LEW qui était également disponible. Contrairement à la souche R, d'autres souches normotendues comme LEW présentent un plus grand polymorphisme et révèlent également plus de QTL pour la PA qu'un contraste que R et S peut révéler (voir tableau II). Ne pas prendre le R comme contrôle du S n'empêche rien puisqu'une combinaison avec différentes souches normotendues peut quand même démontrer l'existence d'un QTL (le même ou un nouveau).

La souche LEW est une souche de choix comme donneur pour la souche S. Le polymorphisme des marqueurs est évalué à 50% entre le rat S et le rat LEW (54). Cette différence facilite une cartographie soutenue par une grande densité de marqueurs. Finalement, les études précédentes de liaison génétique de Garrett et al.(57) du rat S utilisant comme contraste le rat LEW sont disponibles et ont servi de point de départ pour ce projet. Le but spécifique de l'analyse génétique est donc d'identifier la région du QTL puis éventuellement des gènes candidats pouvant intervenir dans la régulation de la PA dans le rat S contrasté par le rat LEW pour le chromosome 16 tout comme le chromosome 17.

Il faut cependant souligner que l'utilisation du rat S ne permet pas de faire la dissection d'une PA liée directement à la consommation de sel. Il faut toujours tenir compte du fait que nous ciblons simultanément des QTL qui ont une réponse particulière au sel, en plus de l'hypertension spontanée.

6.2 Délimitation génétique

Marqueurs microsatellites. Lorsqu'ils sont disponibles, l'usage de marqueurs connus retrouvés sur les bases de données Internet ou publications importantes est une source de choix pour la cartographie car elle permet une bonne intégration des différentes études et avancements effectués pour le chromosome correspondant.

Panneaux somatiques d'hybrides de radiation (RH). La méthode d'hybride de radiations possède l'avantage principal de ne pas nécessiter de polymorphisme entre les souches pour les marqueurs. Cette méthode était particulièrement utile lorsqu'un marqueur particulier devait être localisé sur la carte génétique préétablie (par exemple, un marqueur de gène ou un marqueur déjà recensé dans la littérature). Cette méthode a permis d'évaluer les distances de certaines régions d'intérêt en particulier lorsque aucune autre information de distance cartographique n'était disponible. Suite à l'entrée en lice de *supercontigs* de taille connue qui permet de placer les marqueurs en ordre, il n'a plus été prioritaire de s'appuyer sur cette technologie.

6.3 Analyse de populations par liaison génétique

Puisque le concept global du projet porte sur des approches strictement génétiques de localisation de gène, les études de liaisons intéressantes pour notre projet sont celles qui ne sont pas ciblées à partir d'un candidat préétabli. Les publications proposant les QTL des chromosome 16 et 17 proviennent conséquemment principalement d'études utilisant la stratégie globale de liaison génétique par délimitation génomique.

6.4 Souches de rats congéniques

Lignées congénique et sous-lignées congéniques. Pour chacun des chromosomes des lignées congéniques et sous lignées congéniques adéquates ont été développées.

Croisements retour et stratégie congénique rapide. La quantité de croisements retour effectuée pour les deux chromosomes étudiés dépasse celle requise par la stratégie congénique accélérée (voir section de résultats de la publication scientifique et du chromosome 17) . De plus, un nombre respectable de marqueurs a été maintenu tout au long du suivi du génotype des rats selon la stratégie congénique rapide (Table 1, chapitre 4). Finalement, la fabrication de sous-lignées congéniques favorise aussi l'uniformisation de l'arrière plan génomique par accroissement du nombre de croisements du congénique avec la souche S.

Choix des marqueurs. Une étape essentielle lors de la construction des congéniques a été de maintenir la région cible hétérozygote. Plus la distance entre les marqueurs servant au suivi génétique est éloignée, plus la chance d'obtenir des événements de recombinaison-double entre les deux marqueurs est grande. La figure 4 et 7 démontre une distribution continue des marqueurs le long des régions d'intérêts.

6.5 Analyses physiologiques

Mesures de la PA. La mesure de la pression artérielle, soit la pression systolique, diastolique et moyenne sont des mesures physiologiques essentielles aux analyses génétiques. Elles permettent de dresser un pont direct entre la qualité de quantitativité de l'hypertension et la validation d'utilisation d'un outil génétique puissant afin d'en démêler les composantes innombrables.

Les trois principales méthodes de prises de la pression artérielle chez le rat possèdent des avantages et désavantages. Le Tableau III résume les avantages et désavantages des deux méthodes d'intérêt. Il semble que la prise de PA par resserrement de la queue est plus adéquate lorsque utilisée comme outil initial pour une délimitation général des différences de PA. Elle permettrait de déterminer grossièrement les chromosomes susceptibles de contenir un QTL pour la PA et semble plus appropriée pour la liaison génétique qui requiert un large support

technique. Cette méthode induit cependant un stress imposé par l'immobilisation physique de l'animal qui réduit la précision des mesures (changement de PA de moins de 10 mmHg difficiles à détecter).

Puisque la télémétrie une mesure plus directe, cette méthode semble plus adéquate pour tenir compte des composantes qui peuvent être additives et affectant normalement la pression sanguine comme les variations diurnes ou les petits changements de PA. Cette méthode demeure « invasive », i.e. elle exige une insertion matérielle dans l'animal. L'espace occupé par l'implant télémétrique (**Figure 9**) peut éventuellement affecter les organes avoisinants. Cette méthode présente toutefois généralement moins de sources d'erreurs que la prise de la PA par resserrement de la queue et s'applique mieux à l'utilisation de souches congéniques. En effet, la quantité de rats exigée pour une étude de liaison génétique est incompatible avec l'utilisation de la télémétrie notamment en raison du support technique exigé.

Tableau III. Tableau de deux des trois principales méthodes de prises de la PA chez le rat ainsi que leurs avantages et leurs désavantages d'utilisation.

Méthode	Avantages	Désavantages
Resserrement de la queue	<ul style="list-style-type: none"> • Non « invasive » • Non dispendieux • Rapide pour la mesure de SAP 	<ul style="list-style-type: none"> • Stress imposé par l'immobilisation physique • Mesures de PA indirectes • Mesures de DAP et MAP non fiables • Vasoconstriction • Aucune mesures à long terme • Induction d'un réchauffement chez l'animal • Moins précis, changements de PA de moins de 10 mmHg difficiles à détecter.
Télémétrie	<ul style="list-style-type: none"> • Précis pour SAP, DAP et MAP • Mesures de PA directes • Mesure continue, chronique et à long terme 	<ul style="list-style-type: none"> • Très dispendieux à l'achat, les mesures et le maintien de l'équipement • « Invasive »

Tableau III – p.63 - Note. adapté de Deng A.Y. (1)

En télémétrie, lorsque possible, les mesures de la PA sont effectuées sur différentes portées de la même souche à l'intérieur d'une même vague d'implantation. Le cas échéant ou si la souche est importante, ces mêmes mesures sont effectuées sur plusieurs vagues d'implantations différentes. Les résultats sont alors regroupés ensemble et restreignent les variations dues à la télémétrie et/ou aux facteurs environnementaux/génétiques de la souche mesurée.



Figure 9. Implant de télémétrie et cathéter de Data Sciences Inc.

Mesure d'hypertrophies cardiaques et rénales. Les QTL pour la PA sont presque toujours essentiellement associés avec un effet sur le poids du cœur par une hypertrophie cardiaque en réponse à une PA qui augmente de façon chronique. Il est cependant difficile d'éliminer la possibilité que des loci pour l'hypertrophie cardiaque puissent exister de façon indépendante de la PA et ségréguer avec des QTL pour la PA lors de la formation des congéniques (142). Il est possible que des QTL pour la PA soient également associés à des dommages rénaux ou anomalies rénales. Toutefois, l'implantation des sondes de télémétrie a lieu dans la cavité abdominale du rat. Il est donc possible que cette mesure d'installation influence les résultats des mesures d'hypertrophies rénales en raison de sa proximité physique avec le rein (**Figure 10**). En effet, ce dispositif réduit l'espace naturel que dispose chaque organe avoisinant.

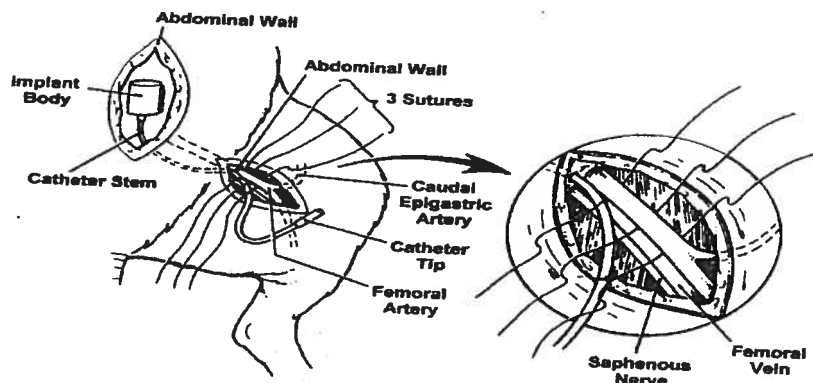


Figure 10. Schéma explicatif de l'implantation d'une sonde de télémétrie de Data Sciences International. Emprunté de *telemetry information guide* (143). Le corps de l'implant (implant body) se situe dans la cavité du mur abdominal (abdominal wall). Caudal Epigastric Artery réfère à l'artère épigastrique caudale; Femoral Artery et Femoral Vein, artère fémorale et veine fémorale; Saphenous Nerve, nerf saphène; Catheter Stem et Catheter Tip, cathéter stem et embout du cathéter.

Ces mesures demeurent donc toutes suggestives quant au lien possible entre l'hypertrophie des organes et les baisses de PA des congéniques comparé au témoin S. La seule conclusion possible est donc la démonstration d'une corrélation ou une absente de corrélation. De plus, bien qu'un nombre restreint de rats est suffisant pour valider les mesures télémétriques, cette même quantité de rat soumis au sacrifice subséquent est minime lorsqu'il s'agit d'effectuer des mesures de poids et longueurs (**Figure 11**), les capacités statistiques sont moins puissantes.

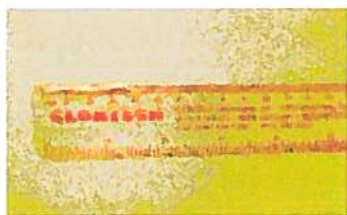


Figure 11. Mesure de la longueur d'une aorte de rat à l'aide d'une règle graduée

Influence de l'âge des rats. Pour la liaison génétique, la plupart des analyses ont été effectuées chez des animaux adultes car la PA augmente avec l'âge et le développement, ainsi, le phénotype est entièrement exprimé. Puisque la méthode utilisée pour ce projet est très dispendieuse, aucune étude n'a été portée sur la variation de la PA pendant la croissance. Dans le cadre de ce projet, les composantes développementales sur la PA sont ignorées. Les analyses de télémétrie demeurent toujours rigoureuses quant à l'âge des rats (144;145).

Le lien cause à effet concernant les QTL pour la PA ne peut donc pas être démêlé avec les études de liaisons génétiques et congéniques. Néanmoins, les expériences d'expression génique différentielles par micro-puces à ADN ont été effectuées à l'aide de tissus de rats âgés de 5 semaines uniquement. Cette initiative permet de restreindre la liste de candidats impliqués uniquement dans un lien d'effet avec la PA.

L'effet du sexe. La plupart des analyses de liaison génétique ont été effectuées sur des rats mâles. Probablement parce que les mâles développent l'hypertension plus rapidement que les femelles et également en raison des nombreuses hormones féminines pouvant interférer avec les PA obtenues. De plus, les mâles sont physiquement plus larges ce qui facilite la chirurgie d'implantation des sondes télémétriques. Si on choisit d'étudier les deux sexes, cela complique le protocole expérimental, il faut analyser les sexes séparément pour les QTL.

Diète. La prise de sel est imposée à travers la nourriture. Il ne faut donc pas éliminer la possibilité que certains rat mangent plus que d'autres. Pour contrer cette faille, les rats soumis à la télémétrie doivent se trouver dans un intervalle de poids donné(144;145). Cependant, il est possible que certains rats soient plus aptes à prendre du poids avec peu de nourriture, surtout si leurs génotypes sont différents (entre S et un congénique, par exemple). Effectivement, il est possible que le trait qui contrôle la PA affecte aussi la prise de poids de l'animal. D'ailleurs, il existe des cas dans lesquels l'hypertension et le contrôle du poids sont associés par un facteur physiologique indépendant, comme chez les rats génétiquement hypertendus SHR (146).

6.6 Approche statistique

La principale question est de savoir si la différence génétique entre les lignées congéniques et le groupe témoin, soit S, se traduit par une différence au niveau des caractéristiques cardiovasculaires. Puisque la mesure de la PA est un élément clef dans ces études génétique, des statistiques de base permettent de définir les paramètres de chacun des groupes. Les mesures de PA sont effectuées par télémétrie, les mesures sont hautement spécifiques, ce qui rend les analyses statistiques aisées. Pour une souche donnée, les mesures de tendance centrale ainsi que les mesure de dispersion ont été effectuées (ANOVA).

La variante de l'ANOVA, l'ANOVA à mesures répétée nous oblige à nous poser trois questions importantes. La principale interrogation demeure les même i.e. existait-il des différences entre les groupes? Par la suite, il faut se demander si le tracé des moyennes de chacun des groupes change avec le temps. Finalement, il faut s'assurer que le tracé pour chacun des groupes suit la même évolution dans le temps. Le cas échéant, il faut effectuer une ANOVA pour chaque jour. De cette manière, nous avons pu nous apercevoir que la souche S ou les lignées congénique négatives pour la PA affichait une augmentation de PA dans le temps démontrant ainsi leur sensibilité au sel (voir tracé détaillé pour cette fin à la figure 5).

Considération pratiques

Chacunes des étapes énumérant la stratégie de la localisation d'un QTL comporte des facteurs limitant la validité des résultats. Par exemple, des facteurs comme l'influence de l'âge, du sexe et la contribuent à influencent la validité de la stratégie de localisation d'un QTL et sont regroupés sous « facteurs environnementaux ». On retrouvera au chapitre 8 une conclusion critique sur l'ensemble des facteurs interférant avec la stratégie générale employée.

Volet A. Étude du chromosome 16

Délimitation génétique

Lorsque la région d'intérêt devient petite et exige une grande densité de marqueurs, on doit créer des marqueurs domestiques. Des marqueurs domestiques pour le chromosome 16 aident à la cartographie du QTL (**Tableau IV**).

Tableau IV. Nouveaux marqueurs domestiques construits à partir de *supercontigs* du chromosome 16 du rat.

