

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

Localisation de loci à trait quantitatif pour l'hypertension  
sur les chromosomes 17 et 16 du rat Dahl *Salt-Sensitive*

par

Chenda Duong

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 2007

© Chenda Duong, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

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

présenté par :  
Chenda Duong

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Ali Ahmad  
président-rapporteur

Dr. Alan Y. Deng  
directeur de recherche

Dr. Pavel Hamet  
co-directeur de recherche

Dr. Gaétan Thibault  
membre du jury

## RÉSUMÉ

L'hypertension essentielle est une augmentation sévère de la pression artérielle (PA) à 140/90 mm Hg. Notre étude comprend trois objectifs : (1) diminuer la longueur des régions des *QTLs* sur les chromosomes 17 (C17*QTL1*) et 16 (C16*QTL1*), (2) identifier les gènes inclus dans ces *QTLs*, et (3) étudier la PA pour des allèles hétérozygotes pour C17*QTL1* et C16*QTL1*. *Méthodes* : Des souches congéniques avec un arrière-plan génétique hypertendu, sauf pour une région normotendue (LEW) sur le chromosome à l'étude, sont croisées avec des rats hypertendus Dahl *salt-sensitive* (DSS). Pour identifier un *QTL* lié à la PA sur les chromosomes 17 et 16, des sous-souches congéniques sont construites et de nouveaux marqueurs microsatellites sont recherchés. *Résultats* : Nous avons réduit la région de C17*QTL1* de 34,8 Mb à 1,6 Mb avec 6 gènes candidats. Par contre, nous n'avons pas diminué la région de C16*QTL1* de 2,16 Mb, maintenant de 2,19 Mb et avec 29 gènes. Les études d'allèles hétérozygotes montrent que C17*QTL1* suit un effet de dose réponse et que l'allèle LEW de C16*QTL1* agit de façon dominante par rapport à l'allèle DSS. *Conclusion* : C17*QTL1* correspond à un des 6 gènes et représente un nouveau gène dans la détermination de la PA. La région de C16*QTL1* doit être réduite davantage. L'utilisation de sous-souches congéniques nous a permis de trouver la localisation exacte du *QTL* associé à la PA, d'augmenter sa résolution et de valider ou d'invalider un gène candidat à être un *QTL*. De plus, puisque certains gènes présents dans C17*QTL1* et C16*QTL1* ont des homologies avec les gènes humains, l'identification exacte de ces *QTLs* va faciliter la découverte des *QTLs* associé à l'hypertension essentielle chez l'humain.

**Mots clés:** Hypertension essentielle, pression artérielle, lignée congénique, rat Dahl *salt-sensitive*, chromosome 17, chromosome 16, *QTL*, hétérozygote.

## ABSTRACT

Essential hypertension is an increase of blood pressure (BP), over 140/90 mm Hg. The goal of our studies is three fold: (1) to reduce the QTLs area on chromosome 17 (C17QTL1) and 16 (C16QTL1), (2) to identify the genes include in these QTLs area, and (3) to study BP for heterozygous alleles for C17QTL1 and C16QTL1. *Design & methods:* Congenic strains with a hypertensive genetic background, except for an area on the chromosome which is normotensive (LEW), were crossed with hypertensive Dahl salt-sensitive (DSS). To identify a QTL linked to BP on chromosomes 17 and 16, congenic sub-strains were constructed and new microsatellites markers were found. *Results:* We have reduced the area of C17QTL1 from 34.8 Mb to 1.6 Mb and have 6 candidates genes. But, we haven't reduced the area of C16QTL1, initially 2.16 Mb and now 2.19 Mb with 29 genes. Heterozygous alleles have showed us that C17QTL1 follow a dosage effect and that LEW allele of C16QTL1 acts in a dominant way. *Conclusions:* C17QTL1 corresponds to one of the 6 genes, and represent a new gene in determination of BP. C16QTL1 area has to be reduced more. Use of congenics allows us to find the exact localisation of the QTL associated to BP, to increase their resolution, and to valid or invalid a candidate gene to be a QTL. Because some of C17QTL1 and C16QTL1 genes have a homologue with human genes, the exact identification of these QTLs will facilitate the discovery of a QTL associated to essential hypertension in human.

**Key words:** Essential hypertension, blood pressure, congenic strain, Dahl salt-sensitive rat, chromosome 17, chromosome 16, QTL, heterozygous.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé & Abstract .....	i
Table des matières .....	iii
Liste des figures .....	viii
Liste des tableaux .....	x
Liste des abréviations .....	xi
Remerciement .....	xiv

### Chapitre I - INTRODUCTION

#### 1. HYPERTENSION

1.1 Pression artérielle .....	2
1.1.1 Mécanismes de régulation de la PA .....	3
1.1.1.1 Système nerveux autonome .....	4
1.1.1.2 Facteurs vasoconstricteurs/ vasodilatateurs .....	4
1.1.1.3 Système rénine-angiotensine-aldostérone .....	5
1.1.2 Le rein .....	7
1.2 Hypertension artérielle .....	8
1.2.1 Épidémiologie .....	8
1.2.2 Formes d'hypertension .....	9
1.2.2.1 Chez la femme .....	9
1.2.2.2 Monogénique ou mendélien .....	10
1.2.2.3 Secondaire .....	12
1.2.2.4 Primaire ou Essentielle .....	12
1.2.3 Hypertension et facteurs environnementaux .....	13
1.2.3.1 Obésité .....	13
1.2.3.2 Alcool .....	14
1.2.3.3 Stress .....	14
1.2.3.4 Exercice physique .....	15
1.2.3.5 Sensibilité au sel .....	15
1.3 Membrane plasmique et transport d'ions .....	16
1.3.1 Homéostasie entre sodium et potassium .....	16

1.3.2 Rôle des stéroïdes cardiotoniques endogènes .....	17
1.3.3 Rôle du calcium .....	17
1.4 Traitement contre l'hypertension .....	18
1.4.1 Modification au mode de vie .....	19
1.4.2 Traitement pharmacologique .....	19
<b>2. GÉNÉTIQUE DE L'HYPERTENSION</b>	
2.1 Aspect génétique .....	21
2.1.1 Pourquoi étudier les facteurs génétiques .....	21
2.1.2 Trait complexe, quantitatif et polygénique .....	21
2.1.3 Locus à trait quantitatif ou QTL .....	22
2.2 Approche génétique .....	23
2.2.1 Marqueurs polymorphiques .....	23
2.2.2 Stratégies .....	24
2.2.2.1 Par gène candidat .....	24
2.2.2.2 Par criblage du génome entier ( <i>genome-wide</i> ) .....	25
2.2.3 Analyse de liaison génétique ( <i>Linkage analysis</i> ) .....	26
2.2.4 Étude d'association .....	27
2.3 Modèle animal .....	28
2.3.1 Le rat .....	29
2.3.2 Souches consanguines pour l'hypertension .....	30
2.3.3 Les souches Dahl et les souches normotendues .....	31
2.3.4 L'hypertension chez le rat .....	33
<b>3. ISOLATION D'UN QTL POUR L'HYPERTENSION</b> .....	34
3.1 Détection et estimation de la location d'un QTL .....	35
3.2 Confirmer la présence du QTL .....	36
3.2.1 Lignées congéniques .....	36
3.2.2 Cartographie du chromosome .....	39
3.2.2.1 Carte génétique .....	39
3.2.2.2 Carte physique .....	40
3.2.2.3 Carte d'homologie .....	41

3.3 Cartographie pointue de la région .....	41
3.4 Identification des gènes .....	44
3.4.1 Mutation .....	44
3.4.2 Niveau d'expression .....	45
3.4.3 Essais <i>in vivo</i> .....	46
<b>4. CHROMOSOMES 17 ET 16 DE <i>Rattus norvegicus</i></b>	
4.1 Chromosome 17 .....	48
4.1.1 Études précédentes .....	49
4.2 Chromosome 16 .....	54
4.2.1 Études précédentes .....	54

## **Chapitre II – PROJET DE RECHERCHE**

<b>PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>57</b>
----------------------------------	-----------

## **Chapitre III – MÉTHODOLOGIE**

### **5. MESURE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE**

5.1 Animal .....	60
5.2 Souche congénique et sous-souche .....	60
5.3 Marqueurs microsatellites polymorphes .....	61
5.4 Télémétrie .....	62
5.5 Analyse statistique .....	63
5.6 QTL hétérozygote .....	64

## **Chapitre IV – RÉSULTATS**

### **6. PRESSION ARTÉRIELLE DES CONGÉNIQUES**

6.1 Lignées congéniques .....	66
6.1.1 Chromosome 17 .....	66
6.1.2 Chromosome 16 .....	71



6.2 Mesure de la pression artérielle .....	74
6.2.1 Chromosome 17 .....	75
6.2.2 Chromosome 16 .....	78
<b>7. HOMOLOGIE AVEC L'HUMAIN ET LA SOURIS .....</b>	<b>81</b>
7.1 Chromosome 17 .....	81
7.2 Chromosome 16 .....	83
<b>8. QTLs HÉTÉROZYGOTES .....</b>	<b>85</b>
8.1 Chromosome 17 .....	85
8.2 Chromosome 16 .....	87

## Chapitre V – DISCUSSION

<b>9. CRITIQUE DE LA MÉTHODE .....</b>	<b>90</b>
9.1 Construction de congénique .....	90
9.1.1 Choix du modèle animal .....	90
9.1.2 Le rat vs la souris .....	90
9.1.3 Souches congéniques .....	91
9.1.3.1 DSS et LEW .....	91
9.1.3.2 Arrière-plan génétique .....	92
9.2 Marqueurs microsatellites .....	92
9.3 Mesure de la PA .....	93
9.4 Approche statistique .....	94
<b>10. ANALYSE DES RÉSULTATS .....</b>	<b>95</b>
10.1 QTL .....	95
10.1.1 C17QTL1 .....	95
10.1.2 C16QTL1 .....	96
10.2 Carte d'homologie .....	97
10.2.1 C17QTL1 .....	97
10.2.2 C16QTL1 .....	99

10.2.3 Gènes candidats .....	100
10.3 <i>QTLs</i> hétérozygotes .....	101
10.4 <i>QTL</i> comme un trait monogénique .....	102
10.5 Reproductibilité de l'expérience .....	103
<b>11. FACTEURS GÉNÉTIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX .....</b>	<b>104</b>
11.1 Facteurs environnementaux .....	104
11.1.1 Sexe de l'animal .....	104
11.1.2 Âge de l'animal .....	105
11.1.3 Diète de l'animal .....	105
11.2 Facteurs génétiques .....	106
11.2.1 Arrière-plan génétique DSS et LEW .....	106
11.2.2 Effet de position .....	107
11.3 Hypertension multifactorielle .....	108
11.3.1 Interaction gène-environnement .....	108
11.3.2 Interaction gène-gène .....	109
<b>12. DE L'ANIMAL À L'HUMAIN .....</b>	<b>111</b>

## **Chapitre VI – CONCLUSIONS**

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>113</b>
-------------------------	------------

## **Chapitre VII – ANNEXE**

<b>ANNEXE A .....</b>	<b>116</b>
-----------------------	------------

## **Chapitre VIII – BIBLIOGRAPHIE**

<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>119</b>
----------------------------	------------

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. *Système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA).*

Figure 2. *Cascade moléculaire impliquée dans la contraction des muscles lisses des artères par un excès de sodium et un déficit en potassium.*

Figure 3. *Représentation schématique de la construction d'une souche congénique.*

Figure 4. *Représentation schématique de la construction d'une souche congénique par la méthode du « speed congenic ».*

Figure 5. *A Représentation schématique de la construction d'une sous-souche congénique. B Cartographie des fragments de la région du QTL et leur effet.*