Marqueurs des rats	Supercontig	Séquence des amorces (5' -> 3')	Taille (pb)	Temp (°C)	Condition (P ou A)	Polymorphisme
D16Chm2	NW_043030	agtatgccgtcacaccact gaggaggtgcagacctta	208	50	A	S>L
D16Chm6	NW_043030	tcttcatacaccatccactca gcctttcttctccccata	229	50	A	S>L
D16Chm7	NW_043030	accagctctgtaccagtg gaatgactccatgccaggaa	208	50	A	S<L
D16Chm14	NW_043030	gtttatggctgggggtca gctgtctctgttagccatg	193	60	A	S>L
D16Chm16	NW_043030	gctgtaacaccatgtgagg ctttcatgcaaacgtgacca	181	50	P	S>L
D16Chm23	NW_043030	cacacaagcctccgggtcta tgagaatatggaggcagagg	190	60	A	S>L
D16Chm24	NW_043030	gtttatggctgggggt gctgtctctgttagccatg	193	60	A	S>L
D16Chm25	NW_043030	aggaatggggcctacagttt tggggatggtaggctttag	206	55	A	S>L
D16Chm26	NW_043030	tgcaaagtgcagagtccagt cagggtgttgtgtgttctt	201	60	P	S>L
D16Chm31	NW_043030	aggacttgagggcatttga cctctaacctccgcacacat	205	55	A	S<L
D16Chm32	NW_043030	tggttggctcaccagtaat ggcttccatcctagtctc	217	50	A	S>L
D16Chm33	NW_043030	ccaggagtgagtgggaaaag tgaaaacaaggcagttgcag	198	55	A	S>L
D16Chm34	NW_043030	tcataacgcagccatttga ggcgcttttcatagcaaat	189	50	P	S>L
D16Chm36	NW_043030	cacggaggccaatagaagat cccagacaaggaaatgtctca	216	55	A	S>L
D16Chm37	NW_043030	cctagccctctctgatgtgg ggataggccctcattctgt	201	55	A	S>L

Tableau IV. (suite)						
Marqueurs des rats	<i>Supercontig</i>	Séquence des amorces (5' -> 3')	Taille (pb)	Temp (°C)	Condition (P ou A)	Polymorphisme
D16Chm42	NW_043030	ggttcgggttctgaccact aaggagaccagggttataaaa	199	50	A	S<L
D16Chm43	NW_043030	aacatttggtcccaagaga gtcaccctggcatgaaagt	200	55	A	S>L
D16Chm49	NW_043030	ggcceaagggtgaagaaag cgggctctgttctctgtgt	213	45	A	S<L
D16Chm54	NW_043030	ttctgagcctgtgaagcaga cagaaacagggcagcctaag	201	50	A	S<L
D16Chm58	NW_043030	ccagcctgctctacacactg ctcagacaccatctgggaca	199	55	A	S<L
D16Chm60	NW_043030	catggattaaatggtcccagt tcggctatctgcccgtctg	261	50	A	S>L
D16Chm61	NW_043030	agcagtaatgtgcgggactc atgcttagacaccgcgagat	190	50	A	S<L
D16Chm63	NW_043030	gaccagcccacttttatga gtgcttggtttgagaattg	238	50	A	S<L
D16Chm64	NW_043030	accacagatgccaccagttt accactcagtaacctca	250	50	A	S>L
D16Chm66	NW_043030	actgggaggagagactggt tcccagatgatggcctttta	238	50	A	S>L

Tableau IV – p.68-69 - Note. La position des marqueurs polymorphiques d'intérêt est disponible à la Figure 4. La désignation Temp fait référence à la température d'utilisation des marqueurs. Le polymorphisme fait référence au type de polymorphisme observé entre les souches en fonction de la taille. La condition réfère au type d'électrophorèse effectué soit agarose (A) ou polyacrylamide (P). Certaines séquences des marqueurs proviennent originellement de séquences de BAC remplacés aujourd'hui par le *supercontig* NW_043030 dont la séquence est disponible au site de NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> et la création des amorces au http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi.

Liaison génétique

Une étude de liaison génétique pour la PA (population F2 de rat S X LEW) a précédemment été effectuée (57) et indiquait un *score lod* suggestif d'environ 2.3. La région du QTL se situait entre le marqueurs D16Wox1 et le marqueur D16Mit2. Cette étude a servi de point de départ pour la recherche de QTL pour ce chromosome. Une

autre étude de liaison génétique pour une population F2 (*Spontaneously hypertensive rat* (SHR) X *Brown-Norway* (BN)) a suggéré l'existence d'un QTL pour la PA entre les marqueurs D16Mit2 et D16Mit5 (147). Dans cette étude, le *score lod* atteint son maximum à mi-chemin entre ses deux marqueurs, soit 4.3. De plus, les auteurs ont suggéré que ce QTL est récessif, i.e. que la variation de PA n'est significative que lorsque les deux allèles du QTL, permissives pour la PA, sont présents. Ainsi, c'est seulement lorsque le marqueur D16Mit2 affichait un génotype homozygote correspondant au rat SHR qu'une variation de PA était observée par rapport au génotype homozygote BN. Lorsque D16Mit2 étaient hétérozygote SHR et BN, aucune variation de la PA n'a été noté par rapport au génotype homozygote BN. Voir **Figure 12** pour résumé des résultats de ces deux études.

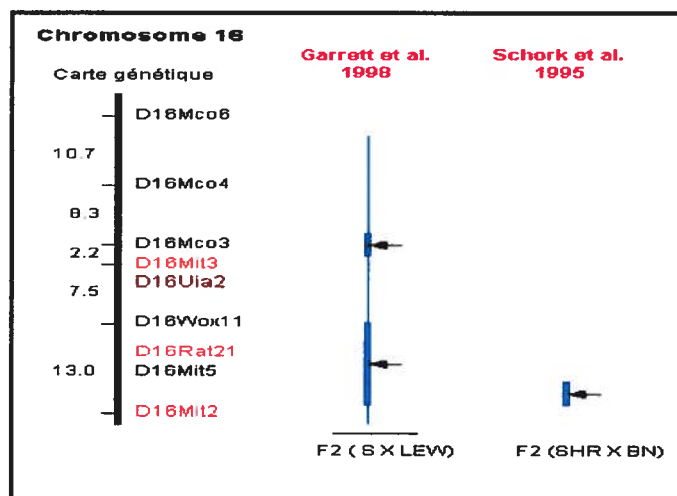


Figure 12. Carte génétique du chromosome 16 et localisation du QTL pour la PA provenant de deux études indépendantes de liaison génétique. Les tracés de *score lod* ainsi que leurs emplacements sont adaptés de Garrett et al.(57) ainsi que Schork et al. (148). Les nombres indiqués à gauche de la carte génétique indiquent les distances en unités centimorgan (cM). Les marqueurs indiqués en rouges sont ceux retrouvés à la Figure 4. Les lignes minces en bleu représentent un signal d'environ une unité de *lod*, les lignes grasses bleues un signal de 2 unités de *score lod* ou plus et les flèches indiquent l'emplacement auquel le *lod* atteint son maximum. Pour l'étude de Schork et al, seul le *score lod* maximum était disponible. L'étude de liaison génétique a été effectuée sur une population mâles F2 de la souche *Dahl Salt-Sensitive* (S) croisée avec la souche *Lewis* (LEW) ou une population F2 de la souche *Spontaneously hypertensive rat* (SHR) croisée avec la souche *Brown Norway* (BN).

Souches congéniques

Localisation du QTL. La Figure 1 de l'article présente les souches S.L1 et S.L2(C16S.L2) ainsi que la localisation du QTL à la région inférieure du chromosome 16 couverte par la souche S.L2(C16S.L2). Plusieurs rats ou souches s'ajoutent afin de raffiner la localisation du QTL, soit trois rats pour S.L.2 (C16S.L2), et les souches C16S.L3 et C16S.L4, présentés à la figure 4 et 5 de la section de résultats additionnels. Le QTL se situe entre les souches C16S.L3 et C16S.L4, dans leurs régions d'ambiguïtés correspondantes. La région d'intérêt est couverte par deux congéniques positifs soit S.L.1 et S.L.2(C16S.L2). L'existence de plus d'une souche positive pour la différence de PA permet d'assurer la reproductibilité du QTL. Ces deux souches congéniques servent également de contrôles négatifs pour l'implication possible de l'arrière plan génomique sur la PA. La **Figure 13** démontre la localisation du QTL illustrée ainsi que toutes les souches congéniques rassemblées sur la même carte génétique. Ce diagramme simplifié permet de mettre en emphase la stratégie de substitution chromosomique employée pour réduire la grandeur des régions cibles.

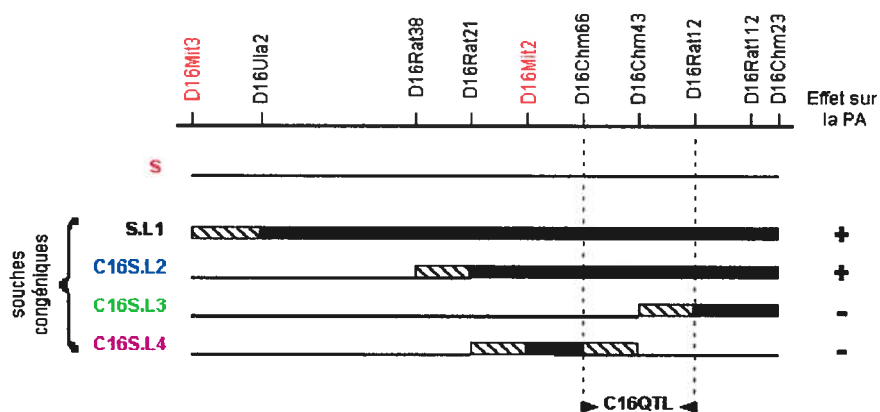


Figure 13. Diagramme démontrant la stratégie de substitution pour la cartographie du QTL pour la PA du chromosome 16 avec l'utilisation des souches congéniques. Les barres solides symbolisent les fragments chromosomiques S qui ont été remplacés par ceux du rat LEW entre tous les marqueurs des extrémités aux positions correspondantes. Les jonctions des marqueurs des extrémités entre les barres remplies et les barres non remplies sont homozygotes LEW. Les barres non remplies indiquent les régions d'ambiguïté de recombinaison entre les marqueurs. Les jonctions des

marqueurs des extrémités entre les barres non remplies et S sont homozygotes S. Finalement, les lignes fines représentent les régions homozygotes S. L'effet sur la PA indique si une différence de PA (+ si positif et - si négative) a été détectée entre la souche congénique et la souche parentale S (indiquée par S en rouge). La région comprise entre les deux pointillés indique la région du QTL. Voir figure 1 de la publication scientifique et Figure 4 et pour désignation des souches et origines des marqueurs. Les marqueurs indiqués en rouge réfèrent à ceux retrouvés pour la liaison génétique de la Figure 12.

La région du QTL est couverte par une distance maximale d'environ 2.16 Mb et peut ainsi être représentée à l'aide d'une cartographie physique (voir Figure 4). Il est difficile d'obtenir davantage d'événements de recombinaison en raison de la quantité de rats qui seraient alors exigés. Il est dommage que la région du QTL soit déduite en fonction des lignées congéniques négatives plutôt que par les résultats positifs d'un seul congénique comprenant cette courte région d'intérêt. Toutefois, puisque la région d'intérêt est petite, l'avancement de l'étude de ce chromosome serait maintenant avantagée par la recherche de gènes candidats.

Implication du télomère. Chez les humains et autres mammifères, les télomères comprennent une séquence TTAGGG en tandem répétitive (149-151). Leurs fonctions, pas encore complètement comprises, impliquent la stabilisation de l'extrémité des chromosomes et la protection des gènes localisés dans les régions subtélomériques. Ces régions subtélomériques sont riches en gènes vitaux pour les fonctions cellulaires et pourraient impliquer la régulation de la PA. Ce point a été soulevé dans la publication. La seule différence entre la lignée C16S.L2 et le rat S est la courte région à l'extrémité du chromosome ainsi que le télomère. La différence de PA entre C16S.L2 et S est significative. La lignée C16S.L3 contient également une région à l'extrémité du chromosome et le télomère. La différence de PA avec la souche S est quant à elle non significative. Du point de vue, la différence de PA ne peut pas être directement attribuable au télomère en tant que tel.

QTL supplémentaires. La démonstration du principe de substitution de la Figure 13 ne nous permet pas d'exclure la région comprise en D16Mit3 et D16Rat38 comme pouvant contenir un QTL additionnel pour le chromosome 16. Toutefois, comme le mentionne la publication, la différence de PA entre la souche S.L.1 et S.L.2 n'est pas significative. Il ne serait cependant pas impossible qu'un ou plusieurs QTL pour la PA se situe dans cette région. Il faudrait créer une souche congénique ne recoupant pas C16S.L2 (ou S.L2) pour s'en assurer. Il serait hypothétiquement possible que la région couverte par C16S.L2 masque la présence d'un ou plusieurs QTL potentiels. En effet, il a été suggéré (*score lod* d'environ 2) qu'un autre QTL pour PA se situe dans la région médiane du chromosome suivant les travaux de liaison génétique effectués par Garrett et al.(57) (voir Figure 12). Aucun congénique n'est disponible pour effectuer l'analyse de ce dernier QTL potentiel pour le moment.

Utilisations des souches congéniques: interaction chromosome 16 et 10. Les souches de départ du chromosome 16 proviennent d'une souche mère possédant également le chromosome 10. Notamment, la souche C16S.L2 du chromosome 16 qui est jumelée avec différentes souches du chromosome 10 (**Figure 14**). Les souches congéniques représentées sont C10S.L9 (S.LEW-D10M11Mit119/D10Rat27), C10S.L.6 (S.LEW-D10Rat204/ D10Mgh1), C16S.L2 (S.LEW-D16Rat21-D16Rat112) et les souches congénique doubles sont S.LEW- D10M11Mit119/D10Rat27- D16Rat21-D16Rat112 et S.LEW- D10Rat204/D10Mgh1- D16Rat21-D16Rat112. Plusieurs analyses d'interactions sont en cours s'effectuent présentement sur ces souches.