Figure 6. *Caryotype de Rattus norvegicus. Chromosome 17.*

Figure 7. *A Régions homologues du chromosome 17 de Rattus norvegicus avec Homo sapiens. B Régions homologues du chromosome 17 de Rattus norvegicus avec Mus musculus.*

Figure 8. *Résultats d'après Deng Y. A. et al., publiés en 1994<sup>130</sup>. Identification d'un QTL pour la PA sur le chromosome 17 par analyse de liaison génétique.*

Figure 9. *Résultats d'après Garrett M. R. et al., publiés en 1998<sup>109</sup>. A Identification d'un QTL pour la PA sur le chromosome 17 par analyse de liaison génétique. B Valeurs de la PAM pour DSS (ou S) et le congénique.*

Figure 10. *Résultats d'après Grondin M. et al., publiés en 2005<sup>132</sup>. Carte génétique et physique de l'intervalle du QTL de l'hypertension pour le chromosome 17 du rat Dahl salt-sensitive.*

Figure 11. *Caryotype de Rattus norvegicus. Chromosome 16.*

Figure 12. *A Régions homologues du chromosome 16 de Rattus norvegicus avec Homo sapiens. B Régions homologues du chromosome 16 de Rattus norvegicus avec Mus musculus.*

Figure 13. *Résultats d'après Garrett M. R. et al., publiés en 1998<sup>109</sup>. Identification d'un QTL pour la PA sur le chromosome 16 par analyse de liaison génétique.*

Figure 14. *Résultats d'après Moujahidine M. et al., publiés en 2003<sup>135</sup>. Carte physique de l'intervalle du QTL de l'hypertension pour le chromosome 16 du rat Dahl salt-sensitive.*

Figure 15. *Carte physique du chromosome 17.*

Figure 16. *Carte physique du chromosome 16.*

Figure 17. *De A à F. Graphique de la PA pour les souches congéniques du chromosome 17.*

Figure 18. *De A à F. Graphique de la PA pour les souches congéniques du chromosome 16.*

Figure 19. *Carte d'homologie du chromosome 17 pour C17QTL1.*

Figure 20. *Carte d'homologie du chromosome 16.*

Figure 21. *Carte du chromosome 17 démontrant l'aspect hétérozygote du QTL1.*

Figure 22. *Graphique de la PA pour les souches hétérozygotes pour le QTL1 du chromosome 17.*

Figure 23. *Carte du chromosome 16 démontrant l'aspect hétérozygote du QTL.*

Figure 24. *Graphique de la PA pour les souches hétérozygotes pour le QTL du chromosome 16.*

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. *Médicaments antihypertenseurs.*

Tableau II. *Lignées de rats développées sélectivement pour l'étude de l'HTAe.*

Tableau III. *Marqueurs microsatellites polymorphes D17Chm entre DSS et LEW pour le chromosome 17.*

Tableau IV. *Marqueurs microsatellites polymorphes D17Rat, D17Got, D17Mgh, D17Mit, D17Mco, D17Uia, D17Wox et autres entre DSS et LEW pour le chromosome 17.*

Tableau V. *Marqueurs microsatellites polymorphes D17Chm entre DSS et LEW pour le chromosome 16.*

Tableau VI. *Marqueurs microsatellites polymorphes D16Rat, D16Got, D16Mit et D16Uia entre DSS et LEW pour le chromosome 16.*

Tableau VII. *Résumé des moyennes de la PAM pendant 11 jours pour chaque sous-souche congénique du 17 et des souches témoins DSS et LEW.*

Tableau VIII. *Résumé des moyennes de la PAM pendant 11 jours pour chaque sous-souche congénique du 16 et des souches témoins DSS et LEW.*

Tableau IX. *Méthodes de mesure de la pression artérielle.*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	Hormone adrénocorticotropique ( <i>Adrenocorticotropic hormone</i> )
AVC	Accident vasculaire cérébral
ADN	Acide désoxyribonucléique
Agtr1a	Gène du récepteur de type 1a de l'angiotensine II ( <i>Angiotensin II receptor, type 1a gene</i> )
Agtr1b	Gène du récepteur de type 1b de l'angiotensine II ( <i>Angiotensin II receptor, type 1b gene</i> )
Agtr2	Gène du récepteur de type 2 de l'angiotensine II ( <i>Angiotensin II receptor, type 2 gene</i> )
ANF	Facteur natriurétique atrial ( <i>Atrial natriuretic factor</i> )
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
ARN	Acide ribonucléique
ARNs	Acide ribonucléique simple brin
ATPase	Adénosine triphosphatase
AT <sub>1</sub>	Récepteur spécifiques de type I
AT <sub>1A</sub>	Récepteur spécifiques de type I A
AT <sub>1B</sub>	Récepteur spécifiques de type I B
AT <sub>2</sub>	Récepteur spécifiques de type II
BAC	Chromosome artificiel de bactérie ( <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> )
BC	Croisement en retour ( <i>Backcross</i> )
BN	<i>Brown-Norway</i>
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	Ion calcium à l'intérieur de la cellule
CC	Souche congénique originale homozygote
Cl <sup>-</sup>	Ion Chlore
Chr	Chromosome
<i>Chrm3</i>	<i>cholinergic receptor, muscarinic 3</i>
cM	Centimorgan
<i>Cmbp</i>	<i>cytomatrix protein p110</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CR	Hétérozygote

<i>Dip2c</i>	<i>disco-interacting protein 2 homolog C</i>
DSS	Dahl <i>salt-sensitive</i>
DSR	Dahl <i>salt-resistant</i>
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ET <sub>1</sub>	Endothéline 1
F	Génération
g	Gramme
Gb	Gigabase
Gca	Récepteur à peptide natriurétique atrial ( <i>guanylyl cyclase-coupled A receptor</i> )
GH	<i>Genetically hypertensive</i>
GPCR	Récepteurs à sept domaines trans-membranaires couplés à des protéines G ( <i>G-protein coupled receptors</i> )
Gtpbp4	<i>GTP binding protein 4</i>
H <sup>+</sup>	Ion hydrogène
HTA	Hypertension artérielle
HTAe	Hypertension artérielle essentielle
IP3	Inositol-1-4-5-triphosphate
K <sup>+</sup>	Ion potassium
Kb	Kilobase
kg	Kilogramme
KK	Kinine-kallicréine
L, LEW	Lewis
<i>Larp5</i>	<i>La ribonucleoprotein domain family, member 5</i>
LH	<i>Lyon hypertensive</i>
LOD	<i>Log of the odds</i>
Mb	Mégabase
mg	Milligramme
MHS	<i>Milan hypertensive</i>
MNS	<i>Milan normotensive</i>
mm Hg	Millimètre de mercure
mL	Millilitre
mV	Potentielle membranaire
Na <sup>+</sup>	Ion sodique
Na <sup>+</sup> <sub>i</sub>	Ion sodium à l'intérieur de la cellule

NaCl	Chlorure de sodium
NCC	Cotransporteur de Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> (Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> cotransporter)
NCX1	Pompes Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> de type 1 ( <i>sodium-calcium exchanger type 1</i> )
NO	Monoxyde d'azote
O <sub>2</sub>	Monoxyde d'oxygène
PA	Pression artérielle
PAD	Pression artérielle diastolique
PAM	Pression artérielle moyenne
PAS	Pression artérielle systolique
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PIP2	Phosphatidylinositol diphosphate
QTL	Locus à trait quantitatif ( <i>quantitative trait locus</i> ).
SBH	<i>DOCA salt-sensitive (Sabra hypertensive)</i>
SCT	Stéroïdes cardiotoniques endogènes
SHR	<i>Spontaneous hypertensive rats</i>
SNC	Système nerveux centrale
SNS	Système nerveux sympathique
SNPS	Système nerveux parasymphatique
SNP	Polymorphisme mono-site ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
RAA	Rénine-angiotensine-aldostérone
RFLP	Polymorphisme de longueur de fragment de restriction ( <i>Restricted Fragment Length Polymorphism</i> )
RGSPC	<i>Rat Genome Sequencing Project Consortium</i>
RR	Souche receveuse hypertendue homozygote
UV	Ultraviolet
WHO	Organisation mondiale de la santé ( <i>World Health Organisation</i> )
WKY	<i>Wistar-Kyoto</i>
<i>Zmynd11</i>	<i>zinc finger, MYND domain containing 11</i>



**Un gros merci!**

CHAPITRE I

# INTRODUCTION

# 1- HYPERTENSION

## 1.1 Pression artérielle

L'hypertension est causée par une pression sanguine trop élevée. La pression sanguine correspond à la force hydrostatique que le sang exerce contre la surface de la paroi des vaisseaux sanguins. Étant donné que la pression sanguine des artères est toujours plus élevée que dans les veines, on parle de pression artérielle (PA) <sup>1</sup>. L'unité de mesure de la pression sanguine ou de la PA est le millimètre de mercure (mm Hg).

Chaque cycle cardiaque est appelé révolution cardiaque et comprend deux phases alternantes, la systole et la diastole <sup>1</sup>. En moyenne, chez une personne au repos, la révolution cardiaque dure environ 0,8 seconde. À chaque battement du cœur, environ 70 mL de sang est propulsé vers les artères.

Au cours de la systole, les ventricules se contractent et le sang se vide pour être expulsé vers les artères. Le volume du sang expulsé est égal au volume entrant dans les artères. Le sang exerce alors une pression maximale sur les parois des artères qu'on nomme pression artérielle systolique (PAS). La PAS varie entre 120 et 130 mm Hg pour une personne en santé. Au cours de cette phase, le sang irrigue les organes.

La diastole représente la phase où les ventricules se remplissent. Le cœur est au repos et le sang arrive des veines. Les artères de leur côté, ne reçoivent plus de sang mais continuent à en perdre. La pression artérielle diastolique (PAD) baisse, et ce juste avant que commence la systole. La PAD se situe autour de 80 mm Hg. En autre terme, la PAD est la pression sur les parois après le passage du sang.

La PA est toujours ajustée de façon à assurer l'écoulement du sang vers les tissus et les organes pour leur fournir l'apport nécessaire en oxygène et en nutriment. Chez

une personne en santé, la PA optimale oscille autour de 120/80 mm Hg. Étant donné qu'au repos, la diastole occupe les deux tiers du cycle cardiaque contre un tiers pour la systole, la PA moyenne (PAM) correspond à la formule suivante : pression diastolique + (pression différentielle/3) <sup>2</sup>. La pression différentielle étant la différence entre la PAS et la PAD. Ainsi, avec 120/80 mm Hg, la PAM est 93 mm Hg.

***PA dépend du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique totale*** Le débit cardiaque est la vitesse du sang éjecté par minute. Il dépend de la fréquence cardiaque et du volume systolique. La résistance périphérique varie en fonction du diamètre des artéioles et de la friction du sang sur les parois. La paroi des vaisseaux sanguins est composée de trois couches : la tunique externe composée de fibres de collagène et de fibres élastiques qui permettent aux vaisseaux de se dilater sous la pression; la tunique moyenne composée de muscles lisses et de fibres élastiques; et l'endothélium. C'est au niveau des artères et des artéioles que la résistance périphérique est la plus importante, tout d'abord à cause de leur petit diamètre, puis de leur couche épaisse de muscle lisse. La contraction de ces vaisseaux diminue leur circonférence et augmente la résistance vasculaire, c'est la vasoconstriction. À l'opposer, la vasodilatation est l'augmentation de la circonférence de la paroi due au relâchement des muscles lisses. L'écoulement se fait facilement et la résistance diminue.

### **1.1.1 Mécanismes de régulation de la pression artérielle**

La régulation de la PA est assurée par les ajustements du débit cardiaque, de la résistance vasculaire périphérique totale et du volume sanguin. La PAM doit être contrôlée pour deux raisons : elle doit être suffisamment haute pour assurer l'écoulement du sang, sinon le cerveau et les autres tissus ne recevraient pas une quantité adéquate de sang; et elle ne doit pas être trop haute pour que le travail du cœur ne soit pas excessif et pour que le risque de dégâts vasculaires pouvant aller jusqu'à la rupture soit réduit <sup>2</sup>. L'augmentation de la PA est directement proportionnelle à une vitesse d'écoulement du sang plus grande et à une résistance vasculaire plus grande. Tel est le cas chez une personne hypertendue.