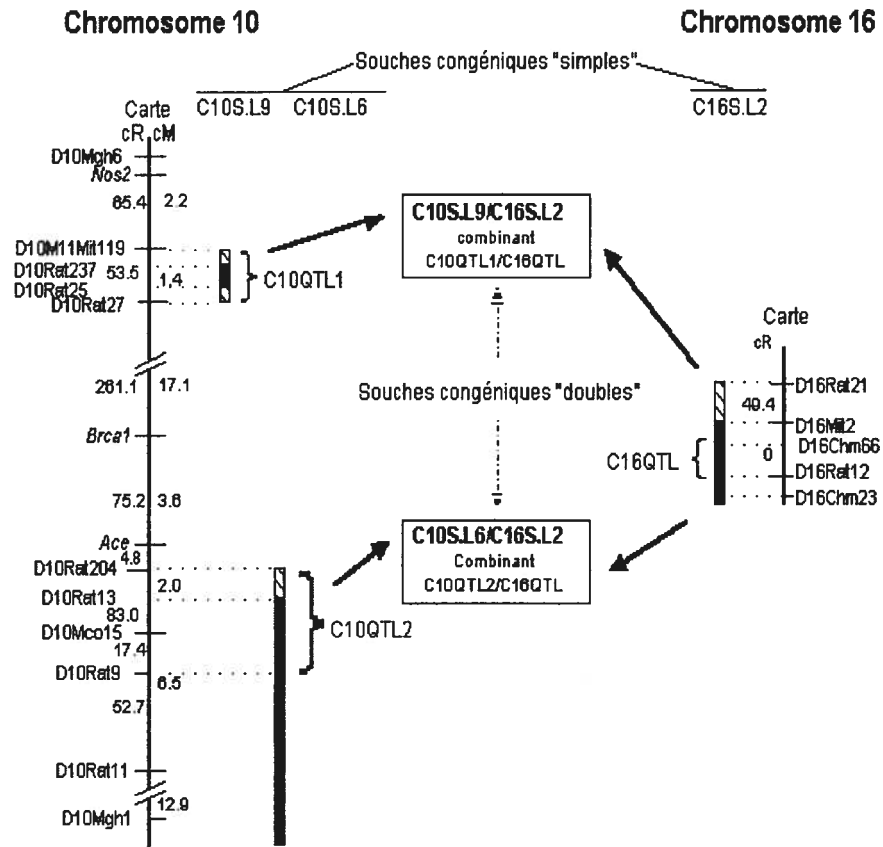


Figure 14. Construction de combinaisons de souches congéniques du chromosome 10 et 16. La localisation des deux QTL (des souches C10S.L9 et C10S.L6) du chromosome 10 a été obtenue par Palijan et al(152). La souche C16S.L.2 ainsi que la localisation du QTL ont été simplifiées à partir de la figure 4. La région indiquée par des barres solides ainsi que la jonction est homozygote LEW sur la carte génétique pour tous les marqueurs listés aux positions correspondantes. Les barres non pleines indiquent les régions d'ambiguïté de recombinaison. Les flèches indiquent les origines de combinaison entre les souches. *Ace*, gène de l'enzyme angiotensine-convertible; *Brca1*, gène du cancer du sein; *Nos2*, gène de la forme inducible de la nitrique-oxyde synthase. Les autres marqueurs sur les deux chromosomes sont anonymes ((152) et Figure 4). Voir texte pour désignation des souches.

A6.5 Analyses physiologiques

Mesures de la PA. Puisque l'étude du chromosome 16 est relativement récente, aucune mesure par resserrement de la queue n'a été utilisée pour la localisation d'un

QTL pour la PA mise à part les analyses de liaison génétique de Garrett et al.(57) Toutes les expérimentations de mesures de la PA ont été effectuées par télémétrie concernant les souches S et LEW.

L'ajout de trois rats supplémentaires pour la souche C16S.L2 permet de renforcer la reproductibilité de la télémétrie car les mesures de PA ont été effectuées sur plusieurs portées de rats et à des intervalles de temps différents.

Mesures d'hypertrophie. Les mesures d'hypertrophies portant sur le congénique S.L1 et S.L2 (Figure 3 de l'article scientifique) démontrent une baisse significative de l'hypertrophie cardiaque, aortique et rénale en comparaison au rat S. Ces mesures n'ont pas été effectuées pour les souches congéniques subséquentes et deviendraient superflues étant donné l'imprécision des manipulations et la puissance statistique de telles mesures. De plus, le débat concernant l'hypertrophie ventriculaire gauche et son lien avec la PA demeure en suspend pour le moment. Depuis plusieurs mois, ces mesures ne sont plus effectuées sur les congéniques au laboratoire.

Analyses statistiques

Pour le chromosome 16, la plupart des données ont été analysées par l'ANOVA ou ANOVA à mesures répétées. Par la suite, le test *post hoc* de Dunnett a servi pour la comparaison des souches avec S. Le test de Tukey a été utilisé lors de la comparaison des souches S.L1 et S.L2 afin de déterminer si elles étaient significativement différentes entre elles. Ce test sera très précieux pour les mesures de télémétrie pour les nouvelles souches du chromosome 16 et 10 afin de déterminer s'il existe des interactions entre chromosomes. Le regroupement de souches clefs ensemble sera probablement nécessaire pour ne pas perdre trop de puissance statistique.

Volet B. Étude du chromosome 17

Délimitation génétique

En plus de la grandeur de la région d'intérêt, une autre justification pour la création de marqueurs domestiques réside en l'existence de régions spécifiques très conservées ayant tendance à posséder le même nombre de répétitions microsatellites entre les souches.. Ces régions ont nécessité le test d'un grand nombre de marqueurs avant d'obtenir un marqueur polymorphique et la liste de marqueurs disponibles dans les banques de données s'avérait alors insuffisante. En conséquence, des marqueurs domestiques ont été également créés pour le chromosome 17 (**Tableau V**).

Tableau V. Nouveaux marqueurs domestiques construits à partir de *supercontigs* du chromosome 17 du rat.

Marqueurs de rat	<i>Supercontig</i>	Séquence des amorces (5'→3')	Taille (pb)	Temp (°C)	Condition (P ou A)	Polymorphisme
D17Chm2	NW_043117	gagcaggaactggtctcattg tgccatgacattggctaaaa	221	50	A	S>L
D17Chm9	NW_043117	cagatggtcaatgtgacagga cctctgacttctggcctaca	196	55	A	S>L
D17Chm14	NW_043115	gcagatcaggcaggaggatga caggaggcagaagcatttgt	199	60	A	S<L
D17Chm17	aucun	gtatcagagcccttgcttgg cattacaccgcttctgcac	198	60	A	S<L
D17Chm26	NW_043109	ggtcaacgatgcaaaagaca aagtggtggattaccttgg	241	50	A	S<L

Tableau V – p.76 - Note. La position des marqueurs polymorphiques d'intérêt est disponible à la figure 7. Voir tableau I pour désignation des composantes du tableau. Le marqueur D17Chm17 n'a pas pu être positionné sur un *supercontig*, sa position a été évaluée par recombinaison génétique. Les séquences des marqueurs proviennent de *supercontigs* du chromosome 17 dont les séquences sont disponibles au site de NCBI : [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) et la création des amorces au http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi.

Liaison génétique

Trois études de liaison génétique pour la PA ont été précédemment effectuées (**Figure 15**). L'étude de liaison génétique de Garrett et al.(57) indiquait un signal de liaison génétique pour le chromosome 17 chez des rats mâles entre les marqueurs D17Mco3 et D17Mco10. Le signal pour un QTL a été remarqué précédemment par Deng et al.(61) dans la même région pour les mêmes souches contrastante (F2 (S X LEW)). Encore selon l'étude de Deng et Dene, le signal était cependant absent pour les souches contrastantes S et *Brown Norway* (BN). Une autre étude de liaison génétique effectuée également sur le chromosome 17 avec le modèle de rat sensible au sel Sabra, *Salt-Sensitive Sabra hypertension-prone* (SBH) (avec comme souche contrastante le rat Sabra résistant au sel, souche *Salt-Resistant Sabra hypertension resistant* (SBN)) localisait un signal pour un QTL dans la même région (153). Cette étude portait toutefois sur la spécificité du sexe en fonction de la susceptibilité au sel dans le développement de l'hypertension. Seules les femelles présentaient une co-ségrégation de la région du chromosome 17 avec la PA.

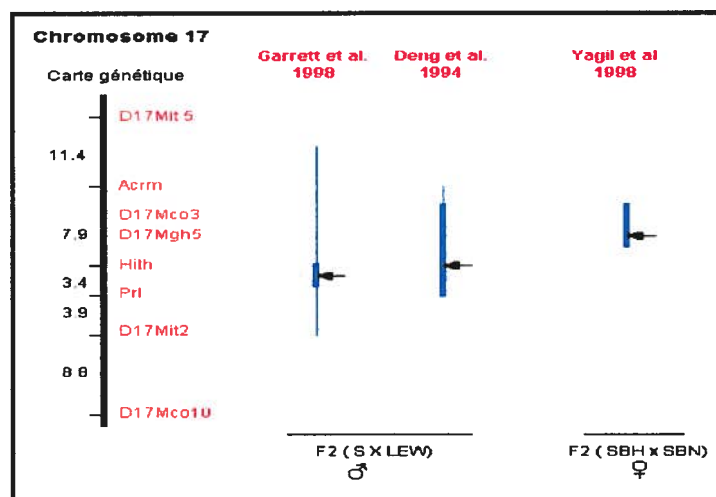


Figure 15. Carte génétique du chromosome 17 et localisation du QTL pour la PA provenant de trois études indépendantes de liaison génétique. Les tracés de *lod* ainsi que leurs emplacements sont adaptés de Garrett et al.(57), Deng et al.(61) et Yagil et al.(153). Les nombres indiqués à gauche de la carte génétique indiquent les distances en unités

centimorgan (cM). Les marqueurs indiqués en rouge sont retrouvés à la figure 7. Les lignes minces en bleu représentent un signal d'environ 1 unité de *lod*, les lignes grasses bleues un signal de 2 unités de *lod* ou plus et les flèches indiquent l'emplacement auquel le *lod* atteint son maximum. L'étude de liaison génétique a été effectuée sur une population mâles F2 de la souche *Dahl Salt-Sensitive* (S) croisée avec la souche Lewis (LEW) et sur une population femelle F2 de mâles de la souche *Salt-Sensitive Sabra hypertension-prone* (SBH) croisée avec des femelles de la souche *Salt-Resistant Sabra hypertension resistant* (SBN).

A priori, ce QTL semblait toutefois être un faux-positif. En effet, en plus de l'étude de liaison génétique, Garrett a procédé à la construction de congéniques avec ces mêmes souches (S et LEW) et la souche obtenue ne produisait aucun changement significatif de la PA comparé à S. La région supérieure n'a toutefois été ciblée qu'avec le marqueur Hith, le seul marqueur disponible au moment de la construction du congénique. Ainsi, comme mentionné par Garrett, puisqu'il est possible que la souche congénique ne couvre pas une suffisamment large section du chromosome 17 en raison de l'indisponibilité des marqueurs génétiques, il est possible que le QTL n'ait pas été ciblé.

En raison de l'inexistence d'une souche congénique ciblant avec certitude la région du QTL démontré par liaison génétique et en raison de l'existence de trois études indépendantes démontrant un signal pour un QTL pour la PA dans une région commune du chromosome 17, il était justifié de poursuivre les investigations. Ces investigations comprennent notamment la construction d'une lignée congénique couvrant une large région du chromosome.

Souches congéniques

Parmi toutes les souches produites, les souches C17S.LA, C17S.LB, C17S.LC et C17S.L.D ont été retenues pour les études de localisation du QTL (Figure 16). Le premier congénique couvrant une large région du chromosome, soit C17S.LA est la

seule souche positive pour l'effet sur la PA. La reproductibilité du QTL reste à déterminer. La sous-lignée couvrant le bas de la région d'intérêt, C17S.LD semble négative pour la PA mais se situe tout juste sur la frontière statistique de négativité. Les deux sous-lignées négatives pour la PA servant en même temps de contrôle négatif pour l'arrière plan génomique sont C17S.LB et C17S.LC. Ces mêmes données sont disponibles à la figure 7 et 8 de la section de résultats.

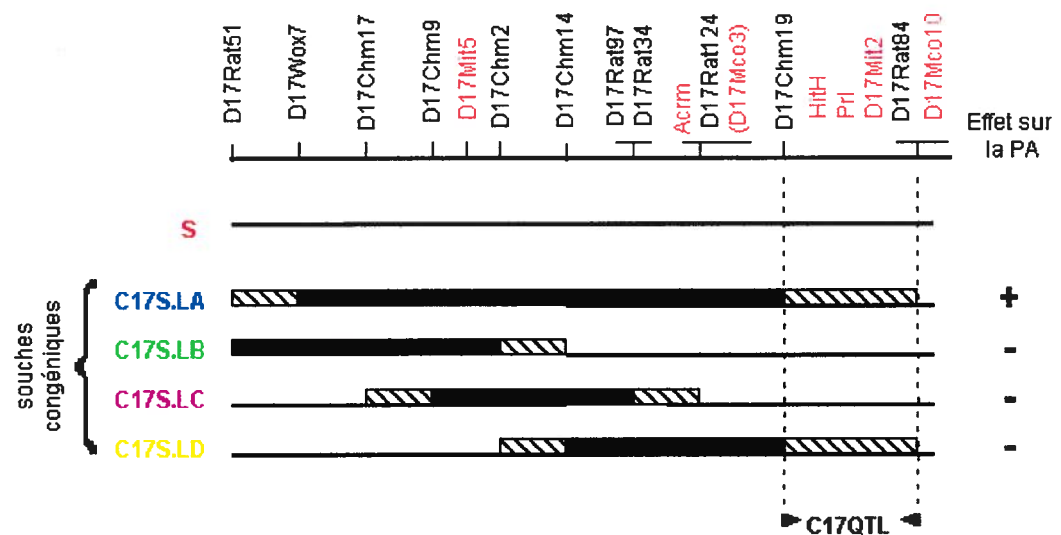


Figure 16. Diagramme démontrant la stratégie de substitution pour la cartographie du QTL pour la PA pour le chromosome 17 avec l'utilisation des souches congéniques. Les barres solides symbolisent les fragments chromosomiques S qui ont été remplacés par ceux du rat LEW entre tous les marqueurs des extrémités aux positions correspondantes. Les jonctions des marqueurs des extrémités entre les barres remplies et les barres non remplies sont homozygote LEW. Les barres non remplies indiquent les régions d'ambiguïté de recombinaison entre les marqueurs. Les jonctions des marqueurs des extrémités entre les barres non remplies et S sont homozygotes S. Finalement, les lignes fines représentent les régions homozygotes S. L'effet sur la PA indique si une différence de PA (+ si positif et - si négative) a été détectée entre la souche congénique et la souche parentale S (indiqué par S en rouge). La région comprise entre les deux pointillés indique la région du QTL. Voir Figure 7 des résultats additionnels pour désignation des souches et origines des marqueurs. Les marqueurs indiqués en rouge réfèrent à ceux retrouvés pour la liaison génétique (Figure 9).

Localisation du QTL. Tout d'abord, la souche C17S.LA prouve l'existence d'au moins un QTL pour le chromosome 17 et le signal obtenu en liaison génétique n'est pas un faux positif. Malgré l'aide cette souche principale, la localisation du QTL demeure nébuleuse. En effet, selon des études de congéniques effectuées par Garrett et al(57), le QTL devrait se trouver dans la région supérieure du chromosome (au-dessus du marqueur D17Mco3) alors qu'il semble plus bas.

Les souches négatives pour la PA C17S.LB et C17S.LC semblent éliminer la possibilité d'un QTL pour la région supérieure du alors que la souche C17S.LD pour la région médiane du chromosome. Le QTL se trouverait donc dans la région non chevauchante entre la souche C17S.LA et C17S.LD (comprise entre D17Chm19 et D17Rat84). Logiquement, puisque la sous-lignée C17S.LD découle directement de la souche C17S.LA, celle-ci ne devrait pas posséder de région non chevauchante. Il est donc intéressant d'analyser de plus près cette région ambiguë partagée par la souche C17S.LA et C17S.LD.

Région ambiguë de la souche C17S.LA et C17S.LD. Peu de marqueurs étaient disposés dans cette région lors du début des analyses alors que cette région couvrait une distance d'un minimum de 8.8 cM ou l'équivalent d'environ 20 Mb (voir figure 4). Un grand nombre de marqueurs ont donc été ajoutés à cette région ambiguë afin de tenter de bien redéfinir l'endroit de recombinaison. Ces marqueurs sont D17Rat87, Prl, D17Rat181, D17Rat15, D17Mit2 et D17Rat83. Certains de ces marqueurs démontraient un génotype hétérozygote SL pour quelques rats des deux souches. L'obtention de régions hétérozygotes peut nuire aux mesures de PA. Comme on l'a vu pour le chromosome 16, si le QTL est récessif, il se peut l'état d'hétérozygotie soit suffisant pour produire un faux négatif. Il sera utile et nécessaire de redéfinir avec clarté cette région à l'aide des souches homozygotes avant de conclure avec certitude que cette région contient un QTL.

Quantité de QTL. Si nous contournons le paradigme de la région ambiguë de la souche C17S.LA et C17S.LD, une première hypothèse est que le chromosome 17 est doté de plusieurs QTL. Chacun des ces QTL pris séparément provoquerait alors un effet discret sur la PA finale non détectable en télémétrie. Une suggestion serait alors d'augmenter de façon substantielle la quantité de rats des autres sous-lignées (par exemple, C17S.LB et C17S.LC) à soumettre à la télémétrie. Toutefois, cette alternative demeure limitée par la qualité de la méthode de télémétrie qui sera abordée plus loin. Une autre proposition serait la construction de souches congéniques "doubles" dans le même chromosome. Par exemple, on obtiendrait ce type de congénique en croisant la souche C17S.LB et C17S.LD afin de cibler simultanément une région supérieure et une région inférieure du chromosome. Toutefois, cette alternative n'a pas été étudiée entre autre parce que la souche C17S.LD n'a pas été conservée une fois les mesures de PA effectuées et ce, pour des raisons de capacités physiques limitées où sont disposés les rats. Il faudrait donc régénérer d'autres sous-lignées à partir de la souche C17S.LA pour la région supérieure du chromosome.

QTL opposés. Une seconde hypothèse, qui n'est pas obligatoirement en discontinuité avec la première est que le chromosome 17 peut également contenir des QTL ayant des effets opposés pour la PA. Chacun de ces QTL ne produirait pas nécessairement un simple effet discret sur la PA. Une suggestion serait alors d'augmenter la quantité de souches à étudier par la production de sous-lignées possédant de très courtes régions cibles. Des sous-lignées très raffinées permettrait de focaliser l'effet potentiel d'une petite région donnée et pourrait mener à l'isolation d'un QTL augmentant la PA. En effet, il est aussi aisé d'analyser une augmentation de la PA (par rapport à la souche S) que la diminution escomptée habituellement grâce à la télémétrie.

Une première tentative de subdivision des souches à été effectuée. En effet, bien que la sous-lignée C17S.LC ne produise aucune différence de PA, celle-ci a été subdivisée en deux pour analyses de PA additionnelles. Les mesures de télémétrie ont été effectuées sur un nombre substantiel de rats (n=11) (résultats non montrés).

Aucune différence significative de PA n'a été obtenue. Il serait particulièrement d'intérêt d'effectuer ce même test pour la souche C17S.LD car elle contient la région d'ambiguïté. Finalement, toutes ces sous-lignées scindées permettront alors également d'effectuer des analyses de congéniques "doubles" au sein du même chromosome.

En résumé, dans la plus complexe des situations, la première hypothèse n'exclut pas la deuxième et toutes ces situations au sein du même chromosome sont plausibles. Elles sont toutes deux en accord avec l'incapacité de localiser avec certitude une unique petite région contenant un QTL. Si plusieurs QTL se trouvent au sein du même chromosome, cela implique probablement des interactions entre gènes.

Puisque le QTL n'a pas pu être localisé à une courte région et que la ou les régions d'intérêts peuvent s'étendre sur une grande partie du chromosome, la souche C17S.LA couvrant plus de 40 cM (voir figure 4), aucune étude de recherche de gènes candidats n'a été amorcée à partir des résultats de rat congéniques. En effet, le début des analyses de ce type devrait être effectué sur une région de moins de 1-2 cM.

Utilisations des souches congéniques. La souche du chromosome 17 provient d'un mélange avec le chromosome 16. Aucun résultat n'est disponible concernant une interaction possible entre ces deux chromosomes pour le moment. La priorité est tout d'abord accordée à la localisation du QTL pour la PA.

Analyses physiologiques

Mesures de la PA. L'étude du chromosome 17 a débuté depuis 1994 et la méthode utilisée était originellement par resserrement de la queue. Toutes les études de liaison génétique ont été effectuées selon cette méthode. La vérification des mesures de PA sur des congéniques et par télémétrie n'a été effectuée qu'au cours de ce projet.

Mesures d'hypertrophie. Pour toutes les raisons expliquées précédemment, aucune étude d'hypertrophie n'a été effectuée pour le chromosome 17. Cependant, il existe un candidat pour un locus lié à l'hypertrophie mais indépendant pour la PA pour le chromosome 17. En effet, une étude de liaison sur le chromosome 17 du rat suggère fortement l'existence d'un locus pour l'hypertrophie cardiaque près du gène récepteur de la dopamine (Drd1A)(154) alors que pour cette même région aucun QTL pour la PA n'est suggéré. Aucune de nos souches ne contient cette région du gène Drd1A puisque celui-ci correspond à l'extrémité inférieure du chromosome selon notre cartographie. Il n'est ainsi pas impossible que ce locus indépendant de la PA influence les données d'hypertrophie qui auraient pu être obtenues pour le chromosome 17.

Effet du sexe. Les études précédentes de liaison génétiques sur le chromosome 17 avec le Sabra Model (153) démontrent qu'un QTL pour la PA pourrait être liée au sexe. Il serait intéressant d'effectuer les analyses de télémétrie sur les mêmes souches congéniques de ce projet mais avec des femelles uniquement. Ceci permettrait de confirmer ou écarter la possibilité de l'implication du sexe dans les régions cibles de cette étude.

Diète. Bien que les études soient moins courantes chez le SBH, ce modèle développe une hypertension seulement liée au sel sans développer d'hypertension spontanément (153). La localisation d'un QTL dans une région semblable à la notre pourrait alors suggérer que le QTL ciblé dans cette étude sera lié à la prise de sel.

Analyses statistiques

Tout comme pour le chromosome 16, la plupart des données ont été analysées par l'ANOVA à mesures répétées pour le chromosome 17. Par la suite, le test *post hoc* de Dunnett a servi pour la comparaison des souches avec S. Il n'a pas été encore nécessaire d'avoir recouru au test de Tukey

CHAPITRE 7

Recherche et analyse moléculaire de gènes candidats

7.1 Recherche de gènes candidats

Approches analytiques de gènes candidats. La méthode scientifique du laboratoire a pour concept global de chercher des QTL sans aucun biais ou préférence pour un gène donné. Le clonage positionnel est donc de mise. Toutefois, lors d'expériences d'expression différentielle par micro-puces à ADN, nous avons eu recours au clonage par gène candidats.

Cartographie physique. Lorsque le QTL est petit, la région a été clairement délimitée par la cartographie physique. Il a faut alors dresser une liste exhaustive de tous les gènes connus et non connus, tous potentiellement candidats. La démarche peut être facilitée ou ennuyée par la découverte d'une région riche ou pauvre en gènes qui allège ou alourdit la quantité de candidats potentiels. Il est donc probable, dans la mesure du possible, d'avoir ajuster la distance approximative à laquelle la cartographie physique commence.

Choix des gènes candidats. Une cartographie comparative peut être construite dès que la liste des gènes et loci de la région cible du rat est complète et la liste est parfois assez longue. Il faut donc développer un ordre logique de choix des candidats. Si un gène ou locus de rat n'obtient aucun homologue humain correspondant, on peut d'emblée y consacrer moins d'efforts. On peut même procéder plus durement par élimination et choisir des candidats qui sont homologues chez les trois espèces. En effet, si un locus inconnu possède un homologue chez la souris et chez l'humain, les chances que ce locus soit véritablement un gène sont plus grandes. Finalement, si un gène est conservé du rat à l'humain en passant par la souris, les chances sont plus grandes qu'une déféctuosité de ce gène puisse trouver un équivalent chez l'humain souffrant d'hypertension.

La description des fonctions physiologiques des gènes contenus dans la région d'intérêt est un autre indice pour choisir judicieusement les gènes candidats en ordre de priorité. De plus, le lieu d'expression spécifique de ces candidats potentiels peut également guider le choix d'un candidat. Dans la régulation de la pression sanguine, une QTL inconnu pourrait davantage être exprimé dans des systèmes organiques comme le système cardiovasculaire, nerveux et plusieurs systèmes endocriniens. Cette méthode biaisée de choix d'expression peut toutefois demeurer obscure puisque a priori, il n'y a aucune raison de choisir un tissu candidat plutôt qu'un autre.

C'est le niveau général d'expression génique dans des tissus cibles comme le rein ou le cœur que l'analyse différentielle par micro-puces à ADN cible. Cette méthode, jumelée avec l'usage des rats congéniques peut aussi fournir des indices importants quant aux gènes candidats à choisir. Une fois que l'infrastructure de congéniques est disponible, il devient plus aisé de carrément créer des congéniques s'ajustant aux résultats de l'analyse d'expression différentielle par micro-puces à ADN et de vérifier la PA obtenue avec ce nouveau congénique. Plus simplement, il n'est pas impossible qu'un (ou plusieurs) candidat(s) soi(en)t différentiellement exprimé(s) dans la même région cible obtenue par l'approche par clonage positionnel.

7.2 Analyse moléculaire de gènes candidats

Le clonage ultime de gène candidat par clonage positionnel du QTL présente une difficulté majeure car il semble que les variants génétiques ont plutôt tendance à résulter par des changements subtils plutôt que grossiers (86).

Analyses qualitatives. Il est de mise de commencer l'analyse d'un gène candidat par son séquençage, que ce soit suite au clonage positionnel ou par gène candidat (155). En effet, si le gène d'intérêt ne comporte aucune différence entre les deux souches contrastantes au niveau de la séquence codante, il y a de fortes chances pour que ce candidat ne soit pas celui escompté. Évidemment, des séquences identiques ne

signifient pas automatiquement que le gène candidat en question ne corrèle pas avec la PA. Cela signifie davantage que ce gène n'est pas impliqué primordialement et n'est donc pas considéré comme un QTL. À moins que la séquence de la région de la mutation ne comporte par de motif de reconnaissance pour les autres protéines régulatrices, c'est au niveau post-transcriptionnel ou traductionnel que la mutation devient fonctionnelle. Il est donc important d'évaluer la séquence protéique obtenue pour le cas où des mutations sont retrouvées dans le gène candidat. En effet, si cette mutation est silencieuse, i.e. ne modifie pas la séquence d'acides aminés, la protéine obtenue, même mutante, est la même.

La méthode complémentaire des SNPs aurait pu être utilisée dans le cadre de ce projet. La seule limite est leur disponibilité immédiate et au niveau génomique. Il faudrait dresser une banque de SNPs pour tracer le profil des rats à l'étude afin d'éventuellement observer les types d'allèles. Toutefois, au niveau de l'utilisation des SNP comme simples marqueurs, il serait de approprié d'envisager développer une infrastructure pour la continuité de ce projet. Cette approche est pour le moment généralement utilisée chez l'humain mais pourrait bien représenter l'avenir des animaux modèles.

L'utilisation des animaux transgéniques est pour le moment un idéal à atteindre chez le rat dans l'étude de l'hypertension. Ce genre de substitution chez le rat requiert une technologie plus développée. Lorsqu'un homologue du gène candidat est disponible, il peut s'avérer judicieux de se rapporter à des études chez les souris transgéniques pour le moment.

Analyses quantitatives. Il est important de considérer toutes les limites de l'approche par profil d'expression génique par micro-puces à ADN. Elles incluent notamment la méthode statistique employée, la non-détection de changements transcriptionnels et post-transcriptionnels, la mixture de la population de cellules et finalement la réplication de résultats d'une méthode extrêmement coûteuse. De plus, bien que les rats étaient jeunes lors des analyses, la différenciation de gènes candidats impliqués

primairement ou secondairement dans le contrôle de la PA (cause à effet) demeure délicate. En effet, le rat S développe l'hypertension très précocement (153). En addition, les différences d'expressions peuvent être liées à d'autres différences phénotypiques entre les souches, par exemple, des variants génétiques physiquement liés au gène primaire d'intérêt ou défectuosité de gènes qui ne sont pas reliés à la pathogenèse de la maladie.

Un autre point délicat est le choix des tissus et du type cellulaire qui sont les plus important à étudier pour la pathogenèse primaire de l'hypertension. Notre analyse a été effectuée à partir de tissus rénaux du rat S, probablement parce que le rein de cette souche semble un organe central, non seulement pour la susceptibilité de cette souche au sel mais également pour le contrôle de la PA en général. De plus, le QTL du chromosome 16 ainsi que les QTL du chromosome 10 de ce rat corrèlent avec l'hypertrophie rénale (Figure 3 de la publication et (156)).

Finalement, il est aussi à mentionner que cette méthodologie ne permet pas d'évaluer le niveau d'expression protéomique. En effet le niveau d'ARNm messenger d'une cellule n'est pas toujours directement proportionnel au niveau protéique. Il est impossible d'exclure la possibilité qu'une mutation d'un gène n'affecte pas le niveau quantitatif d'ARNm. Il faudrait pour cibler le profil d'expression protéique avoir recours à la protéomique. Le principal avantage du profil d'expression de gènes sur la mesure de phénotypes complexes est qu'une seule analyse peut analyser des milliers de phénotypes d'ARNm simultanément. Ce profil offre une évaluation globale des différences entre nos souches parentales. Ce genre d'expérience hautement critiquée s'est toutefois avérée utile pour générer de nouvelles questions et hypothèses.

Concernant les PCR en temps réel et l'immunobuvardage, aucune vérification n'a été effectuée pour le moment pour le chromosome 16 et 17. Ces méthodes possèdent des désavantages et avantages. Le PCR en temps réel est une méthodologie qui requiert un équipement adéquat coûteux et un protocole laborieux et difficile à optimiser (156a). Cette méthode demeure toutefois la plus sensible et plus flexible

des méthodes de quantification de l'ARNm (156b). L'immunobuvardage, que ce soit de type *Western* ou *Northern* possède tous les désagréments des interactions protéine-protéine ou des difficultés techniques de sondes efficaces. Cette méthode demeure toutefois une source alternative classique de quantification généralement mieux admise que les nouveaux procédés comme l'utilisation des micro-puces à ADN par exemple.