Les facteurs qui influencent l'activité contractile du muscle lisse artériolaire peuvent être locaux ou extrinsèques. Les facteurs locaux sont sécrétés par les cellules pour

permettre des ajustements du débit selon les besoins métaboliques de l'organe, alors que les facteurs extrinsèques exercent un effet vasomoteur pour la régulation de la PA. Les facteurs extrinsèques sont nerveux (stimuli chimiques) et hormonaux, ce qui implique la participation du système nerveux. En effet, les muscles lisses sont richement innervés par des terminaisons sympathiques. Ces facteurs et stimuli peuvent avoir une activité vasoconstrictrice ou vasodilatatrice.

#### 1.1.1.1 Système nerveux autonome

Le système nerveux autonome, composé du système nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNPS) jouent un rôle important dans la régulation de la PA. Suite à un stress ou une activité physique intense, le SNS augmente le débit cardiaque et stimule une vasoconstriction des vaisseaux, ce qui entraîne une augmentation normale de la PA. Au repos, le SNPS est activé, conduisant ainsi à une diminution du débit cardiaque et de la PA. La surveillance continue de la PA est assurée par des barorécepteurs qui sont sensibles aux variations de la PA. En cas de chute de pression, l'information est transmise au système nerveux central et à l'hypothalamus qui augmentent la production de molécules vasoconstrictrices. Les barorécepteurs se retrouvent principalement au niveau du sinus carotidien, de la crosse aortique et de l'oreillette droite du cœur. Les barorécepteurs carotidiens surveillent la pression dans les artères irriguant le cerveau, et les barorécepteurs aortiques surveillent la pression des principales artères qui alimentent le reste de l'organisme. La PA est alors maintenue à son niveau normal.

#### 1.1.1.2 Facteurs vasoconstricteurs/ vasodilatateurs

En général, s'il y a vasodilatation dans une région, il faut qu'il y ait vasoconstriction ailleurs à débit cardiaque inchangé, et vice versa. Ainsi, la PA ne baisse pas et le cerveau et les autres organes sont bien irrigués.

La vasoconstriction des vaisseaux, responsable de l'augmentation de la PA, est dictée par plusieurs systèmes. L'endothéline 1 (ET<sub>1</sub>), un neuropeptide sécrété par l'endothélium vasculaire, induit une vasoconstriction très puissante, capable de durer jusqu'à 3 heures sur les cellules musculaires lisses de la paroi des artères. Le

système rénine angiotensine aldostérone (RAA) est un autre système vasoconstricteur (voir section 1.1.1.3).

Parmi les vasodilatateurs bien connus, il y a le monoxyde d'azote (NO), une petite molécule de courte durée de vie, à action locale. L'acétylcholine, synthétisé par les terminaisons nerveuses, agit comme médiateur sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pour libérer le NO, responsable du relâchement du muscle lisse artériolaire et l'augmentation de la circulation sanguine. Son inhibition produit une séquence d'évènement caractéristique de l'hypertension artérielle essentielle. Le facteur natriurétique atrial (ANF) s'oppose aux effets vasoconstricteurs de la noradrénaline et de l'angiotensine II en inhibant la libération de la rénine et de l'aldostérone. Le système kinine-kallicréine (KK), similaire au système RAA, libère des peptides aux propriétés vasodilatatrices comme la kinine et la bradykinine. Chez les individus hypertendus, l'activité enzymatique de la kallicréine pour cliver le précurseur de la kinine, est réduite<sup>3</sup>. D'autres molécules impliquées dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins sont : l'histamine, un médiateur local sur les muscles lisses et les  $\alpha$ -bloquants/ $\beta$ -bloquants qui bloquent l'effet constricteur de l'adrénaline.

Plusieurs mécanismes métaboliques peuvent influencer la circonférence des vaisseaux. L'activation des récepteurs adrénergiques par l'adrénaline (ou le noadrénaline) influence le rythme cardiaque, la contraction du coeur et la rigidité vasculaire. L'effet vasoconstrictrice ou vasodilatateur dépendra du sous-type de récepteur activé ( $\alpha$  ou  $\beta$ ). La température auquel l'organisme s'expose peut également influencer. Le froid va entraîner la vasoconstriction, alors que le chaud va entraîner la vasodilatation. Il y a aussi les modifications chimiques locaux, comme les concentrations de  $O_2$  et de  $CO_2$ .

### 1.1.1.3 Système rénine-angiotensine-aldostérone

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA) (Figure 1) est le principal complexe de régulation de la PA et du maintien de l'homéostasie hydrosodée (équilibre entre les ions  $Na^+$  et l'eau)<sup>3,4</sup>. En effet, suite à la perte de fluides ou d'une baisse de la pression, le système RAA est activé. Il s'agit d'un système hormonal par lequel des réactions de dégradations enzymatiques ont lieu.

La rénine a été isolée à partir du rein de lapin et identifiée comme une substance influençant la PA, en 1898 par Tigerstedt et Bergman <sup>5</sup>. Cette protéase rénine est sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire du rein vers la circulation, pour convertir l'angiotensinogène du foie en angiotensine I (Ang I). Lors du transit par la circulation pulmonaire, Ang I est clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), une carboxypeptidase, pour générer l'angiotensine II (Ang II). L'Ang II est la principale hormone vasoactive du système RAA, responsable de la vasoconstriction, de la stimulation de la sécrétion d'aldostérone de la glande corticosurrénale, et de la réabsorption sodique par le rein. Le système RAA agit dans la circulation, mais il existe aussi dans plusieurs tissus et organes. Par exemple, la conversion de l'Ang II à partir de son précurseur peut se faire à partir d'une sérine protéase connue sous le nom de chymase, principalement retrouvé dans les ventricules cardiaques <sup>3</sup>.

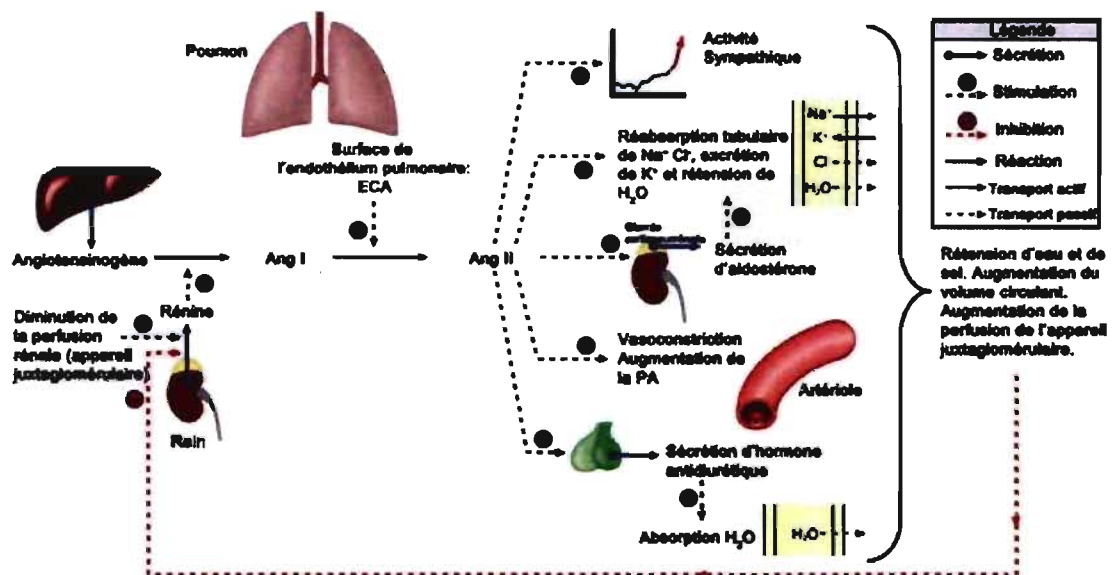


Figure 1. Système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA).

(Figure provenant de [http://en.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotensin\\_system](http://en.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotensin_system))

L'action de l'Ang II est effectuée via leur liaison à des récepteurs spécifiques de type I ( $AT_1$ ) et de type II ( $AT_2$ ) situés sur la membrane plasmique des cellules cibles <sup>6</sup>. Ces récepteurs sont très ubiquitaires et font partie de la superfamille des récepteurs à sept domaines trans-membranaires couplés à des protéines G (GPCR) <sup>7</sup>. Ils sont traduits via les gènes *Agtr1a*, *Agtr1b* et *Agtr2*. Chez le rat et la souris, il

existe deux sous-types du récepteur  $AT_1$  :  $AT_{1A}$  et  $AT_{1B}$ <sup>7</sup>. Ils diffèrent par leur distribution tissulaire et par leur mode de régulation. La stimulation des récepteurs  $AT_1$  est responsable de la plupart des effets physiologiques et physiopathologiques de l'angiotensine II : la vasoconstriction, la stimulation de la synthèse d'aldostérones, la rétention rénale de  $Na^+$  et d'eau, et l'activation du SNS<sup>6,7</sup>. Le rôle des récepteurs  $AT_2$  est encore mal caractérisé, mais semble s'opposer aux effets des récepteurs  $AT_1$ , *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*<sup>6,7</sup>.

Le système RAA agit en concert avec d'autres systèmes veillant au maintien de la pression et des fluides, comme le système nerveux sympathique. Il constitue une contrebalance aux systèmes de vasodilatation comme les peptides natriurétiques produits par le cœur<sup>8</sup> et le système kinine-kallicréine<sup>9</sup>. Cet équilibre est essentiel pour le fonctionnement normal du rein et de l'homéostasie de la pression. Chez la majorité des patients qui suivent un traitement avec des inhibiteurs d'ECA ou des antagonistes de récepteurs Ang II, une diminution de la PA est observée. Toutefois, la PA baisse aussi avec certains traitements qui activent le système RAA<sup>8</sup>. Le système RAA contribue sans aucun doute à l'augmentation de la PA, mais ne constitue pas la seule cause de l'hypertension<sup>8</sup>.

### 1.1.2 Le rein

Les reins jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la pression sanguine. Bien que les reins représentent moins de 1% de la masse corporelle de l'humain, ils reçoivent environ 20% du sang propulsé par chaque battement de cœur<sup>1</sup>. Une telle proportion du débit cardiaque permet aux reins de filtrer et d'excréter l'urine, pour maintenir l'équilibre hydroélectrolytique (homéostasie) du sang et de l'organisme en général. Le rein est l'organe qui sécrète la rénine, principale enzyme dans le déclenchement du système RAA. Lorsque le niveau de sel absorbé augmente, le volume sanguin augmente aussi, ce qui induit une élévation de la pression sanguine et donc de la dilatation des vaisseaux. Pour retrouver l'équilibre, les systèmes et les molécules vasoconstrictrices vont être stimulés, ramenant le tout à la normal. Des reins normaux minimisent ces élévations de fluide extracellulaire dues au sel, et minimise ainsi les élévations de pression sanguine. L'hypertension et le système rénal sont intimement liés l'un à l'autre. La présence d'une élévation de la PA est très souvent présente chez les personnes atteintes de maladies rénales, et est un



facteur de risque pour la progression de maladies rénales <sup>10</sup>. De plus, chez le rat <sup>11</sup> et l'humain <sup>12</sup>, une transplantation d'un rein d'un donneur normotendu à un receveur hypertendu réduit la pression sanguine de façon significative. Ce résultat interprète clairement la relation entre le rein et la pathogenèse de l'hypertension.