Volet A. Recherche de gènes candidats pour le chromosome 16

Recherche de gène candidats

Cartographie physique. La première tentative de cartographie physique a été entamée avant que la séquence du *supercontig* ne soit disponible (Figure 17).

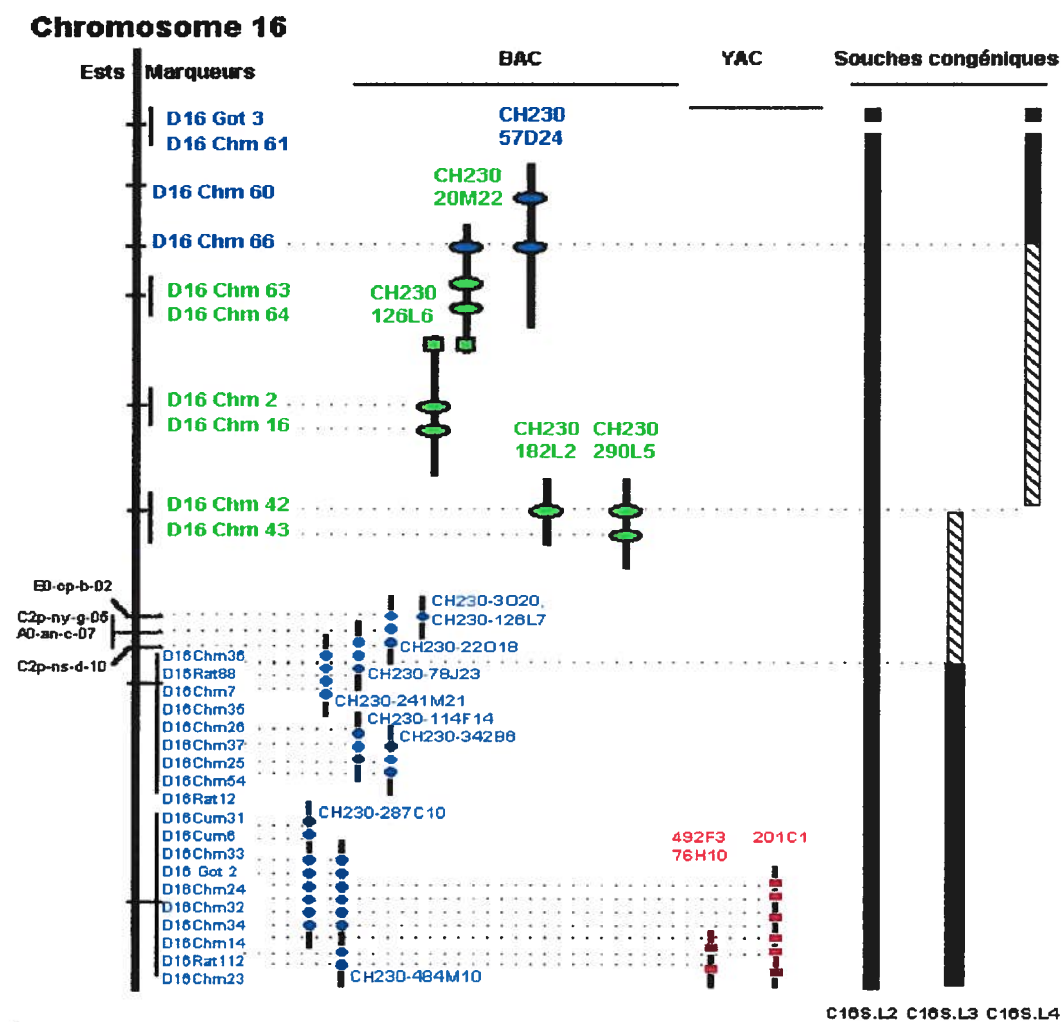


Figure 17. Cartographie physique du chromosome 16 par BAC et YAC pour les souches congéniques C16S.L2, C16S.L3 et C16S.L4. La méthode utilisée *in silico* est l'obtention du BAC (cercle plein) du marqueur (relié à son BAC en pointillé) au <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> et l'alignement des bouts des BAC (carrés pleins bleus ou verts) au http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html. À gauche de la

figure se trouve les EST (<http://ratest.uiowa.edu/>) positionnés aux BAC en pointillés. Les *contig* de YAC criblés par PCR (carré plein rouge) reliés à leurs marqueurs respectifs en pointillés proviennent de clones de ResGen (www.resgen.com). Voir Figure 4 pour origine des marqueurs et désignations des souches. La région illustrée en vert réfère à la région d'intérêt du QTL et la région en bleue exclue du QTL.

Le travail d'établissement d'une carte de transcription des EST de la région d'intérêt afin de fournir une liste complète des gènes a débuté grâce à la technologie des BAC et YAC. La position des BAC était obtenue par placement des séquences des marqueurs sur Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>. Les extrémités de certains BAC pouvaient également être jointes par homologie http://www.tigr.org/tdb/bac_ends/rat/bac_end_intro.html. La position des YAC, criblés par PCR sur des clones la compagnie Research Genetic (www.resgen.com) a également soutenu le positionnement des marqueurs et l'obtention d'une courte région continue. À l'origine, la première vague de télémétrie pour la souche C16S.L3 semblait positive, la cartographie physique a donc débuté à l'extrémité complète du chromosome. Comme le démontre la Figure 17, on peut remarquer 2 trous important se situant dans la région d'intérêt et une faible quantité de EST. Cette méthode aurait pu en partie permettre de « marcher » complètement de marqueurs en marqueurs et fournir une longue liste de EST, mais à partir du moment où un *supercontig* séquencé de cette région devient accessible, cette technologie s'est avérée désuète, coûteuse et longue. Les trous ont donc pu être comblés par alignement des marqueurs par homologie sur la séquence du *supercontig*.

Selon l'alignement des marqueurs sur le *supercontig* NW_043030, la région du QTL couvre une distance maximale de 2,16 Mb (Figure 4). Une des limites de cette cartographie est la possibilité de rencontrer des inversions au niveau du *supercontig* et ainsi sous-estimer la grandeur réelle de la région cible. C'est ce qui semble s'être produit lorsqu'une grande densité de marqueurs moléculaire s'est ajoutée au-dessus de la souche C16S.L3. Ces trous observés sur la carte physique fournie par les BAC et YAC demeure donc non comblée puisque la position des marqueurs sur le

supercontig ne correspond pas toujours à celle obtenue par recombinaison. La position d'un bon nombre de marqueurs demeure donc ambiguë. Cependant, puisque la liste de gènes candidats n'est pas trop exhaustive (voir Figure 6), la distance exacte couverte par le QTL devient moins prioritaire et tous les gènes de cette région globale sont retenus. Le raccourcissement de la région cible est davantage limité à la chance d'obtenir des recombinaisons supplémentaires et exige beaucoup de rats et de temps.

Choix du gène candidat. La liste des 41 gènes et loci obtenus par cartographie physique a été dressée sous forme de cartographie par homologie (voir figure 6), il a fallu procéder à l'élimination successive de candidats potentiels pour choisir un gène candidat de départ car analyser tous les gènes simultanément requerrait beaucoup trop de temps, d'argent et de support technique. Cependant, dans une région QTL aussi réduite, tous les gènes ou locus s'avèrent être des candidats à considérer. Tout d'abord, l'analyse de loci non homologue soit à l'humain soit à la souris ou non similaire à un gène connu ont été reportées à plus tard. À partir de ces candidats restants, une recherche littéraire quant aux fonctions physiologiques de ces gènes a été entamée. Aucun gène ne semblait clairement être impliqué dans le contrôle de la PA. Il a donc fallu procéder à une vague supplémentaire d'éliminations. Le choix s'est arrêté sur les gènes les plus conservés et les plus connus chez les trois espèces. Seul le gène *ARF4* et *PPIase* correspondent à ces critères. Finalement, puisque le gène *ARF4* se trouve en position plus centrale de la région du QTL, ce gène est clairement contenu dans la région d'intérêt. Sa position est supportée par 101 EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>:cluster Rn.35935) et vérifiée grâce à un marqueur d'un microsatellite avoisinants (données non montrées)

L'analyse d'expression différentielle par micro-puces à ADN n'a pas influencé le choix d'un gène candidat en particulier pour ce chromosome. Le seul candidat est le gène *Parg* dont la protéine est une poly(ADP-ribose) glycohydrolase contenant un signal d'exportation nucléaire (157). L'EST nommé U1-R-A1-dp-b-12-0-UI du cluster Rn.13634 (voir section de résultats pour méthode *in silico* d'identification des candidats) présentait une différence d'expression d'un facteur en valeur absolue de

2.66 entre la souche S et LEW. La souche C16S.L4 contenait ce gène candidat et s'est avérée négative quant à un effet possible sur la PA. Finalement, ce gène ne possède aucun lien évident avec le contrôle de la PA. Sa localisation corrèle cependant avec les deux pics obtenus dans les études de liaison génétique présentées.

Choix du gène candidat ARF4

Généralités. Le gène du facteur 4 de ribosylation de l'ADP (*Arf4*) du rat est bien conservé à travers les espèces mammaliennes. La protéine *Arf4* du rat contient 180 acides aminés, un domaine GTPase et possède une homologie de 100% avec la souris et 96% avec l'humain et L'ADNc est exprimé un peu partout, notamment dans le cœur, le rein et le cerveau (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/:cluster Rn.35935>). Les facteurs de ribosylation de l'ADP sont des protéines d'environ 20 kilodalton (kDa), localisée au Golgi et impliquées dans les voies biochimiques de sécrétion des protéines. Elles sont requises pour l'association des protéines sans clathrine aux vésicules de transport et facilitent le trafic intracellulaire des protéines (158). Plus spécifiquement, il a été suggéré que ARF4 soit impliqué dans la spermatogenèse (158). Ainsi, aucun lien évident n'a pu être démontré entre *Arf4* et le contrôle de la PA. Une analyse moléculaire a tout de même été entamée pour s'en assurer.

Séquençage. La librairie d'ADNc étant coûteuse et seulement disponible pour le rat S, le séquençage a été effectué par amplification des exons sur le génome. Aucune différence au niveau des séquences du rat S, LEW et NCBI n'a été détectée (données non montrées). Il faudra effectuer à une deuxième reprise le séquençage complet incluant la région promotrice. Par la suite, il faudra poursuivre les analyses avec les 40 autres candidats mis de côté si aucun évènement de recombinaison sur la sous-lignée C16S.L2 ne permet un raccourcissement de la région d'intérêt ou si l'ordre de la séquence du *supercontig* NW_043030 n'est pas révisé.

Volet B. Recherche de gènes candidats pour le chromosome 17

Cartographie physique. La cartographie physique du chromosome 17 n'a été que survolée. Générer une liste exhaustive de gènes potentiellement candidats n'est pas adéquat à ce stade-ci. La cartographie physique a simplement amélioré la disposition plus claire des marqueurs et évaluer les distances réelles fournies par la carte génétique. En effet, les distance en cM demeure fonction des fréquences de recombinaisons qui son potentiellement inégales. Il a été soulevé que la relation entre la distance génétique et physique se situe autour d'environ 1.9 Mb/cM en assumant que le rat contient 3 billions de pb (75). Finalement, la cartographie physique également permet de disposer les gènes candidats obtenus par analyse d'expression différentielle par micro-puces à ADN.

Choix des gènes candidats. La ou les régions d'intérêt couvre une distance trop grande pour effectuer une cartographie comparative du chromosome 17 à ce stade-ci. De plus, bien que des recherches littéraires des fonctions physiologiques des gènes de ce chromosome puissent être fructueuses, l'énergie devrait d'abord être appliquée sur la détermination de la région du QTL. Il est néanmoins intéressant de se pencher sur les gènes candidats obtenus par l'analyse d'expression différentielle par micro-puces à ADN. Parmi les trois candidats obtenus pour le chromosome 17 (**Tableau VI**), deux correspondent aux régions à l'étude soit Rn.40249 et Rn.8867 correspondant à l'EST221848 et un EST du gène *Crfg*.

Le gène *Crfg* (pour gène de l'insuffisance rénale chronique) code pour une protéine nucléaire guanosine triphosphate liante. Cette protéine à été liée à un phénotype d'insuffisance rénale chronique par analyses d'expression différentielle par PCR (159). Il a été soulevé que la protéine *Crfg* pourrait être importante pour la régulation normale des fonctions du rein car l'ARNm de *Crfg* de la médulla externe de reins de rats possédant des maladies rénales affichait une expression dramatiquement réduite

en comparaison à un rein normal de rat (159). La protéine CRFG humaine se situe sur le chromosome 10p15-p14 et possède 88.5% d'homologie avec la protéine du rat.

Tableau VI. Profil de l'expression génique différentielle par micro-puces à ADN entre la souche S et la souche LEW pour le chromosome 17.

« cluster UNIGENE » (EST)	Facteur d'expression différentielle	Gène ou gène similaire	Supercontig (+ autre chr.)
Rn.19706 (UI-R-Y0-1t-b-06-0-UI)	2,59	similaire au gène de la protéine à doigt de zinc 30 (souris)	NW_043087
Rn.40249 (EST221848)	7,39	similaire à la ubiquitine-ligase Nedd4 (rat)	NW_043112
Rn.8867 (UI-R_BT0-pl-e-10-0-UI)	10,65	Crfg (protéine G liante)	NW_043112 (+ chr.4)

Tableau VI – p.93 - Note. Voir section de résultats pour sites Internet correspondants à la méthode *in silico*. Le *supercontig* NW_043087 est hors des régions d'études pour le chromosome 17 et se situe à la localisation 17p14 soit à l'extérieur de la région inférieure de D17Mco10 (voir figure 7). Le facteur d'expression différentielle fait référence au facteur de la différence d'expression entre la souche S et LEW en valeur absolue.

Chez la souris, la protéine Nedd4 (Nedd4, précurseur neuronal exprimé dans les cellules "rétro-régulées" lors du développement) a récemment été impliquée dans la stabilisation de l'ubiquitination du facteur du récepteur I de l'insuline (160). Plus intéressant, il a d'abord été proposé d'abord que l'homologue humain Nedd4, situé sur le chromosome 15, agit également en régulateur au niveau des canaux sodiques dans le transport du sodium dans l'épithélium du rein et autres épithélium. Ces canaux sodiques sont hyperactifs dans le syndrome de Liddle, une forme héréditaire d'hypertension (161).

Ces deux loci sont intéressants pour notre étude. Toutefois, contre toute attente, ils sont contenus dans la région couverte par le congénique C17S.LC qui en plus de ses sous-lignées scindée en deux, n'a démontré aucun effet pour la PA comparé à S. Pour

le moment, ils ne sont pas retenus comme candidat potentiel pour le ou les QTL du chromosome 17. Il serait toutefois intéressant de reconsidérer éventuellement ces deux loci dès que la région du QTL sera clairement identifiée, notamment par la vérification des niveaux d'expression différentielle par PCR en temps réel et immunobuvardage avant de songer à d'autres analyses moléculaires.