## **1.2 Hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle (HTA) est définie par une augmentation sévère de la pression sanguine. Au repos, l'HTA est en permanence supérieure à 140/90 mm Hg. Le cœur travaille plus fort et les chances d'avoir une attaque et des problèmes rénaux sont plus grandes. Il s'agit d'un déséquilibre de la résistance périphérique des vaisseaux et/ou du flux de volume sanguin circulant. Malgré tout, l'HTA est une maladie asymptomatique. Il y a trois niveaux d'HTA : niveau 1 avec des mesures allant de 140-159/90-99 mm Hg, le niveau 2 allant de 160-179/100-109 mm Hg, et le niveau 3 allant de 180/110 mm Hg et plus. Une mesure exacte de la PA est difficile à obtenir étant donné que la pression varie beaucoup à court terme. Les mesures prises en absence d'un professionnel de la santé sont généralement plus fiables, car celui-ci peut causer un stress qui augmente la pression. On parle également d'hypotension artérielle, lorsque la pression est inférieure à 100/60 mm Hg.

### **1.2.1 Épidémiologie**

L'HTA est un problème de santé publique important et constitue un fardeau économique pour la société. Elle affecte plus de 1 milliard de personnes dans le monde entier et est impliquée dans la mort de 7,1 millions de personnes par année ([www.who.int/en/index.html](http://www.who.int/en/index.html)). En effet, elle constitue un facteur de risque majeur pour plusieurs causes de morbidité et mortalité incluant l'accident vasculaire cérébral (AVC), l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et les dysfonctionnements rénaux avancés.

En 2000, 26,4% (972 millions) des adultes étaient hypertendus; une projection en 2025 amène ce chiffre à 29,2% (1,56 milliard) <sup>13</sup>. Ces valeurs sont probablement sous-estimées, si l'on tient compte de la rapidité à laquelle les modes de vie

changent dans certains pays, comme la Chine et l'Inde. Certaines données suggèrent une stabilisation ou une diminution de la prévalence à l'HTA dans les pays développés, par contre, une forte augmentation est observée dans les pays en développement <sup>13-14</sup>.

De plus, le risque d'être atteint d'HTA augmente avec l'âge; 50% des gens âgés de 65 ans et plus sont hypertendus. Des études ont démontré que chez les 55 à 65 ans, qui présentent une PAM normale, 90% d'entre eux vont développer l'HTA au cours de leur vie, homme et femmes confondus <sup>15</sup>.

Même si l'HTA est un facteur de risque important pour plusieurs maladies du cœur et du rein, et qu'elle affecte un grand nombre de personnes, les causes de la maladie et les mécanismes qui la contrôlent restent encore aujourd'hui relativement peu connus.

## **1.2.2 Formes d'hypertension**

### **1.2.2.1 Chez la femme**

En règle générale, les hommes sont plus concernés par l'HTA que les femmes. La différence est de l'ordre de 6 à 7 mm Hg pour la PAS et de 3 à 5 mm Hg pour la PAD. Néanmoins, cette différence s'annule à partir du moment où les femmes sont ménopausées <sup>16</sup>. Même situation pour leur pouls; plus faible que celui des hommes avant l'âge de 40 ans, mais plus élevé après 40 ans <sup>17</sup>. Le débit cardiaque, par contre, demeure plus élevé que les hommes durant toute leur vie à cause de leur petite stature <sup>17</sup>. La résistance vasculaire périphérique en est donc la cause. À la ménopause, la perte d'œstrogène déclenche une augmentation de la rigidité de la paroi des vaisseaux qui cause une élévation soudaine de la PA et du pouls <sup>18</sup>. La présence d'œstrogène circulant serait responsable de l'élasticité des artères chez les jeunes femmes <sup>18</sup>. Cette hormone sexuelle qui les protège contre des risques d'élévation de la PA n'est pas présente chez l'homme, ce qui explique l'évolution de la pression chez la femme.

L'hypertension chez certaines femmes est également associée à l'utilisation de pilules contraceptives et aux thérapies hormonales durant la ménopause <sup>19</sup>. Une

légère augmentation de la PAS et/ou de la PAD est observée chez ces patientes. Certaines femmes développent pour la première fois une HTA au milieu de leur grossesse. Dans certains cas, la mère et l'enfant peuvent être affectés.

Malheureusement pour les femmes, la réponse aux médicaments anti-hypertensifs n'est pas aussi positive que chez l'homme <sup>19</sup>. La recherche sur l'hypertension est primordiale, et un traitement spécifique au sexe devra éventuellement être élaboré.

#### 1.2.2.2 Monogénique ou mendélien

L'HTA monogénique est une forme rare d'hypertension chez l'humain qui compte pour approximativement 5% de toutes les causes de la maladie. Elle est considérée comme un trait unique parce qu'elle est transmise selon un mode mendélien d'hérédité <sup>20</sup>. Un seul gène défectueux est suffisant pour causer une maladie capable d'augmenter la pression sanguine de façon exagérée. Plusieurs formes monogéniques d'hypertension ont été caractérisées au niveau moléculaire, et tous ces gènes sont impliqués dans le mécanisme de la réabsorption du sodium par les reins <sup>20</sup>.

*L'hyperaldostéronisme familial de type 1* <sup>20</sup>, (*glucocorticoid remediable aldosteronism*) est une atteinte familiale de transmission autosomique dominante associée à une HTA. La production excessive d'aldostérone est liée à l'existence d'un gène chimérique constitué de la séquence promotrice du 11  $\beta$ -hydrolase et de la région codante du gène de l'aldostérone synthase <sup>21, 22</sup>. L'enzyme 11  $\beta$ -hydrolase est régulé par l'hormone ACTH et son expression se limite à la zone fasciculée de la corticosurrénale. L'aldostérone synthase est uniquement exprimé dans la zone glomérulée et est l'enzyme clé dans la synthèse d'aldostérone. L'expression du gène chimérique produit une enzyme chimère capable de synthétiser l'aldostérone dans la zone fasciculée sous la dépendance de l'ACTH plutôt que de l'angiotensine II.

Le *syndrome de Liddle* <sup>20</sup> est une maladie autosomique dominante qui cause une HTA sévère. Chez les personnes atteintes, une activation constitutive du canal épithélial sodique du tube collecteur rénal entraîne une augmentation de l'absorption du sodium dans les reins, qui cause une forte élévation du volume extracellulaire et de

pression sanguine <sup>23</sup>. Il s'agit en fait d'une mutation retrouvée dans la sous-unité  $\beta$  ou  $\gamma$  du canal épithélial sodique, qui diminue sa dégradation <sup>24-26</sup>.

Le *syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes* <sup>20</sup> est un trait autosomique récessif caractérisé par une forte augmentation de cortisol circulant. Dans le plasma, le niveau de cortisol est beaucoup plus élevé que celui de l'aldostérone. Le cortisol peut alors lier le récepteur minéralocorticoïde avec la même affinité que l'aldostérone, mais il est plutôt converti en cortisone par la 11  $\beta$ -hydroxy-stéroïde déshydrogénase. Chez les personnes atteintes du syndrome, une mutation du gène qui code pour l'enzyme diminue son activité, entraînant une exagération de la stimulation des récepteurs minéralocorticoïdes par le cortisol <sup>27</sup> et donc de l'hypertension <sup>28</sup>.

Le *syndrome relié au récepteur minéralocorticoïde* <sup>20, 29</sup> est caractérisé par une mutation (MR<sub>S810L</sub>) qui active le récepteur. La mutation lui confère la possibilité d'activer certaines hormones. L'activation de la cortisone dans les cellules du tube collectif induit une réabsorption persistante du sel, une expansion du volume et de l'HTA.

Le *syndrome de Gordon ou de pseudohypoaldostéronisme de type II* <sup>20</sup> est une maladie autosomique dominante. Deux WNK kinases, WNK4 et WNK1 sont liés au syndrome. Normalement, WNK4 inhibe le cotransporteur de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (NCC), mais une mutation de l'enzyme augmente la réabsorption du sodium, une expansion du volume et de l'HTA <sup>30</sup>. Les mutations entourant WNK1 reste encore à être étudiées.

Quoi qu'il en soit, les formes d'hypertension monogéniques sont rares et n'expliquent pas nécessairement la variabilité à la pression sanguine dans une large population <sup>31</sup>. De plus, des individus atteints d'un même défaut génétique varient dans la sévérité de la maladie, c'est ce qu'on appelle la « pénétrance variable » <sup>32, 33</sup>. Cette différence est attribuée par des facteurs environnementaux, de l'hétérogénéité au locus et des variations des allèles. Toutefois, il a été suggéré que les gènes responsables au développement de ces formes d'hypertension pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de l'hypertension essentielle et permettraient d'élucider de nouveaux mécanismes impliqués dans l'augmentation de la pression <sup>34, 35</sup>. Ces gènes peuvent être de bons gènes candidats.

### 1.2.2.3 Secondaire

L'hypertension secondaire compte pour environ 5 à 10 % des cas d'hypertension. Contrairement à l'hypertension essentielle (primaire) qui est idiopathique, les causes de l'hypertension secondaire sont identifiables et peuvent être traitées. L'hypertension secondaire origine souvent d'un autre problème médical ou d'un dérèglement organique présent chez un patient.

Parmi les causes les plus connues, il y a : la maladie néphropathie parenchymateuse <sup>36</sup> qui peut être considérée comme une cause ou une conséquence de l'hypertension, l'hypertension réno-vasculaire <sup>36</sup> qui est liée à une maladie rénale influençant le rétrécissement des deux artères rénales causé par l'Ang II et le phéochromocytome <sup>36</sup>, une tumeur médulo-surrénalienne sécrétant de la catécholamine qui s'accompagne d'une HTA.

### 1.2.2.4 Primaire ou essentielle

L'hypertension artérielle essentielle (HTAe) est la forme la plus répandue d'hypertension et représente à elle seule 90% des cas. Elle se classe parmi les maladies idiopathiques, c'est-à-dire qui n'a pas de causes apparentes ou caractérisées. L'HTAe est dite « essentielle » parce qu'on croyait auparavant que cette élévation de PA avec l'âge était normale.

L'HTAe est un trait quantitatif complexe qui est affectée par des combinaisons variées d'altérations génétiques complexes et de facteurs environnementaux. Il s'agit en fait d'une forme multifactorielle et polygénique de l'hypertension. Les effets des gènes peuvent être indépendants et donc simplement additif, ou plus complexe et être caractérisés par des phénomènes d'épistasies et de pléiotropies. L'épistasie désigne l'effet interactif de deux ou plusieurs gènes sur un phénotype et la pléiotropie désigne les effets simultanés d'un seul gène sur plusieurs phénotypes. L'hétérogénéité génétique y joue également un rôle. L'exemple le plus classique concerne la réponse à la quantité de sel consommé; chez certains hypertendus, la PA augmente après avoir consommés du sel alors que chez d'autres elle ne varie pas <sup>37</sup>. En plus des facteurs génétiques, il y a des composantes environnementales

qui modifient l'expression de l'hypertension par l'intermédiaire de gènes. Parmi les facteurs environnementaux les plus importants, on retrouve le stress et la diète.

L'HTAe est une maladie complexe qui ne suit pas un patron clair d'hérédité, mais démontre plutôt des cas d'agrégation familiale<sup>38</sup>. Plusieurs facteurs contribuent à la complexité de la transmission de l'HTAe. Il a été démontré qu'une forte pression sanguine, chez les 55 ans et moins, survient 3,8 fois plus souvent pour les individus provenant d'une famille au antécédent hypertendue que ceux aux familles normotendues<sup>39</sup>. De plus, cette régulation peut varier d'un individu à l'autre, selon le variant hérité. Ceci rend la tâche d'identification des causes exactes de l'HTAe beaucoup plus difficile.

### **1.2.3 Hypertension et facteurs environnementaux**

L'HTAe est associée à de nombreux facteurs environnementaux comme l'obésité, la consommation d'alcool, le stress, la sédentarité et la consommation de sel. Ces habitudes de vie sont arrivées avec la modernisation de notre société d'aujourd'hui. En effet, l'hypertension est généralement associée aux pays industrialisés. Certaines données suggèrent une stabilisation ou une diminution de la prévalence à l'HTA dans ces pays développés et une forte augmentation dans les pays en développement<sup>40, 41</sup>. De plus, l'HTA se place au troisième rang des problèmes de santé lié aux mauvaises habitudes de vie<sup>40, 42</sup>. L'HTAe est donc largement déterminée par des facteurs environnementaux.

Dans la pathogénie des traits génétiques complexes, comme la pression sanguine, les facteurs environnementaux ne font pas juste s'ajouter de façon additive aux facteurs génétiques déjà présents<sup>43</sup>. En fait, une variation allélique dans un gène dépend de l'environnement dans lequel le gène est exprimé. La complexité des interactions entre les gènes et l'environnement fait que la compréhension de l'HTAe est toujours limitée.

#### **1.2.3.1 Obésité**

L'obésité est causée par une alimentation trop riche et une sédentarité prolongée. Elle est associée au syndrome métabolique tout comme la résistance à

l'insuline, l'intolérance au glucose et la dyslipidaemia. Des études épidémiologiques ont clairement démontré une relation directe entre la masse corporelle et la PA, peu importe l'ethnie, l'âge, les groupes socio-économiques et le sexe<sup>44, 45</sup>. La corrélation a également été établie, entre la masse corporelle et le développement de l'hypertension<sup>46</sup>. De plus, une réduction de la pression sanguine a été observée chez les obèses hypertendus à la suite d'une diminution du gras viscéral intra-abdominal<sup>47</sup>. Une diminution d'au moins 5 kg chez les adultes obèses peut rapidement diminuer la PA<sup>48</sup>, ce qui suggère que les mécanismes mis en jeu par la perte de poids contribuent à la baisse chronique de la PA.

### 1.2.3.2 Alcool

Une corrélation hautement significative entre la surconsommation d'alcool et le niveau de pression a également été démontrée. Selon l'Organisation mondiale de la santé (*WHO Global Burden of Disease Study*)<sup>49</sup>, 16% de toutes les maladies hypertendues est attribué à la consommation d'alcool. Une étude a également démontré qu'il y avait une augmentation de 40% des risques reliés au développement de l'hypertension chez les personnes qui boivent plus de 25 g d'alcool par jour<sup>50</sup>. Une augmentation approximative de 1 mm Hg correspond à une consommation de 10 g d'alcool<sup>51</sup>. L'effet est toutefois réversible si l'on s'abstient pendant 2 à 4 semaines<sup>51</sup>. De plus, c'est la quantité d'alcool consommé et non le type d'alcool qui est important dans la relation avec la PA. Certaines personnes qui consomment beaucoup peuvent augmenter leur résistance vis-à-vis les thérapies antihypertenseurs<sup>52</sup>.

### 1.2.3.3 Stress

Bien qu'il soit couramment admis que le stress contribue à l'élévation de la tension, les études concluantes sont peu nombreuses. Ceci s'explique par la difficulté à le définir correctement, à le percevoir et à le mesurer<sup>52, 53</sup>. Certains résultats d'études ne permettent pas de reconnaître une association entre le stress psycho-émotionnel et la variabilité de la pression sanguine<sup>52, 54-56</sup>. D'un autre côté, les sujets hypertendus ou pré-hypertendus provenant d'une famille avec des antécédents d'hypertension ont une réponse plus forte à la pression sanguine lorsqu'ils sont exposés au stress, que ceux avec des parents normotendus<sup>57</sup>. De

plus, une souche de rat Wistar, nommé ISIAH, a été sélectionnée pour mesurer la pression sanguine suite à un stress<sup>58</sup>. Les mécanismes entourant le stress semblent être dirigés par des facteurs reliés au mode de vie (diète, exercice, alcoolisme), connu pour avoir un impact direct sur les mécanismes de régulation de la PA. De nouvelles recherches sur ce sujet et l'utilisation plus diversifiée et meilleure des méthodes pour l'évaluer sont nécessaires pour comprendre la relation entre le stress et l'hypertension.

#### 1.2.3.4 Exercice physique

Certaines observations ont suggéré la relation possible entre la pression sanguine et la forme physique. Toutefois, leur interprétation est difficile à cause de la variété des méthodes employées pour quantifier la forme physique. De plus, 30 à 60 minutes d'activités aérobiques (marche rapide, bicyclette, natation) trois fois par semaine diminuent la pression sanguine<sup>59, 60</sup>, alors que les activités comme la musculation n'exercent aucun effet sur la variation de la pression sanguine<sup>61</sup>.

#### 1.2.3.5 Sensibilité au sel

La principale cause de l'hypertension est une trop grande consommation de sel dans notre alimentation de tous les jours. Outre le sel ajouté au repas, il y a le sel ajouté dans toutes les préparations que l'on peut acheter (surgelés, conserve). Santé Canada a fixé l'apport maximal tolérable pour les adultes à 2,3 g de sodium, soit l'équivalent de 6 g de sel par jour, et un apport recommandé de 1,5 g de sodium par jour. Plusieurs études de population, sinon toutes, démontrent qu'une réduction de la consommation de sodium réduit la PAS chez les hypertendus<sup>58, 62, 63</sup>.

Dans une population, certains sont résistants et d'autres sont sensibles à l'augmentation de la pression sanguine après avoir consommé du sel. Les sujets sensibles au sel sont caractérisés par une élévation de la PA sur une période de 24 heures<sup>64</sup>, possiblement causée par des facteurs génétiques. En effet, des études de co-ségrégation concernant des souches de rat génétiquement hypertendu démontrent que l'effet de la consommation du sel sur la pression sanguine est dirigé par des interactions éco-génétiques entre des loci spécifiques<sup>58</sup>. La capacité du rein à excréter le sodium diminuerait alors. Des découvertes intéressantes ont également



démontré qu'il y avait une différence dans l'excrétion du cortisol urinaire <sup>65</sup> et les fonctions dilatatrices de l'endothélium <sup>66</sup> entre les sujets sensibles au sel et les sujets résistants au sel, ce qui ouvre les portes pour essayer de comprendre les mécanismes entourant ce phénomène. Les reins ont été suggérés comme jouant un rôle central dans la pathogenèse de la sensibilité au sel de la PA.

Il a été démontré que la sensibilité au sel pouvait être modifiée par la présence dans la diète d'autres ions. Un supplément en  $\text{Ca}^{2+}$  ou en  $\text{K}^+$  produit une baisse significative de la PA chez des rats spontanément hypertendus. Cet effet est maximal lorsque ces rats sont sensibles au sel et nourris d'une diète à haute teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{Na}^+$  <sup>58, 67</sup>. Le sodium est essentiel à petite dose, au bon fonctionnement du corps humain. Le sodium contenu dans le sel augmente en effet la PA s'il est consommé en trop grande quantité.

### **1.3 Membrane plasmique et transport d'ions**

L'HTA affecte le rein, mais est également caractérisée par des anomalies généralisées de la membrane des vaisseaux sanguins. La résistance vasculaire périphérique dépend des cellules du muscle lisse, et plus précisément de l'activité au niveau de la membrane plasmique. La membrane plasmique est une structure dynamique, permettant de maintenir l'homéostasie de l'organisme entier, à l'aide de signaux spécifiques, de l'interaction avec les cellules adjacentes et de sa structure membranaire. Elle joue un rôle clé dans la pathogenèse de l'hypertension.

La membrane plasmique présente une perméabilité sélective. Les molécules hydrophobes la traversent aisément, alors que les ions ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) doivent utiliser des protéines de transport.

#### **1.3.1 Homéostasie entre sodium et potassium**

Comme il a été mentionné plus tôt, le sel est grandement consommé dans les pays industrialisés, à cause des produits alimentaires transformés. Ces produits contiennent trop de  $\text{Na}^+$  et peu de  $\text{K}^+$ , qui est retrouvé en bonne quantité dans les

fruits et les légumes. Des études cliniques ont démontré qu'une diète faible en  $K^+$  causait une rétention de  $Na^+$  intracellulaire ce qui entraîne une élévation de la PA<sup>68</sup>. Normalement, le rein humain est ajusté pour conserver le  $Na^+$  et excréter le  $K^+$ . Ce mécanisme s'applique parfaitement aux hommes et femmes de la préhistoire qui consommaient peu de sel, mais beaucoup de fruits et légumes. Avec un tel régime, le  $Na^+$  conservé est négligeable et le  $K^+$  est beaucoup excrété<sup>67</sup>. Par contre, dans notre société d'aujourd'hui, où le sel est abondamment utilisé au détriment des aliments riches en  $K^+$ , le mécanisme s'ajuste très difficilement.

L'homéostasie du  $Na^+$  et du  $K^+$  joue un rôle important dans l'élasticité de l'endothélium. La rétention de  $Na^+$  diminue également la synthèse de NO, un agent vasodilatateur<sup>67</sup>.

### 1.3.2 Rôle des stéroïdes cardiotoniques endogènes

Le rôle des stéroïdes cardiotoniques endogènes (SCT) est de faciliter la natriurèse à travers l'inhibition de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase dans les membranes basolatérales du rein. Une corrélation significative entre la PA et l'inhibition de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase a été confirmée<sup>69</sup>. Depuis, des SCT tel que l'ouabain endogène, le marinobufagenin, la proscillaridin A et le bufalin ont été identifiés comme étant des candidats intermédiaires dans la pathogenèse de l'hypertension essentielle<sup>70</sup>. En effet, une augmentation prolongée de  $Na^+$  cause une élévation du niveau de SCT dans le plasma<sup>69-71</sup>, suivit d'une forte inhibition des pompes  $Na^+/K^+$ -ATPase qui induit une entrée de  $Na^+$  dans la cellule.

### 1.3.3 Rôle du calcium

La rétention du  $Na^+$  implique un déficit en  $K^+$ , ou hypokaliémie (Figure 2), et une libération de stéroïdes cardiotoniques endogènes. Un excès de sodium dans le corps inhibent les pompes sodiques  $Na^+/K^+$ -ATPase, entraînant une augmentation de sodium intracellulaire ( $Na^+_i$ ). L'abondance de  $Na^+_i$  stimule ensuite les pompes  $Na^+/Ca^{2+}$  de type 1 (ou NCX1 pour *sodium-calcium exchanger type 1*), responsable du transport du  $Ca^{2+}$  vers la cellule. Le manque de  $K^+$  inhibe les canaux potassiques et les pompes sodiques  $Na^+/K^+$ -ATPase de la membrane cellulaire, entraînant une dépolarisation de la membrane (mV). La dépolarisation membranaire des cellules du

muscle entraîne une entrée supplémentaire de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire par l'activation des canaux calciques à voltage dépendant, des canaux du réticulum sarcoplasmique et des pompes  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de type 1<sup>67, 70</sup>. La présence de quantité importante de  $\text{Ca}^{2+}$  active le mécanisme responsable de la contraction des muscles lisses des vaisseaux et des muscles cardiaques. Normalement, une hyperpolarisation de l'endothéliale relâche le  $\text{Ca}^{2+}$  pour permettre la vasodilatation et l'équilibre, mais un déficit prolongé de  $\text{K}^+$  implique une vasoconstriction chronique des artères, des artérioles et de la paroi du cœur<sup>67</sup>, qui caractérise l'hypertension.