CHAPITRE 8

Stratégie de délimitation d'un QTL pour la PA

La délimitation d'un QTL pour la PA, que ce soit par liaison génétique ou construction de congéniques arbore certaines limites. Même lorsqu'il s'agit d'analyses moléculaires, il faut toujours tenir compte du fait qu'il se peut que le gène pathologique étudié soit spécifique à l'espèce étudiée.

8.1 Population ciblée.

Il faut mettre l'emphase sur le fait qu'un résultat de liaison génétique et de souches congéniques (comprenant le profil d'expression génique par micro-puces à ADN) découle d'une ségrégation de population unique à ces deux souches. Cette unicité peut se traduire suite au croisement d'autres paires de souches par une absence de polymorphisme fonctionnel à un QTL donné. Fonctionnellement polymorphique signifie qu'au locus comptant pour un QTL, il y a une différence allélique d'ADN qui cause une différence fonctionnelle dans l'expression ou l'activité du produit codé par le locus. Ainsi, une autre paire de souche peut être homozygote pour un allèle du QTL mais n'apporter aucun effet sur PA finale. Ce phénomène est observé pour plusieurs QTL. Un exemple de ce phénomène croisement spécifique est le gène candidat ACE (enzyme de conversion de l'angiotensinogène) sur le chromosome 10 du rat (162).

La détection de l'effet d'un QTL donné dépend donc hautement de l'identité des deux souches croisées pour obtenir les populations ségréantes. Dans le cas présent, l'étude s'est limitée à la comparaison de deux souches contrastantes. De plus, les souches de rats croisées proviennent d'un couple sélectionné au départ, ce qui réduit la quantité d'allèles qui peut entrer en cours d'expérience. Une alternative à cette limitation serait d'étudier d'autres souches contrastantes. Par exemple, en utilisant des rats congénique SHR contrastés par BN ou MNS. Cependant, on a déjà pu remarquer, concernant le chromosome 16, que la liaison génétique suggérait un QTL

pour la souche SHR lorsque contrastée par BN à une localisation semblable (voir Figure 12). Concernant le chromosome 17, la liaison génétique suggérait un QTL dans une région semblable pour les souches SBH et SNH (voir Figure 15) mais pas S et BN. De plus, il serait informatif d'étudier les mêmes souches, soit le S et LEW mais avec des souches originant d'un différent couple de départ.

8.2. Arrière plan génomique

Chaque arrière-plan génomique est unique à la souche parentale utilisée pour former la population ségrégante. Un exemple de l'ampleur de l'effet de l'arrière plan génomique spécifique sur un locus a été démontré sur le candidat 11β -hydroxylase(163). Cet effet peut être subdivisé en trois catégories.

Arrière plan génomique de la souche étudiée. Malgré la tentative de décomposition de la PA en une forme monogénique, il est possible que la variation de la PA corrèle avec la spécificité de l'ensemble des allèles contenu dans une souche de rat en particulier. Ceci renforce la notion de spécificité de la population ciblée puisque qu'un QTL influence la PA tout en demeurant en relation avec l'arrière-plan génomique.

Une façon de vérifier l'arrière plan génomique de la souche étudiée est d'effectuer un test de réciprocité qui permet d'observer l'effet sur la PA aux allèles contrastants d'un QTL isolé. Idéalement, si aucun effet du génome n'est impliqué dans le changement de la PA, cibler un QTL pour la PA en remplaçant l'allèle normotendue LEW d'un génome hypertendu S devrait apporter une variation inverse et proportionnelle au remplacement de l'allèle hypertendue S d'un génome normotendue LEW. Cette notion est également associée à la notion de permissivité du génome. Une seule étude solide portant sur le chromosome 1 du rat SHR et WKY est disponible sur l'utilisation avec succès de congéniques réciproques (164). Elle n'éclaire toutefois pas la réciprocité des souches S et LEW.

Notre méthodologie des congéniques est basée sur la prémisse que les allèles des gènes augmentant la PA ont été enrichis chez ce rat durant la sélection (souches hypertendues). Le choix de la souche receveuse pour construire une souche informative devrait être la souche possédant l'arrière plan génomique le plus permissif concernant la PA, dans notre cas, la souche hypertendue S. Le cas échéant, l'effet de l'allèle abaissant ou augmentant la PA sera masquée par l'arrière plan génomique et deviendra invisible. Ce phénomène vient appuyer le manque de données disponible sur le test de réciprocité.

Loci résiduels de la souche donneuse. L'arrière plan génomique de la souche donneuse peut également constituer une différence importante entre la souche congénique et la souche receveuse selon deux facteurs à l'exception de la région d'intérêt du donneur. Malgré la méthode approuvée de croisement retours du receveur avec le rat donneur, il est possible de conserver un QTL résiduel non lié à la région d'intérêt. En effet, bien que la proportion d'ADN résiduel du donneur soit évaluée à moins de 1%, la présence possible de QTL non connus, soit à l'état hétérozygote ou homozygote, pourrait confondre les interprétations quant aux effets sur la pression du QTL ciblé.

La vérification de l'homogénéité de l'arrière plan génomique fait partie des démarches expérimentales habituelles (table I des marqueurs de délimitation génomique de la publication) et est automatiquement imposée à tous les rats conservés ou croisés. Néanmoins, pour des raisons pratiques, la quantité de marqueurs testés demeure limitée. Il est alors difficile d'éliminer avec certitude la probabilité de conserver des loci résiduels de la souche donneuses. Un outil pour tenter de réduire cette probabilité est l'utilisation d'une souche contrôle négative sur le même chromosome (qui a de forte probabilité de conserver le même arrière plan génomique) que la souche positive pour la PA. De plus, comme il a été mentionné, une autre astuce est d'effectuer les mesures télémétriques à des intervalles différents pour une souche donnée. Cette même souche est alors soumise entre-temps à d'autres

croisements avec la souche parentale témoin (soit S) afin de tenter de s'assurer l'uniformité de l'arrière plan génomique.

8.3 Événements génétiques non contrôlés

Effet de position. Il est également possible que la fonction d'un gène ne dépende pas uniquement de ses propriétés intrinsèques. Sa fonction peut être affectée par d'autres gènes ou simples séquences d'ADN de fonctions inconnues présentes dans la même région cible chromosomique. Cet effet de position peut intervenir lors de réarrangement durant la méiose et à l'occasion lors de la mitose. Ces réarrangements chromosomiques incluent la duplication, les délétions, les transpositions, les translocations, les inversions de gène et les événements de recombinaisons inégales. Il est particulièrement difficile d'éliminer la possibilité d'un événement de double recombinaison qui pourrait s'effectuer entre deux marqueurs. Les premières évidences de cet effet de position proviennent d'études de la drosophile (165).

Ces effets de position viennent appuyer la nécessité d'utiliser une grande densité de marqueurs au niveau de la région cible. Ces effets de position sont toutefois généralement des effets indétectables de l'arrière plan génomique et peuvent influencer l'interprétation de la cause de l'effet de la PA d'une souche congénique. Il est important de savoir si l'effet de PA vient réellement de la région chromosomique substituée, notamment pour la stratégie congénique rapide dans lequel on effectue le génotype d'un nombre large de marqueurs étalés partout dans le génome de l'animal dans le but de sélectionner les régions conservées du donneur. Cette méthode crée de manière expéditive une souche de rat congénique en moins de 8 générations (166).

8.4 Multifactorialité de l'hypertension

Interaction gène-gène. L'identification d'un QTL au niveau moléculaire repose sur les mécanismes physiologiques du QTL par lesquels la PA peut être régulée. Les analyses génétiques moléculaires prouvent que la PA est polygénique car il y a de bonne évidence pour plusieurs QTL démontrés par liaison génétique, par usage de rats congéniques et dans plusieurs expériences indépendantes. De plus, cette évidence est démontrée par la variation énorme apportée par un seul QTL sur la PA. Une question au hasard est de savoir le nombre total de QTL dans le rat S capable de le rendre hypertendu ainsi que l'importance de chacun. A priori, il n'existe aucune preuve qu'un QTL est plus important que les autres dans le rat S. Une autre question intéressante est donc de savoir jusqu'à quel point l'effet combiné de tous ces QTL agit sur la PA finale du rat, d'une façon mathématique additive ou si c'est effet est un complexe phénomène impliquant des interactions entre les gènes.

Les principales formes d'interactions gène-gène sont la complémentation et la suppression ou l'épistase (167). La complémentation survient lorsque les allèles de différents gènes se modifient entre eux pour produire un phénotype final. Dans le phénomène d'épistase, un gène supprimeur élimine l'expression spécifique de l'allèle d'un autre gène. La plupart des systèmes qui fonctionnent par épistase comportent des éléments liés entre eux qui fonctionnent en hiérarchie. Il est donc possible que des éléments régulateurs clefs, une interaction partielle ou des multiples cascades soient impliquées dans les voies biochimiques régissant la pression sanguine.

Le phénomène de complémentation ou d'épistase dans la régulation de la PA chez le rat peut être étudié grâce à une comparaison de la PA entre des souches "multi-congéniques" regroupant plusieurs QTL. À mesure que différents QTL sont identifiés, cette voie devient accessible et pourrait être fortement informative quant à la manière dont la PA est régulée dans un système complet.

Interaction gène-environnement. L'environnement peut être interne (par exemple le genre) ou externe (par exemple la diète ou le stress). Il peut être particulier à un moment spécifique ou représenter l'accumulation d'expériences durant la vie du rat (168).

L'environnement n'agit pas seulement de manière additive avec l'arrière-plan génomique mais également en combinaison (8;11). Sur une période de temps prolongée, les composantes génétiques deviennent dépendantes de l'environnement parce que l'environnement peut changer le stade fonctionnel des gènes et il est nécessaire d'en tenir compte dans la hiérarchie des composantes ciblées (169). L'environnement influence le phénotype à travers la stimulation ou l'atténuation de l'expression de gènes ou via l'interaction avec des produits de gènes. Un exemple applicable à cette étude est qu'une haute diète riche en sel se présente comme un facteur environnemental qui peut altérer l'expression du gène comme la rénine par exemple qui mène à une plus grande excrétion de sodium et influence la prévention de l'effet du sel sur l'hypertension (169).

Malgré un contrôle strict de l'environnement lors des analyses de liaisons génétiques ou l'utilisation de souches congénique, son influence ne peut en aucun cas être éliminée. Une suggestion se rapportant à notre étude est de soumettre les rats à une diète riche en sel mais aussi pauvre en sel afin délimiter cette influence environnementale. Des travaux sont présentement en cours sur ce sujet.

9.5 Comparaison et reproductibilité des QTL

Plusieurs différences entre les QTL rendent la comparaison et la reproductibilité techniquement difficile. Il y a notamment l'utilisation de marqueurs différents par les différents chercheurs, l'effet du sexe, la diète en NaCl, l'utilisation de souches différentes qui introduisent des QTL ou arrière-plans génomiques différents, l'âge à laquelle la PA des rats a été mesurée ou encore les effets impliquant la pression

systolique, diastolique et la fréquence cardiaque. Néanmoins, une comparaison non astringente sur ces facteurs et sur l'ensemble des QTL communs ou reproductibles peut être effectuée (**Figure 18**). Concernant le chromosome 16 et 17, on peut remarquer que les QTL ne sont pas reproductibles pour toutes les souches et ce, pour toute les raisons énumérées ci-haut. De plus, la raison principale réside très certainement dans la spécificité des populations qui ne présentent pas nécessairement les même gènes défectueux concernant la PA. Il en va de même pour l'humain qui possède également une hétérogénéité concernant les déficiences des gènes contrôlant la PA.

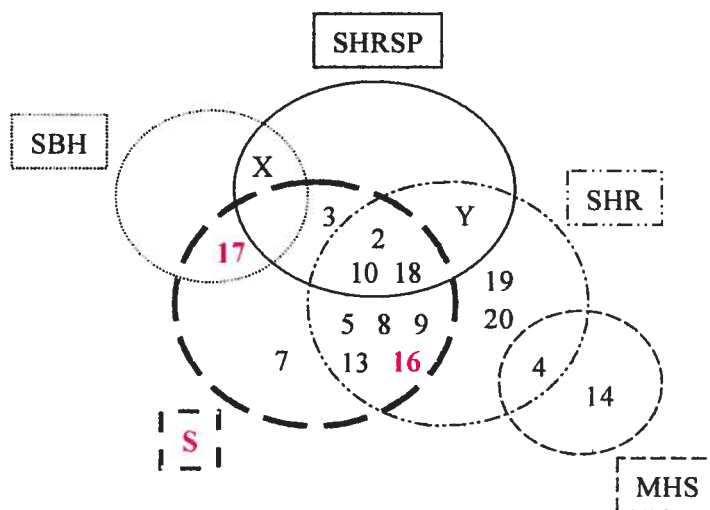


Figure 18. Diagramme présentant les QTL pour la PA communs ou reproductibles identifiés dans différentes expériences indépendantes. Seules les souches hypertendues sont présentées. Les cercles font références au rat SHRS, *Stroke-prone spontaneously hypertensive*; SHRS, *spontaneously hypertensive rat*; MHS, *Milan hypertensive strain*; S, *Dahl Salt-Sensitive*; SBH, *Sabra hypertensive*. Les chiffres indiqués réfèrent aux numéros des chromosomes. Adapté de Dominiczak et al. (170).

L'installation d'une convention sur le choix des marqueurs de base, de la diète en sel en fonction des souches ainsi que de l'âge de mesure de la PA des rats (sauf pour études développementales) serait une alternative intéressante afin d'atténuer les effets de la diversité méthodologique des scientifiques.

Conclusion

Le chromosome 16 et 17 du rat ont fait l'objet de peu d'études concernant l'hypertension. La plupart des études mentionnant l'implication possible de ces chromosomes dans le contrôle de la PA étaient surtout centrées sur des recherches systématiques au niveau du génome. Le défi principal concernant ces QTL (qui étaient à la bases suggérés) était de prouver leur existence. Lorsque les ressources à la fois génomiques et littéraires sont moins abondantes, la stratégie devient centrale.

Le chromosome 16 et 17 contiennent bel et bien un QTL pour la PA. Le QTL du chromosome 16 a d'ailleurs été cerné de plus près grâce à la stratégie établie. Des analyses moléculaires ont été entreprises pour ce QTL, il s'agit maintenant de les poursuivre. Il serait intéressant de poursuivre les efforts pour raccourcir la région d'intérêt pour éliminer une portion des candidats et procéder au séquençage systématique de tous les gènes et locus présents. Concernant le chromosome 17, il serait intéressant de se pencher vers les différentes hypothèses soulevées par la position ambiguë de ce ou ces QTL. Par exemple, explorer l'hypothèse selon laquelle ce chromosome contient plusieurs QTL interagissant ensemble et/ou ayant possiblement des effets opposés sur la PA.

Références

1. Deng, A.Y. 1998. In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats. *J.Hypertens.* **16**:1707-1717.
2. Whelton, P. K., J. He, and M.J. Klag. Blood pressure in westernized populations. 11-21. 1994. Oxford, UK, J.D.Swales.
3. Genert J., Kuchel O., Cantin M., and Hamet P. 1983. Hypertension physiopathology and Treatment. McGraw-Hill Publishing Co, New York, NY. 582-598 pp.
4. Laragh J.H. and Brenner B.M. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. 81-100. 1990. New York, NY, Raven Press Publishers.
5. Laragh J.H. and Brenner B.M. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. 137-145. 1990. New York, NY, Raven Press Publishers.
6. Lilly L.S. 1998. Pathophysiology of Heart Disease. Williams & Wilkins, Baltimore. 267-268 pp.
7. Textbook of hypertension. MacMahon S. Blood pressure and the risks of cardiovascular disease. 46-57. 1994. Oxford, UK, J.D. Swales, Blackwell.
8. Hamet, P. 1996. Environmentally-regulated genes of hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.* **18**:267-278.
9. Zerba K.E. and Sing C.F. 1993. The role of genome type-environment interaction and time in understanding the impact of genetic polymorphisms on lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **4**:152-162.
10. Hamet, P., Pausova, Z., Adarichev, V., Adaricheva, K., and Tremblay, J. 1998. Hypertension: genes and environment. *J.Hypertens.* **16**:397-418.
11. Hamet, P. 1995. Environmental stress and genes of hypertension. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **22**:S394-S398.
12. Kim, H.S., Kregge, J.H., Kluckman, K.D., Hagaman, J.R., Hodgins, J.B., Best, C.F., Jennette, J.C., Coffman, T.M., Maeda, N., and Smithies, O. 1995. Genetic control of

blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:2735-2739.

13. Mullins,J.J., Peters,J., and Ganten,D. 1990. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* **344**:541-544.
14. Smithies,O. 1997. Theodore Cooper Memorial Lecture. A mouse view of hypertension. *Hypertension* **30**:1318-1324.
15. Smithies,O. and Kim,H.S. 1994. Targeted gene duplication and disruption for analyzing quantitative genetic traits in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:3612-3615.
16. Smithies,O. and Maeda,N. 1995. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:5266-5272.
17. Rapp,J.P. 2000. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol. Rev.* **80**:135-172.
18. Ward R. 1995. Hypertension: pathophysiology, Diagnosis and Management. Laragh JM and Brenner BM, Raven, New York. 67-88 pp.
19. Biron,P., Mongeau,J.G., and Bertrand,D. 1976. Familial aggregation of blood pressure in 558 adopted children. *Can.Med.Assoc.J.* **115**:773-774.
20. Williams R.R., Hunt S.C., Hopkins P.N., Wu L.L., Hasstedt S.J., Stults B.M., and et al. Genes, hypertension, and early familial coronary heart disease. Laragh JH and Brenner BM (editors). IN: *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. Vol.1.* 127-136. 1990. New York, Raven Press.
21. Burke W and Motulsky G. *The genetic basis of human diseases.* In: King RA, Rotter JI, Motulsky AG, and (editors). 170-191. 1992. New York, Oxford University Press.
22. Lander,E. and Kruglyak,L. 1995. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.***11**:241-247.
23. Chang S.S., Grunder S., Hanukoglu A., Rösler A., Mathew PM., Hanukoglu I., Schild L., Lu Y., Shimkets R.A., Nelson-Williams C. *et al.* 1996. Mutations in subunits of the

epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nature. Genet.* 12:248-253.

24. Lifton R.P. 1996. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 272:676-680.
25. Lifton R.P., Diuhy R.G., Powers M., Rich G.M., Cook S., Ulick S., and Lalouel J.M. 2003. A chimaeric 11 β -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355:262-265.
26. Schild L., Canessa C., Shimkets R.A., Gautschi I., Lifton R.P., and Rossier B.C. 1995. A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:5699-5703.
27. Simon D.B. and Lifton R.P. 1996. The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am.J.Physiol.* 271 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 40):F961-F966.
28. Hanssons J.H., Nelson-Williams C., Suzuki H., Schild L., Shimkets R.A., Lu Y., Canessa C., Iwasaki T., Rossier B.C., and Lifton R.P. 1995. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel subunit : genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nature Genet.* 11:76-82.
29. White,P.C. 1996. Inherited forms of mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 28:927-936.
30. 1994. Handbook of hypertension. Experimental and Genetic Models of Hypertension. Elsevier Science, New York.
31. Hamet P. 1999. Genes and hypertension : where we are and where we should go. *Clin.And Exper.Hypertension* 21(5&6):947-960.
- 31a. Schlager G.1974.Selection for blood pressure levels in mice.*Genetics.* 76: 537-549.
- 31b. Svenson K.L., Bogue M.A., Peters L.L. 2003. Identifying new mouse modelsof cardiovascular disease: a review of high-throughput screensof mutagenized and inbred strains. *J. Appl. Physiol.* 94: 1650-1659.

32. Greenhouse D.D., Festing M.F.W., Hasan S., and Cohen A.L. Catalog of inbred strains of rats. Gustav Fischer Verlag. IN *Genetic monitoring of inbred strains of rats*. 1990. Stuttgart, Germany, Hedrich HJ.
33. Gill, T.J., III, Smith, G.J., Wissler, R.W., and Kunz, H.W. 1989. The rat as an experimental animal. *Science* **245**:269-276.
34. Lander, E.S. and Schork, N.J. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**:2037-2048.
35. Dominiczak A.F. and Lindpainter K. 1994. Genetics of hypertension: a current appraisal. *News Physiol. Sci.* **9**:246-251.
36. Makalowski, W. and Boguski, M.S. 1998. Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2,820 orthologous rodent and human sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**:9407-9412.
37. Koike, G., Krieger, J.E., Jacob, H.J., Mukoyama, M., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. 1994. Angiotensin converting enzyme and genetic hypertension: cloning of rat cDNAs and characterization of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**:380-386.
38. Bianchi, G., Tripodi, G., Casari, G., Salardi, S., Barber, B.R., Garcia, R., Leoni, P., Torielli, L., Cusi, D., Ferrandi, M. *et al.* 1994. Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**:3999-4003.
39. Julier, C., Delepine, M., Keavney, B., Terwilliger, J., Davis, S., Weeks, D.E., Bui, T., Jeunemaitre, X., Velho, G., Froguel, P. *et al.* 1997. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* **6**:2077-2085.
40. Casari, G., Barlassina, C., Cusi, D., Zagato, L., Muirhead, R., Righetti, M., Nembri, P., Amar, K., Gatti, M., Macciardi, F. *et al.* 1995. Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. *Hypertension* **25**:320-326.
41. Smirk F.H. and Hall W.H. 1958. Inherited hypertension in rats. *Nature* **182**:727-728.

42. Dahl L.K., Hein M., and Tassinari L. 1962. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. *Nature* 194:480-482.
43. Okamoto K. and Aoki K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn.Circ.J.* 27:293.
44. Ben-Ishay D., Saliternick R., and Welner A. 1972. A separation of two strains of rats with inbred dissimilar sensitivity to DOCA-salt hypertension. *Experientia* 28:1321-1322.
45. Dupont J., Dupont J.C., Froment A., Milon H., and Vincent M. 1973. Selection of three strains of rats with spontaneously different levels of blood pressure. *Biomedicine* 19:36-41.
46. Okamoto K., Yamori Y., and Nagaoka A. 1974. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ.Res.* 34, Suppl. I:I-143-I-153.
47. Bianchi C. and Fox U. 1974. The development of a new strain of spontaneously rat. *Life Sci.* 14:339-347.
48. Juijpers M.H.M. and Gruys E. 1984. Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat. *Nr.J.Exp.Pathol.* 65:181-190.
49. Markel A.L. 1985. Experimental model of inherited arterial hypertension conditioned by stress (in Russian). *Seria Biol.* 3:466-469.
50. Heller J., Helleova S., Dobesova Z., Kunês J., and Zicha J. 1993. The Prague hypertensive rat: a new model of genetic hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.* 15:807-818.
51. Pamnani M.B., Clough D.L., Huot S.J., and Haddy F.J. 1980. Vascular Na⁺-K⁺ pump activity in Dahl S and R rats. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 165:440-444.
52. Rapp J.P. and Dene H. 1985. Development and characteristics of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* 7:340-349.
53. Deng,A.Y. 1998. Is the nitric oxide system involved in genetic hypertension in Dahl rats? *Kidney Int.* 53:1501-1511.

54. Ginn,D.I., Baptista,C.A., Alam,K.Y., Deng,A.Y., Cicila,G.T., Margolius,H.S., and Rapp,J.P. 1993. Estimate of the genetic divergence between inbred Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *J.Hypertens.* 11:477-481.
55. Jacob,H.J., Brown,D.M., Bunker,R.K., Daly,M.J., Dzau,V.J., Goodman,A., Koike,G., Kren,V., Kurtz,T., Lemmark,A. *et al.* 1995. A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat.Genet.* 9:63-69.
56. Cicila,G.T., Dukhanina,O.I., Kurtz,T.W., Walder,R., Garrett,M.R., Dene,H., and Rapp,J.P. 1997. Blood pressure and survival of a chromosome 7 congenic strain bred from Dahl rats. *Mamm.Genome* 8:896-902.
57. Garrett,M.R., Dene,H., Walder,R., Zhang,Q.Y., Cicila,G.T., Assadnia,S., Deng,A.Y., and Rapp,J.P. 1998. Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res.* 8:711-723.
58. Harris E.L., Dene H., and Rapp J.P. 1993. SA gene and blood pressure cosegregation using Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens* .6:330-334.
59. Gu L., Dene H., Deng A.Y., Hoebel B., Biboreau M., James M., and et al. 1996. Genetic mapping of two blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 1. *J. Clin. Invest* .97:777-788.
60. Palijan A. and et al. 2003. Quantitative trait loci with opposing blood pressure effects demonstrating epistasis on Dahl rat chromosome 3. *Physiol. Genomics* In press.
61. Deng,A.Y., Dene,H., Pravenec,M., and Rapp,J.P. 1994. Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes. *J.Clin.Invest* 93:2701-2709.
62. Deng A.Y. and Rapp J.P. 1992. Cosegregation of blood pressure with angiotensine converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nat. Genet* .1:267-272.
63. Moujahidine,M., Dutil,J., Hamet,P., and Deng,A.Y. 2002. Congenic mapping of a blood pressure QTL on chromosome 16 of Dahl rats. *Mamm.Genome* 13:153-156.

64. Yamada, J., Kuramoto, T., and Serikawa, T. 1994. A rat genetic linkage map and comparative maps for mouse or human homologous rat genes. *Mamm. Genome* 5:63-83.
65. Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J., Dubay, C.J., Lindpainter, K., Ganten, D., Guenet, J.L., Lathrop, G.M. *et al.* 1992. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131:701-721.
66. Benzer S. 1962. The fine structure of the gene. *Sci. Am.* 206:70-84.
67. Klinger-Levan K., Levan G., Szpirer J., and Sziper C. 1993. The rat genetic map. *Rat News Lett.* 16-48.
68. Jacob H.J., Brown D.M., Bunker R.K., Daly M.J., Dzau V.J., Goodman A., and *et al.* 1996. A genetic linkage map of the laboratory map. *Nature Genet.* 9:63-69.
69. Pravenec M., Gauguier D., Schott J.J., Buard J., Kren V., Bila V., and *et al.* 1996. A genetic linkage map of the rat derived from recombinant inbred strains. *Mammalian Genome* 7:127.
70. Beckmann J.S. and Weber J.L. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12:627-631.
71. Deng A.Y. and Rapp J.P. 1997. Mapping of selective rat chromosome regions using mouse microsatellite markers. *Folia Biol.* 43:183-193.
72. Kondo Y., Mori M., Kuramoto T., Yamada J., Beckmann J.S., Simon-Chazottes D., Montagutelli X., Guénet J.L., and Serikawa T. 1993. DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite between mouse and rat. *Mamm. Genome* 4:571-576.
73. Serikawa T., Kuramoto T., Hilbert P., Mori M., Yamada J., Dubay C.J., Lindpainter K., Ganten D., Guénet J.L., Mark Lathrop G *et al.* 1992. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131:701721-721.
74. Watanabe, T.K., Bihoreau, M.T., McCarthy, L.C., Kiguwa, S.L., Hishigaki, H., Tsuji, A., Browne, J., Yamasaki, Y., Mizoguchi-Miyakita, A., Oga, K. *et al.* 1999. A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. *Nat. Genet.* 22:27-36.

75. Steen,R.G., Kwitek-Black,A.E., Glenn,C., Gullings-Handley,J., Van Etten,W., Atkinson,O.S., Appel,D., Twigger,S., Muir,M., Mull,T. *et al.* 1999. A high-density integrated genetic linkage and radiation hybrid map of the laboratory rat. *Genome Res.* 9:AP1-8, insert.
76. Bihoreau,M.T., Gauguier,D., Kato,N., Hyne,G., Lindpaintner,K., Rapp,J.P., James,M.R., and Lathrop,G.M. 1997. A linkage map of the rat genome derived from three F2 crosses. *Genome Res.* 7:434-440.
77. Rapp,J.P., Wang,S.M., and Dene,H. 1989. A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregates with blood pressure. *Science* 243:542-544.
78. Rapp J.P. and Dahl L.K. 1972. Mendelian inheritance of 18- and 11 β -steroid hydroxylase activities in the adrenals of rats genetically susceptible or resistant to hypertension. *Endocrinology* 90:1435-1446.
79. Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., and Newburg L. 1987. MAPMAKER: An Interactive Computer Package for Constructing Primary Genetic Linkage Maps of Experimental and Natural Populations. *Genomics* 1:174-181.
80. Lander E. and Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
81. Hyne V., Kearsley M.J., Pike D.J., and Snape J.W. 1995. QTL analysis: unreliability and bias in estimation procedures. *Mol. Breeding* 1:273-282.
82. Ooijen J.W. 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor. Appl. Genet* 84:803-811.
83. Darvasi A., Weinreb A., Minke V., Weller J.I., and Soller M. 1993. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134:943-951.
84. Wright F.A. and Kong A. 1997. Linkage mapping in experimental crosses: the robustness of single-gene models. *Genetics* 146:417-425.