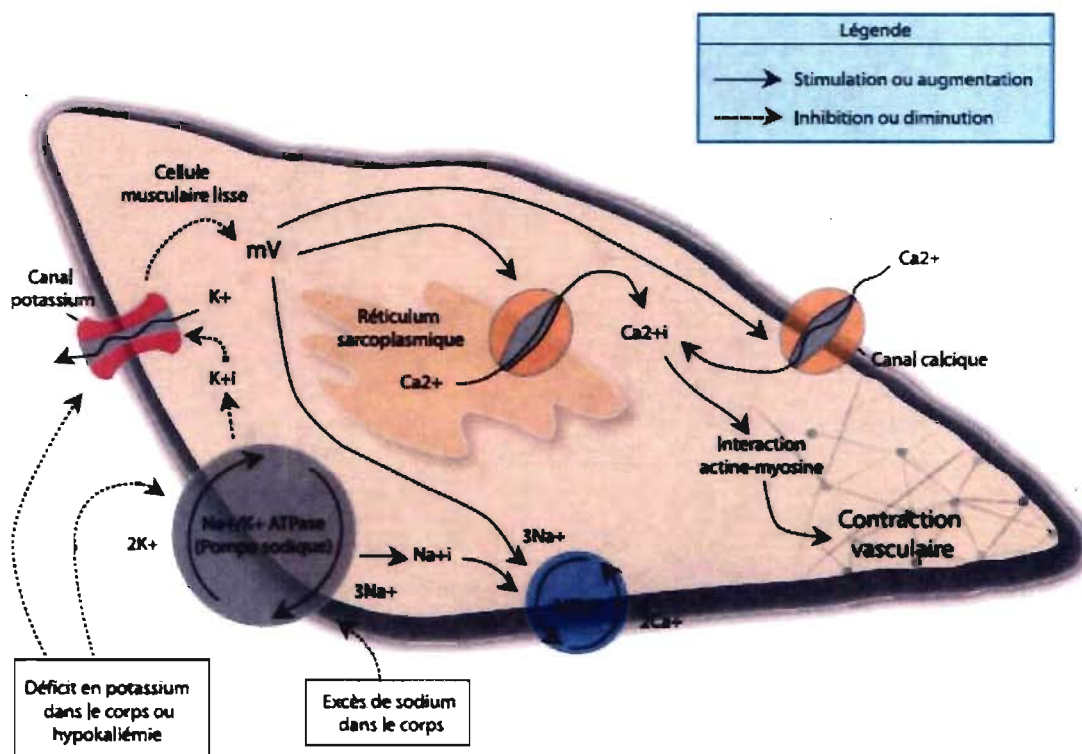


Figure 2. Cascade moléculaire impliquée dans la contraction des muscles lisses des artères par un excès de sodium et un déficit en potassium.

(Figure modifiée d'Adrogué H. J. et al.<sup>67</sup> avec la permission de l'éditeur)

## 1.4 Traitement contre l'hypertension

Le contrôle de la pression sanguine chez un patient atteint d'HTA dépend de la rapidité à laquelle elle est détectée et des traitements appropriés, tant

pharmacologiques que les modifications liés au mode de vie. La volonté du patient ainsi que sa motivation joue un rôle crucial dans la réussite du contrôle de son hypertension. Normalement, le but est de maintenir la pression sanguine au dessous de 140/90 mm Hg. Bien que de nombreuses avancées ont été réalisées, le contrôle de l'hypertension demeure faible dans toutes les régions de monde. La prévention primaire de l'hypertension demeure la meilleure façon de prévenir la maladie et ses complications.

#### **1.4.1 Modification au mode de vie**

Plusieurs approches liées à la modification du mode de vie devraient s'appliquer en premier lieu pour le contrôle de l'hypertension. Une douzaine d'études cliniques ont documenté les bénéfices d'une diminution de la pression sanguine suite à des modifications au mode de vie, telles que la réduction de sel consommé, la perte de poids, la forme physique et la réduction d'alcool<sup>72</sup>. Certaines personnes peuvent prévenir ou contrôler leur pression sanguine en adoptant des habitudes plus saines et ainsi éviter les traitements pharmacologiques.

#### **1.4.2 Traitement pharmacologique**

Parfois, la pression sanguine demeure élevée même après des changements dans nos habitudes de vies. Dans ce cas, il est nécessaire de traiter avec des médicaments. La médecine va contrôler la pression sanguine mais ne la guérit pas. Le but ultime d'un traitement qui diminue la pression sanguine est de réduire la morbidité et la mortalité des maladies cardiovasculaires et rénales. Plusieurs médicaments ont été développés pour traiter l'hypertension (Tableau 1). Parmi les plus utilisés, il y a les diurétiques, les antagonistes des récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta$ , les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), les antagonistes du récepteur  $AT_1$  de Ang II, les inhibiteurs d'entrée de calcium, les agents agissant sur le SNC et les vasodilatateurs directes. Très souvent, une combinaison de quelques-uns de ces médicaments est nécessaire pour abaisser suffisamment la pression sanguine.

Tableau I. *Médicaments antihypertenseurs*

Classe de médicaments	Effets
Diurétiques	Excrétion de sel et d'eau du corps
Bêta-bloquants	Diminution du rythme cardiaque
Alpha-bloquants	Diminution de la résistance vasculaire périphérique
Antagonistes des récepteurs de l'Ang II	Diminution du système RAA, diminution de la résistance vasculaire périphérique
Bloquants des canaux calciques	Empêche l'entrée du calcium dans les muscles, diminution de la résistance vasculaire périphérique
Inhibiteurs de l'ECA	Empêche la formation de l'Ang II, diminution de la résistance vasculaire périphérique
Vasodilatateurs directs	Relaxe les vaisseaux sanguins, diminution de la résistance vasculaire périphérique
Médicaments du SNC	Diminution de l'activité sympathique

Les thérapies pharmacologiques contre l'hypertension ont été associées à 35-40%, 20-25% et 50% de réduction sur des incidences reliées aux accidents cérébrovasculaires, aux infarctus du myocarde et aux crises cardiaques, respectivement <sup>73</sup>. Les bénéfices de ces traitements pharmacologiques sont observés dans plusieurs pays, peu importe l'âge, la race, le genre et le groupe socioéconomique.

## 2- GÉNÉTIQUE DE L'HYPERTENSION

### 2.1 Aspect génétique

#### 2.1.1 Pourquoi étudier les facteurs génétiques

Il est aujourd'hui clair que l'hypertension essentielle est une maladie héréditaire. En effet, il a été estimé que 30 à 50 % de la variance de la pression sanguine dans une population est héréditaire. Cette évidence provient des études de familles, de jumeaux et d'enfants adoptés. Chaque étude examine la proportion génétique et environnementale qui contribue à la variation de la pression sanguine. S'il y a une composante génétique à l'hypertension, le niveau de pression sanguine et l'incidence à l'hypertension est similaire entre des individus apparentés <sup>74</sup>. En plus de ces études, une relation étroite a été établie entre les afro-américains et l'hypertension. Au États-unis, la communauté noire est plus prédisposée génétiquement à l'hypertension que ne le sont les caucasiens. Ils ont tendance à développer l'hypertension plus rapidement au cours de leur vie, les valeurs de pression sont plus sévères, ils sont plus sensibles au sel et le taux de mortalité est plus grand <sup>75</sup>. Dans cette situation, il y a des composantes génétiques de l'hypertension liées à la race. Cette relation n'est qu'une évidence de plus de la contribution des facteurs génétiques au développement de l'hypertension.

Les chances d'avoir l'hypertension augmentent avec l'âge et elle représente un problème important de santé majeur. Pour ces raisons, il est nécessaire d'identifier et de décrire les gènes responsables de la variation de la PA dans une population pour comprendre les causes génétiques de l'hypertension.

#### 2.1.2 Trait complexe, quantitatif et polygénique

La pression sanguine est un caractère quantitatif possédant de fortes composantes génétiques. Les caractères quantitatifs sont des traits complexes qui

présentent de continues variations, ils peuvent prendre une infinité de valeurs. Ces variations naturelles sont présentes dans toutes les populations eucaryotes, varient quantitativement d'un individu à l'autre et sont causés par des facteurs environnementaux et génétiques. Les caractères quantitatifs sont fréquemment appelés caractères multifactoriels, à cause des variances environnementales et génétiques. Plusieurs traits biologiques sont naturellement quantitatifs, comme l'intelligence, le poids corporel et la grandeur corporelle.

En plus d'être multifactorielle, la pression sanguine est polygénique parce qu'elle implique plusieurs gènes. Elle ne dépend pas d'un seul gène majeur, mais plutôt d'une mosaïque de plusieurs gènes qui interagissent entre eux, chacun ayant une petite influence ou une contribution différente variant selon le genre, la race, l'âge et le mode de vie <sup>76</sup>. Un gène qui affecte un caractère quantitatif est appelé locus à trait quantitatif ou *QTL* (pour *quantitative trait locus*).

Plusieurs maladies humaines comme le diabète, l'hypertension et la schizophrénie sont des traits génétiques complexes causées par des facteurs génétiques et environnementaux qui interagissent. Chacun de ces facteurs s'ajoute au risque, ou prédisposition, qu'à une personne de développer la maladie. Le risque global qu'à une personne de manifester la maladie est donc un caractère multifactoriel. Un tel caractère est un « caractère à seuil », qui se manifeste ou non selon la fait que le risque soit au-dessus ou en dessous d'une valeur critique <sup>77</sup>. Pour l'hypertension la valeur critique est de 140/90 mm Hg.

### **2.1.3 Locus à trait quantitatif ou *QTL***

Un locus, ou loci au pluriel, définit un emplacement précis et invariable sur un chromosome ou sur une carte génétique. Un locus peut contenir un gène mais pas nécessairement. Un locus à trait quantitatif ou *QTL* (pour *quantitative trait locus*) peut être utilisé pour décrire une région chromosomique pouvant contenir un ou plusieurs loci contrôlant le trait quantitatif, mais peut aussi se référer spécifiquement à un locus génétique individuel participant au contrôle du trait. Ainsi, un gène qui affecte un caractère quantitatif est appelé *QTL*. Les *QTLs* peuvent fonctionner individuellement ou entre eux.

Les *QTLs* sont responsables des différences dans un trait quantitatif entre deux souches ou deux populations contrastantes. Ils sont donc associés à des traits phénotypiques particuliers. En connaissant le nombre de *QTLs* impliqués dans la variation d'un trait phénotypique, comme la pression sanguine, il serait possible de démystifier l'architecture génétique de l'hypertension. L'étude sur les *QTLs* permet également d'identifier des gènes candidats responsables d'un trait.

## **2.2 Approche génétique**

Étudier les bases génétiques de l'hypertension se révèle ardu, à cause de l'hétérogénéité d'une population, des mécanismes épigénétiques, des facteurs environnementaux <sup>76</sup> et du fait qu'il ne présente aucun symptôme. Les gènes qui déterminent les caractères quantitatifs ne peuvent pas être identifiés par des études de généalogies parce que leurs effets vont être masqués par la ségrégation des autres gènes et par les effets de l'environnement. Ces gènes ou ces *QTLs* peuvent tout de même être localisés s'ils sont génétiquement liés à des marqueurs génétiques <sup>77</sup>. Deux principales approches sont utilisées afin d'étudier les bases génétiques d'une maladie complexe comme l'hypertension essentielle : l'analyse de liaison génétique et les études d'association <sup>74</sup>. Ces deux approches peuvent se faire d'après l'étude de gènes candidats ou le criblage du génome entier. Avant tout, définissons ce que sont les marqueurs polymorphiques, car la réussite d'une étude génétique dépend grandement de la densité de marqueurs génétiques disponibles.

### **2.2.1 Marqueurs polymorphiques**

Une différence génétique est appelée polymorphisme. La plupart du polymorphisme de l'ADN n'est pas associé à des maladies ou troubles héréditaires, mais est souvent situé dans des séquences d'ADN non codantes. Toutefois, chaque polymorphe peut servir de marqueurs génétiques. Il existe plusieurs formes de marqueurs polymorphismes sur l'ADN.