85. Martinez O. and Curnow R.N. 1992. Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**:480-488.
86. Rapp, J.P. and Deng, A.Y. 1995. Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? Identifying the genes for genetic hypertension. *Hypertension* **25**:1121-1128.
87. Risch N. and Merikangas K. 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* **273**:1516-1517.
88. Snell G.D. 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genetics* **49**:87-108.
89. Green E.L. 1981. *Genetics and Probability in Animal Breeding Experiments*. Oxford University Press, New York. 141-152 pp.
90. Silver L.M. 1995. *Mouse Genetics: Concepts and Applications*. Oxford Univ. Press, New York. 44-220 pp.
91. Morel, L., Yu, Y., Blenman, K.R., Caldwell, R.A., and Wakeland, E.K. 1996. Production of congenic mouse strains carrying genomic intervals containing SLE-susceptibility genes derived from the SLE-prone NZM2410 strain. *Mamm. Genome* **7**:335-339.
92. Yui, M.A., Muralidharan, K., Moreno-Altamirano, B., Perrin, G., Chestnut, K., and Wakeland, E.K. 1996. Production of congenic mouse strains carrying NOD-derived diabetogenic genetic intervals: an approach for the genetic dissection of complex traits. *Mamm. Genome* **7**:331-334.
93. Jeffs, B., Negrin, C.D., Graham, D., Clark, J.S., Anderson, N.H., Gauguier, D., and Dominiczak, A.F. 2000. Applicability of a "speed" congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 2. *Hypertension* **35**:179-187.
94. Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., Carlson, G.A., Nagle, D.L., Smutko, J.S., and Moore, K.J. 1997. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat. Genet.* **17**:280-284.
95. Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M., and Longmate, J. 1997. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol. Today* **18**:472-477.

96. Bridges C.B. 1917. Deficiency. *Genetics* 2:445-465.
97. Paterson A.H., De Verna J.W., Lanini B., and Tanksley S.D. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato. *Genetics* 124:735-742.
98. Rapp J.P., Garret M.R., and Deng A.Y. 1998. Construction of a Double Congenic Strain to Prove an Epistatic Interaction on Blood Pressure between Rat Chromosome 2 and 10. *J.Clin.Invest.* 101:1591-1595.
99. Bunag R. and Butterfield J. 1982. Tail cuff blood pressure measurement without external preheating in awake rat. *Hypertension* 4:898-903.
100. Brockway B.P. and Hassler C.R. 2003. Application of radiotelemetry to cardiovascular measurements in pharmacology and toxicology. CRC Press, Florida.
101. Andrews D.I., Jones D.R., and Simpson F.O. 1978. Direct recording of arterial blood pressure and heart rate in the conscious rat. *J.Pharm. Pharmacol.* 30:524-25.
102. Cooper,R.S., Simmons,B.E., Castaner,A., Santhanam,V., Ghali,J., and Mar,M. 1990. Left ventricular hypertrophy is associated with worse survival independent of ventricular function and number of coronary arteries severely narrowed. *Am.J.Cardiol.* 65:441-445.
103. Levy,D., Garrison,R.J., Savage,D.D., Kannel,W.B., and Castelli,W.P. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N.Engl.J.Med.* 322:1561-1566.
104. Morgan,T., Aubert,J.F., and Brunner,H. 2001. Interaction between sodium intake, angiotensin II, and blood pressure as a cause of cardiac hypertrophy. *Am.J.Hypertens.* 14:914-920.
105. Drayer,J.I., Weber,M.A., and DeYoung,J.L. 1983. BP as a determinant of cardiac left ventricular muscle mass. *Arch.Intern.Med.* 143:90-92.
106. Morgan,T., Brunner,H., Aubert,J.F., and Connell,P. 1997. The relationship of blood pressure to cardiac hypertrophy: experimental studies in rats. *Clin.Exp.Hypertens.* 19:827-841.

107. Hwang D.M., Dempsey A.A., Lee C.Y., and Liew C.C. 2000. Gene expression analysis in cardiac hypertrophy. *Genomics* 66:1-14.
108. Churchill P.C., Churchill M.C., Bidani A.K., Griffin K.A., Pcken M., Pravenec M., Kren V, St-Lezin E., Wang J.M., Wang N. *et al.* 1997. Genetic susceptibility to hypertension-induced renal damage in the rat. Evidence based on kidney-specific genome transfer. *J. Clin. Invest* 100:1382.
109. Aviv A and Aviv H. 1997. Reflection on Telomeres, Growth, Aging, and Essential Hypertension. *Hypertension* 29, 1067-1072.
110. Mackenzie,H.S. and Brenner,B.M. 1995. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am. J. Kidney Dis.* 26:91-98.
111. Brenner,B.M. and Chertow,G.M. 1994. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kidney Dis* 23:171-175.
112. Weder,A.B. and Schork,N.J. 1994. Adaptation, allometry, and hypertension. *Hypertension* 24:145-156.
113. Weinberger,M.H. 1996. Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? *Cur. r Opin. Nephrol.Hypertens.* 5:205-208.
114. Yuan,B.X. and Leenen,F.H. 1991. Dietary sodium intake and left ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am.J.Physiol* 261:H1397-H1401.
115. De la Sierra A., del Mar Lluch A., Coca A., Aguilera M.T., Sanchez M., Sierra C., and et al. 1995. Assessment of salt sensitivity in essential hypertension by 24 h ambulatory blood pressure monitoring. *Am. J. Hypertens* 9:970-977.
116. Luke,R.G. 1993. Essential hypertension: a renal disease? A review and update of the evidence. *Hypertension* 21:380-390.
117. Churchill,P.C., Churchill,M.C., and Bidani,A.K. 1992. Kidney cross transplants in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Am. J. Physiol.* 262:H1809-H1817.

118. Rettig,R., Folberth,C., Stauss,H., Kopf,D., Waldherr,R., and Unger,T. 1990. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *Am J Physiol* **258**:F606-F611.
119. Guidi,E., Menghetti,D., Milani,S., Montagnino,G., Palazzi,P., and Bianchi,G. 1996. Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidneys coming from donors with or without hypertension in their families. *J. Am. Soc.Nephrol.* **7**:1131-1138.
120. Gardiner S.M., Kemp P.A., Bennet T., Palmer R.M.J, and Monecada S. 1992. nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *Eur J Pharmacol.* **213**:449-451.
121. Cowley A.W.J., Szczepanska-Sadowska E., Stepniakowski K., and Mattson D. 1994. Chronic intravenous administration of V1 arginine vasopressin agonist results in sustained hypertension. *Am J Physiol* **267**:H751-H756.
122. Dumas P., Tremblay J., and Hamet P. 1994. Stress modulation by electrolytes in salt-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Med. Sci.* **307** (suppl 1):130-137.
123. Lever,A.F. and Harrap,S.B. 1992. Essential hypertension: a disorder of growth with origins in childhood? *J. Hypertens.* **10**:101-120.
124. Harris E.L, Phelan E.L, Thompson J.A., Millar J.A, and Grigor M.R. 1995. Heart mass and blood pressure have separate genetic determinants in the New Zealand genetically hypertensive (GH) rat. *J. Hypertens.* **13**:397-404.
125. Schork N.J., Nath S.P., Lindpaintner K., and Jacob H.J. 1996. Extensions to quantitative trait locus mapping in experimental organisms. *Hypertension* **28**:1104-1111.
126. Hilbert P., Lindpaintner K., Beckmann J.S., Serikawa T., Soubrier F., Dubay C., and et al. 1991. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* **353**:521-529.
127. Ely D.L. and Turner M.E. 1990. Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension* **16**:277-281.

128. Turner M.E., Johnson M.L., and Ely L.D. 1991. Separate sex-influenced and genetic components in spontaneously hypertensive rat hypertension. *Hypertension* **9**:1097-1103.
129. Vincent M., Kaiser M.A., Orea V., Lodwick D., and Samani N.J. 1994. Hypertension in the spontaneously hypertensive rat and the sex chromosomes. *Hypertension* **23**:161-166.
130. Davidson A.O., Schork N., Jaques B.C., Kelman A.W., Sutcliffe R.G., Reid J.L., and et al. 1995. Blood pressure in genetically hypertensive rats - influence of the Y chromosome. *Hypertension* **26**:459.
- 130a. Lander E., Kruglyak L. 1995. Genetic dissection of complex traits : guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet.* **11**:241-247.
131. Collins F.S. 1995. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat Genet* **9**:347-350.
132. Burke,D.T., Carle,G.F., and Olson,M.V. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**:806-812.
133. Shizuya,H., Birren,B., Kim,U.J., Mancino,V., Slepak,T., Tachiiri,Y., and Simon,M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8794-8797.
134. Cai,L. and et al. 1997. Construction and Characterisation of a 10-Genome Equivalent Yeast Artificial Chromosome Library for the Laboratory Rat, *Rattus norvegicus*. *Genomics* **39**:385-392.
135. Osoegawa K., Woon PY., Zhao B., Frengen E., Tateno M., Catanese J.J., and de Jong P. 1998. An improved Approach for Construction of Bacterial Artificial Chromosome Libraries. *Genomics* **52**:1-8.
- 135a. Gray C., Campbell D.A and Spurr N.K. 2000. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetic. *Humain Molecular Genetics.* **9**(16):2403-2408.

- 135b. Cooper GM., Brudno M., Green ED., Batzoglou .and Sidow A. 2003. Quantitative estimates of sequence divergence for comparative analyses of mammalian genomes. *Genome Res.* **13**: 813-820.
136. Henriksen P.A. and Kotelevtsev Y. 2002. Application of gene expression profiling to cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **54**:16-24.
137. Moldovan L. and Moldovan N.I. 2002. Trends in genomic analysis of the cardiovascular system. *Arch. Pathol. Lab Med.* **126**:310-316.
138. Shimkets R. Genes and proteins predictive and therapeutic for stroke, hypertension, diabetes, and obesity. World Intellectual Property Association (<http://ep.espacenet.com>) International Publication Number WO00/18918. 4-6-0000.
139. Eaves I.A., Wicker L.S., Ghandour G., Lyons P.A., Peterson L.B., Todd J.A., and Glynne R.J. 2002. Combining mouse congenic strains and microarray gene expression analyses to study a complex trait: the NOD model of type 1 diabetes. *Genome Res.* **12**:243.
140. Monti J., Gross V., Luft F.C., Franca Milia A., Schulz H., Dietz R., Sharma A.M., and Hubner N. 2001. Expression analysis using oligonucleotide microarrays in mice lacking bradykinin type 2 receptors. *Hypertension* **38**:E1-E3.
141. Jansen R.C. and Nap J.P. 2001. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends genet.* **17**:388-391.
142. Innes B.A, Mc-Laughlin M.C., Kapuscinski M.K., Jacob H.J., and Harrap S.B. 1998. Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* **31**:741-746.
143. 1999. Telemetry information guide. Data Science International, St-Paul. B-6
144. Deng, A.Y., Dutil, J., and Sivo, Z. 2001. Utilization of marker-assisted congenics to map two blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats. *Mamm. Genome* **12**:612-616.
145. Dutil, J. and Deng, A.Y. 2001. Further chromosomal mapping of a blood pressure QTL in Dahl rats on chromosome 2 using congenic strains. *Physiol. Genomics* **6**:3-9.

146. Wallen W.J., Bélanger M.P, and Wittnich C. 2002. Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats. *Journal of Nutrition* **132**:2246-2250.
147. Schork N.J., Krieger J.E., Trolliet M.R., Franchini K., Koike G., Krieger E.M., Lander E.S., Dzau V.J., and Jacob H.J. 1995. A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome research* **5**:164-172.
148. Schork NJ, Krieger JE, Trolliet MR, Franchini K, Koike G, Krieger EM, Lander ES, Dzau VJ, and Jacob HJ. 1995. A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome research* **5**:164-172.
149. Harley CB. 1991. Telomere loss:mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* **256**:271-282.
150. Martin GM. 1994. Genetic modulation of telomeric terminal restriction-fragment length:revelance for clonal aging and late-life disease. *J. Hum. Genet.* **55**:866-869.
151. Broccoli D and Cooke H. 1993. Aging, healing and the metabolism of telomeres. *Am J Hum Genet* **52**:657-660.
152. Palijan A, Lambert R, Dutil J, Sivo Z, and Deng AY. 2003. Comprehensive congenic coverage revealing multiple BP QTL on rat Chromosom 10. *Hypertension* In press.
153. Yagil,C., Sapojnikov,M., Kreutz,R., Katni,G., Lindpaintner,K., Ganten,D., and Yagil,Y. 1998. Salt susceptibility maps to chromosomes 1 and 17 with sex specificity in the Sabra rat model of hypertension. *Hypertension* **31**:119-124.
154. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bilà V, Szpirer C, Szpirer J, Wang J', Huang H *et al.* 1996. Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J.Clin.Invest.* **96**:1973-1978.
155. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, and eds. 1996. Principles and practice of medical genetics. Churchill Livingstone, New York, NY. 127-135 pp.

156. Sivo Z, Malo B, Dutil J, and Deng AY. 2002. Accelerated congenics for mapping two blood pressure quantitative trait loci on Chromosome 10 of Dahl rats. *J Hypertension* **20**:1-9.
- 156a. Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase reaction assays. *J. of Molecular endocrinology* **25**:169-193.
- 156b. Wang T., Brown MJ. 1999. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNA protection. *Analytical Biochemistry* **269**:198-201.
157. Shimokawa T, Masutani M, Nagasawa S, Nozaki T, Ikota N, Aoki Y, Nakagama H, and Sugimura T. 1999. Isolation and cloning of rat poly(ADP-ribose) glycohydrolase: presence of a potential nuclear export signal conserved in mammalian orthologs. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**:748-755.
158. Mishima K, Price S.R., Nightingale M.S., Kousvelari E., Moss J., and Vaughan M. 1992. Regulation of ADP-ribosylation factor (ARF) expression. *The Journal of Biological Chemistry* **267**:24109-24116.
159. Laping NJ. 2001. Identification of a novel nuclear guanosine triphosphate-binding protein differentially expressed in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**:883-890.
160. Vecchione A., Marchese A., Henry P., Rotin D., and Morrione A. 2003. The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol. Cell. Bio.* **23**:3363-3372.
161. Staub O., Dho S., Henry P., Correa J., Ishikawa T., McGlade J., and Rotin D. 1996. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J* **15**:2371-2380.
162. Deng AY and Rapp JP. 1992. Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nat. Genet.* **1**:267-272.
163. Cicila GT, Rapp JP, Wang JM, St-Lezin E, and Kurtz TW. 1993. Linkage of 11 β -hydroxylase mutations with altered steroid biosynthesis and blood pressure in the Dahl rat. *Nat. Genet.* **3**:346-353.

164. Frantz,S.A., Kaiser,M., Gardiner,S.M., Gauguier,D., Vincent,M., Thompson,J.R., Bennett,T., and Samani,N.J. 1998. Successful isolation of a rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus in reciprocal congenic strains. *Hypertension* 32:639-646.
165. Sturtevant AH. 1925.The effects of unequal crossing-over at the *bar* locus in *Drosophila*. *Genetics* 10:117-147.
166. Behringer R. 1997. Supersonic congenics? *Nat. Genet.* 17:108.
167. Sinnot EW, Dunn LC, and Dobzhansky TH. Principles of genetic. 108-110. 1950. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc.
168. Zerba KE and Sing CF. 1993.The role of genome type-environment interaction and time in understanding the impact of genetic polymorphisms on lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol* .4:152-162.
169. Hamet P. 1999. Genes and hypertension : where we are and where we should go. *Clin.And Exper.Hypertension* 21(5&6):947-960.
170. Dominiczak AF and Lindpainter K. 1994. Genetics of hypertension: a current appraisal. *News Physiol .Sci* .9:246-251.