Le polymorphisme de longueur de fragment de restriction (ou *RFLP* pour *Restricted Fragment Length Polymorphism*) est caractérisé par les différences de longueurs de fragments d'ADN dues à la présence ou à l'absence de sites de clivages le long des molécules d'ADN.

Le polymorphisme mono-nucléotidique (ou *SNP* pour *Single Nucleotide Polymorphism*) correspond à une variation d'une seule paire de bases à un site nucléotidique particulier entre les génomes des individus d'une même espèce ou sur les paires d'un chromosome d'un même individu. Ce type de polymorphisme est largement répandu dans le génome humain, comme dans celui de bien d'autres organismes. Le *SNP* représente ainsi une variation présente dans des populations ethniques ou isolées géographiquement. On retrouve environ un *SNP* à chaque 1300 pb<sup>78</sup>.

Les microsatellites sont des répétitions de simple séquence variable de di, tri ou tétranucléotides hautement représentées dans le génome des eucaryotes. Le polymorphisme provient du nombre de répétitions, qui varient entre dix à quelques centaines. L'utilisation de microsatellites est largement utilisée en cartographie génétique à cause de sa densité et de son important degré de variation entre individus. On compte en moyenne un microsatellite à tout les 2 kb d'ADN humain<sup>78</sup> et à tout les 20 kb d'ADN de rat<sup>79</sup>.

## **2.2.2 Stratégies**

### **2.2.2.1 Par gène candidat**

L'analyse des gènes candidats a été la première stratégie pour déterminer et tester des gènes pouvant être impliqués dans l'HTAe. Cette stratégie assume qu'un gène ou un groupe de gènes est associé à la régulation de la pression sanguine ou à l'hypertension. Les gènes candidats sont choisis parce qu'ils sont reconnus pour avoir des effets sur les fonctions cardiovasculaires et rénaux et sur la pathophysiologie de l'hypertension<sup>74</sup>. Ils peuvent également être choisis d'après des résultats d'analyses de liaison génétique ou d'études d'association.

Le gène candidat est analysé entre des individus affectés et non affectés pour détecter des différences dans sa séquence d'ADN. Ces différences peuvent affecter ou non l'expression du gène. Une analyse de liaison génétique ou une étude d'association peuvent être faite pour déterminer si certains polymorphismes dans la séquence du gène sont liés avec la maladie.

Plusieurs gènes candidats responsables de l'hypertension ont été étudiés chez l'humain et les rongeurs, comme les gènes qui codent la rénine<sup>80</sup>, l'11 $\beta$ -hydroxylase stéroïde<sup>81</sup>, le récepteur du peptide natriurétique atrial (Gca)<sup>82</sup> et l' $\alpha$ -adducine<sup>83</sup>. Le lien entre ECA et l'hypertension a été confirmé chez l'humain<sup>84</sup> et une évidence significative entre le gène de l'angiotensinogène et l'hypertension a aussi été montrée<sup>85</sup>.

Plusieurs échecs sont associés à l'étude de gènes candidats : les gènes sont limités à des gènes connus et le choix du gène candidat peut être inapproprié. De plus, il y a beaucoup de gènes candidats impliqués dans le contrôle de la PA, car il s'agit d'un trait influencé par de nombreux facteurs. Il est donc difficile de départager tous les candidats, et fastidieux de tous les étudier<sup>86</sup>. La combinaison de cette méthode à d'autres types d'approches est une démarche plus appropriée qui renforce la validité des gènes candidats.

#### 2.2.2.2 Par criblage du génome entier (*genome-wide*)

L'analyse du génome entier étudie la possibilité qu'un locus affectant un trait quantitatif (*QTL*) soit proche d'un locus marqueur. Cette méthode implique l'utilisation de marqueurs polymorphiques comme les *SNPs* (*single nucleotide polymorphism*) et les microsatellites. Ces marqueurs sont analysés dans des populations affectées pour déterminer des polymorphismes qui suivent le trait d'intérêt pendant la co-ségrégation. Par la suite, les fragments d'ADN délimités par ces marqueurs sont évalués pour la présence de gènes candidats<sup>87</sup>.

Le criblage du génome entier a permis d'isoler des régions candidates sur plus d'une douzaine de régions chromosomiques chez l'humain, à partir desquelles plusieurs gènes candidats positionnels ont été isolés, comme le récepteur de Ang II, le

récepteur adrénérgique  $\beta_2$  et le gène de la lipoprotéine lipase. Dans la majorité des cas, les régions isolées étaient différentes dans chaque étude parce que les polymorphismes peuvent être associés à un phénotype dans une population particulière et pas dans une autre. Des gènes différents pourraient prédisposer un individu à l'hypertension selon ses origines.

### 2.2.3 Analyse de liaison génétique (*Linkage analysis*)

L'analyse de liaison génétique est une méthode commune de cartographie génétique. Elle a pour but, à partir de données familiales, d'accéder à une information sur la méiose, pour savoir si deux loci sont génétiquement indépendants (transmis de façon indépendante lors de la méiose) ou génétiquement liés (transmis de façon non indépendante lors de la méiose). Donc, si les localisations d'un locus marqueur (ex. microsatellite) et d'un locus maladie sont physiquement proches sur un chromosome, il y aura co-ségrégation des deux loci. Dans ce cas, on dit que les loci sont en liaison génétique ou « *linkage* ». La probabilité de recombinaison entre ces deux loci est faible et on peut estimer l'importance de la liaison par le taux de recombinaison « 0 », défini comme le rapport entre le nombre de gamètes recombinés et le nombre de gamètes transmis.

Les études de liaison génétique peuvent se concentrer sur un loci génétique déjà connu pour être impliqué dans la maladie (*candidate-gene linkage studies*) ou sinon s'appliquer à l'échelle du génome entier (criblage du génome ou *genome-scanning linkage studies*)<sup>86</sup>. L'étude du génome entier est devenu un outil indispensable pour l'étude des maladies complexes comme l'hypertension parce qu'elle permet d'identifier de nouveaux gènes.

Lorsque ces deux loci se suivent lors de la ségrégation, plus fréquemment que le hasard, ils sont considérés comme étant liés. Cette liaison est mesurée par le logarithme de la probabilité du lien entre le locus marqueur et la maladie (*LOD score*). En d'autres mots, c'est le logarithme du ratio de la probabilité qu'il y a un *QTL* versus la probabilité qu'il n'y en a pas, sur une position particulière sur le chromosome<sup>79</sup>. Généralement, un *LOD score* > 3 est considéré comme significatif et indique une probabilité de  $p < 0,05$  de liaison entre deux loci<sup>74, 79, 88</sup>. Un *LOD score* entre 2 et 3 est considéré comme présentant une signification suggestive,

alors qu'avec un *LOD score* de 2 et moins, la possibilité d'une liaison génétique est complètement exclue.

Les calculs de *LOD score* sont longs et fastidieux et font appel à différents logiciels informatiques. De façon générale, dans le cas de l'hypertension, l'effet du *QTL* est déterminé par les valeurs de la pression sanguine et la position du *QTL* est déterminée par l'intervalle entre le génotype des marqueurs flanqués de chaque côté, pour chaque individu <sup>79</sup>. Les résultats d'analyse de liaison génétique se présentent généralement sous forme de graphique. La courbe représente le *LOD score* à chacun des marqueurs testés tout le long du chromosome. Lorsqu'un pic significatif est observé, la région démontrant le *LOD score* élevé contient un *QTL*. La localisation de *QTL* par liaison génétique détermine un intervalle chromosomique de 20 à 30 cM <sup>79, 88</sup>, soit de 200 à 500 gènes <sup>86</sup>. La position exacte du *QTL* demeure inconnue. De plus, l'analyse de liaison génétique ne permet que de faire une corrélation statistique. Pour confirmer la localisation du *QTL*, d'autres méthodes comme la construction de souches congéniques et de sous-souches congéniques doivent être effectuées.

L'utilisation de cette approche dans des populations humaines pour étudier l'HTAe et la pression sanguine a permis d'identifier plus de 100 *QTLs* liés à l'hypertension à travers le génome <sup>86</sup>. L'analyse de liaison génétique est une approche indispensable dans la localisation approximative des *QTLs* majeurs, mais elle n'est pas parfaite et on retrouve quatre désavantages principaux. (1) Si deux *QTLs* sont assez loin (80 cM) pour ségréger indépendamment l'un de l'autre, deux pics peuvent être observés. (2) Par contre, si la distance entre deux *QTLs* est très faible, la courbe n'indiquera qu'un seul pic, et la présence de plusieurs *QTLs* sera indétectable. (3) Dans certain cas, un trop grand rapprochement des *QTLs* conduit à la répulsion de chacun de leurs allèles et aucun pic n'apparaît <sup>79</sup>. (4) De plus, le pouvoir statistique de ce type d'analyse pour identifier des variants avec de petits effets, comme ceux qui contribuent à la variation de la pression sanguine, est limité <sup>86</sup>.

#### **2.2.4 Étude d'association**

L'étude d'association peut être une méthode alternative à l'analyse de liaison génétique. Le but est de détecter l'association entre l'allèle spécifique du gène, ou

un marqueur particulier, et la maladie à travers une population plutôt que dans une famille. Les études d'associations sont très importantes pour identifier l'implication du gène à une maladie.

Une des méthodes pour étudier l'association allélique entre une maladie et un marqueur est le « *case-control design* ». Cette étude consiste à rechercher des différences dans les fréquences d'un allèle, à un locus marqueur, dans un groupe d'individus non apparenté atteint d'hypertension (patients) et un groupe d'individus sains (contrôles). Si une différence significative de la fréquence allélique est notée à ce locus marqueur entre les deux groupes, alors des allèles spécifiques à ce locus sont impliqués dans l'étiologie de la maladie. De plus, si l'allèle est plus fréquemment retrouvé chez les personnes atteintes de l'hypertension que ceux qui ne l'on pas, alors l'allèle est dit associé à la maladie <sup>74</sup>.

L'étude peut se faire à partir d'un gène candidat (*candidate-gene association studies*) ou d'un criblage du génome en entier (*genome-wide association studies*). La majorité des travaux d'association sur l'hypertension ont été fait sur des gènes candidats. En plus des résultats obtenus sur le gène candidat, la méthode permet de découvrir de nouveaux gènes et mécanismes pouvant être impliqués dans des formes communes de la maladie <sup>86</sup>. Des études d'association sur le génome entier pour l'hypertension avec des marqueurs *SNPs* (*single nucleotide polymorphism*) sont présentement en développement et apparaît comme un moyen puissant pour identifier des variants de la pression sanguine <sup>86</sup>.

Étant donné que cette méthode utilise des individus non apparentés, il est plus facile de réunir un grand nombre d'échantillons. En général, une étude cas/témoins possède un pouvoir statistique plus grand qu'une étude de liaison génétique, mais a une plus grand tendance à donner des résultats faux positifs <sup>87</sup>.

### **2.3 Modèle animal**

L'utilisation de modèle animal dans la recherche scientifique, et plus précisément dans l'étude de maladies complexes, a permit d'en savoir plus sur les

mécanismes physiologiques entourant une maladie. Un modèle animal offre l'avantage d'être plus facile à contrôler et à manipuler. Contrairement à des sujets humains, ils peuvent être analysés dans un environnement contrôlé où plusieurs variables sont prédéterminées. Ainsi, une souche animale peut être croisée de façon à ce que seulement les différences dans les gènes reliés à la maladie soient étudiées. Cette approche évite le problème de l'hétérogénéité retrouvé dans la population humaine. Les rongeurs, comme modèle animal, offrent également l'avantage d'avoir une courte période de gestation avec de nombreuses portées. Leur durée de vie relativement courte facilite également l'observation et l'évolution de la maladie dans un laps de temps plus court. La petite taille de ces animaux peut conférer, sous différents aspects, un avantage économique et rendre les manipulations plus faciles à effectuer. L'étude des phénotypes complexes et des interactions gène-gène deviennent alors plus faciles.

### 2.3.1 Le rat

Le rat de laboratoire (*Rattus norvegicus*) est largement impliqué dans la médecine; il représente un réservoir pour de nombreux pathogènes (associé à 70 maladies) et est impliqué dans la transmission de maladies contagieuses chez l'homme, mais mis à part cela, sa contribution à la santé humaine fait de lui un animal modèle indispensable. De plus, sa contribution ne peut pas être sous-estimé à cause du rôle qu'il joue dans la médecine expérimentale et le développement de médicaments. *Rattus norvegicus* est une des premières espèces de mammifère à être domestiquée pour la recherche scientifique (en 1828) <sup>89</sup>. Les premières études de génétiques avec le rat ont porté sur la couleur de la fourrure qui était transmise comme un trait mendélien <sup>90</sup>.

Le génome du rat a été séquencé à partir de la souche *Brown Norway* par le *Rat Genome Sequencing Project Consortium (RGSPC)* <sup>91</sup>. Aujourd'hui, une deuxième version de la séquence du génome du rat est disponible (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Le génome du rat (2,75 Gb) est plus petit que celui de l'humain (2,9 Gb) mais plus grand que celui de la souris (2,6 Gb). Les génomes du rat, de la souris et de l'humain possèdent un nombre similaire de gènes. Presque tous les gènes humains connus pour être associés à une maladie possèdent des orthologues chez le rat,

mais leur taux de substitutions synonymes est très différent de celui des autres gènes.

Pour l'étude de l'HTAe ou de maladies cardiovasculaires chez l'humain, le rat est le modèle animal de prédilection par rapport à la souris. La souris est largement utilisée pour comprendre les fonctions des gènes à cause de leur infrastructure génétique et génomique. Toutefois, elle ne possède pas un phénotype suffisamment contrastant pour l'étude de l'hypertension. En effet, les mesures de PA sont souvent diffuses chez cette espèce. 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 pour un grand nombre de maladies dont l'hypertension <sup>79</sup>. L'utilisation du rat comme modèle animal pour l'étude de l'hypertension est plus appropriée parce que les comportements et la physiologie de l'humain se rapprochent davantage au rat qu'à la souris.

Le rat est effectivement un modèle animal par excellence pour élucider les bases pathophysiologiques et génétiques de l'hypertension. Plusieurs souches d'élevages de rats sont disponibles pour la recherche, incluant les souches congéniques, les souches recombinants et les souches consanguines. Chacune de ces souches a été spécialement conçue pour exprimer des différences phénotypiques comme l'hypertension.

### **2.3.2 Souches consanguines pour l'hypertension**

La consanguinité correspond à un croisement entre individus apparentés. La conséquence principale de la consanguinité est de diminuer le taux d'hétérozygotie par rapport aux proportions attendues en cas de croisement au hasard. La majorité des souches de rats utilisées en recherche sont des souches consanguines. Il existe plus de 234 souches consanguines de *Rattus norvegicus* <sup>91</sup>, dont 10 pour l'hypertension (Tableau II). Chacun de ces souches portent des combinaisons de traits qui sont observés dans l'HTAe <sup>86</sup>. Ces souches ont été développées par des croisements sélectifs afin de fixer un trait particulier, et plus précisément des allèles naturels de la maladie. Ce croisement sélectif se fait sans stimulation environnementale ou l'implication d'une diète quelconque. Certaines souches d'élevage de rats ont alors une pression sanguine génétiquement élevée, alors que

d'autres ont une pression sanguine génétiquement faible dépendamment du phénotype recherché. On obtient ainsi des populations génétiquement homogènes, où les allèles sont identiques pour tous les loci.

Dans le cas de l'HTAe, des progéniteurs hypertendus sont croisés pour produire la première génération ( $F_1$ ). Un frère et une soeur de la génération  $F_1$  sont sélectionnés et croisés pour donner la génération  $F_2$ , et ainsi de suite, jusqu'à ce que les rats aient une homogénéité génétique complètement hypertendu. À chaque croisement frère-soeur, le degré d'homogénéité génétique augmente de 12,5 %, et il faut jusqu'à 20 générations ( $F_{20}$ ) pour obtenir une souche complètement consanguine <sup>79</sup>. Le même processus est effectué avec des souches normotendues.

### 2.3.3 Les souches Dahl et les souches normotendues

En 1962, Dahl et associés ont sélectivement croisé des rats sensibles et des rats résistants à l'hypertension suite à une diète riche en sel <sup>92, 93</sup>. Par après, les souches de rats consanguines Dahl *salt-sensitive* (DSS) et Dahl *salt-resistant* (DSR) ont été croisées <sup>103</sup>. Depuis, ces souches sont devenues des modèles animaux pour étudier l'hypertension induite par le sel.

Les rats DSS développent facilement l'hypertension avec une diète à faible teneur en sel (0,4% NaCl), et plus la teneur en sel augmente, plus l'hypertension devient exagérée. Les valeurs de la PAS peuvent aller jusqu'à dépasser 220 mm Hg. Après 8 semaines avec 8% NaCl <sup>103</sup> ou 10 semaines avec 4% NaCl <sup>104</sup>, la totalité des rats meurent. La PAM de ces rats suite à une diète riche en sel est de  $167 \pm 3$  mm Hg. Par des expériences de transplantation, il a été démontré que le sel induisait l'hypertension à cause d'un défaut génétique exprimé dans les reins du rat DSS, impliqué dans la capacité d'excrétion du sodium rénal <sup>105, 106</sup>. Le rat DSS possède donc des anomalies dans l'homéostasie du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Ca}^{2+}$ , dans la régulation de l'ATPase  $\text{Na}^+\text{K}^{+120}$  et des pertes de  $\text{Ca}^{2+}$  rénal <sup>107</sup>. Les rats DSR, par contre, sont des contrôles normotendus, résistants à une diète riche en sel (8% NaCl).



Tableau II. Lignées de rats développées sélectivement pour l'étude de l'HTAe.

Souche normotendue ou hypertendue	Abréviation	Origine	Référence
<i>Genetically hypertensive</i>	GH	Dunedin, Nouvelle-Zélande	Smirk et Hall, 1958 <sup>92</sup>
<i>Dahl salt-sensitive</i>	S, DSS, SS/Jr	Brookhaven, USA	Dahl et al, 1962 <sup>93, 94</sup>
<i>Dahl salt-resistant</i>	R, DSR, R/Jr		
<i>DOCA salt-sensitive (Sabra hypertensive)</i>	SBH	Jerusalem, Israël	Ben-Ishay et al, 1972 <sup>95</sup>
<i>DOCA salt-resistant (Sabra normotensive)</i>	SBN		
<i>Lyon hypertensive</i>	LH	Lyon, France	Dupont et al, 1973 <sup>96</sup>
<i>Lyon normotensive</i>	LN		
<i>Lyon low blood pressure</i>	LL		
<i>Spontaneous hypertensive rats</i>	SHR	Kyoto, Japon	Okamoto et Aoki, 1963 <sup>97</sup>
<i>Spontaneous hypertensive rats –stroke prone</i>	SHRSP	Kyoto, Japon	Okamoto et al, 1974 <sup>98</sup>
<i>Milan hypertensive</i>	MHS	Milan, Italie	Bianchi et al, 1974 <sup>99</sup>
<i>Milan normotensive</i>	MNS		
<i>Fawn-hooded hypertensive</i>	FHH	Utrecht, Pays-bas	Kuijpers et Gruys, 1984 <sup>100</sup>
<i>Fawn-hooded low blood pressure</i>	FHL		
<i>Inherited stress induced arterial hypertensive</i>	ISIAH	Novosibirsk, Russie	Markel, 1985 <sup>101</sup>
<i>Prague hypertensive</i>	PHR	Prague, République Tchèque	Heller et al, 1993 <sup>102</sup>
<i>Prague normotensive</i>	PNR		

Tableau adapté de Rapp, J.P.<sup>79</sup>

L'utilisation de souches normotendues autre que DSR offre l'avantage d'être génétiquement plus contrastante. Ces souches ne démontrent pas de pression sanguine élevée, et sont aussi utilisées dans les études sur la PA : *Lewis* (LEW), *Brown-Norway* (BN), *Milan Normotensive* (MNS) et *Wistar-Kyoto* (WKY). Étant donné que ces souches ne sont pas apparentées avec la souche DSS, le taux de polymorphisme est plus élevé. Par exemple, pour le rat *Dahl salt-sensitive*, le taux de polymorphisme pour les marqueurs le différenciant du rat *Dahl salt-resistant* est de 29%. Ce taux grimpe à 67% avec WKY, 50% avec LEW et 40% avec MNS<sup>108</sup>. Ce polymorphisme permet un meilleur suivi des allèles transmis et permet d'étudier la contribution de différents allèles d'un QTL sur la pression sanguine. La souche *Lewis* (LEW), tout comme les autres souches normotendues, est beaucoup plus résistante à l'hypertension causée par une diète riche en sel (8% NaCl) que la

souche DSR. Après 24 semaines d'une diète riche en sel, la souche LEW présente une PA d'environ 15 mm Hg plus faible que DSR <sup>109</sup>. La PAM de la souche LEW est de  $96 \pm 3$  mm Hg.

#### 2.3.4 L'hypertension chez le rat

L'hypertension chez le rat est très similaire à celle retrouvée chez l'humain. Tout comme chez l'humain, plusieurs anomalies ont été détectées chez les rats hypertendus. L'hypertension secondaire induite chez le rat, par différents types de manipulations rénaux, par administration de corticoïdes et par stress psychologiques, ont démontré une similitude au niveau du changement de la PA chez le rat et l'humain. Une diète riche en sel, par exemple, induit une augmentation du  $\text{Na}^+$ , pouvant être responsable de l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  causant l'hypertension chez les rats spontanément hypertendus (SHR) <sup>110</sup>. Différents défauts ou dérèglements ont été observés chez certaines souches de rats hypertendus, comme les anomalies de l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et de la pompe  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  <sup>110</sup>. Tant chez l'humain, que chez le rat, une perturbation de l'équilibre du sodium démontre qu'il y a une perturbation au niveau des systèmes de transport des ions de la membrane cellulaire chez un individu hypertendu. Les fonctions des reins sont également très impliquées dans la pathogénie de l'hypertension chez le rat et l'humain. Comme il a été mentionné plus tôt, une transplantation d'un rein d'un donneur normotendu à un receveur hypertendu réduit la pression sanguine de façon significative, chez les deux espèces <sup>11-12</sup>. Tout comme chez l'humain, des conditions stressantes peuvent favoriser le développement de l'hypertension chez des rats qui maintiennent une diète en sel <sup>110</sup>. L'hypertrophie du cœur ou des ventricules ont également souvent été répertorié chez les rats hypertendus <sup>111,110</sup>. Le rythme cardiaque des rats hypertendus est souvent élevé et les tissus graisseux sont diminués. Le poids de ces rats est moins élevé que ceux des témoins normotendus <sup>112</sup>. Des similitudes au niveau hormonal, cardiovasculaire et du système nerveux sont également associés à l'hypertension chez le rat.

### 3- ISOLATION D'UN QTL POUR L'HYPERTENSION

Comme il a été présenté à la section 2.1.3., un *QTL* pour la pression sanguine est une région chromosomique où siège un ou plusieurs gènes responsables d'une différence dans la pression sanguine au repos entre deux souches ou deux populations contrastantes. Afin d'identifier un *QTL* pour la pression sanguine, et plus précisément les gènes liés au contrôle de la PA, une stratégie globale est utilisée<sup>113-118</sup>. Elle se fait en quatre étapes générales.

- (1) La première étape consiste à détecter et à estimer la localisation d'un *QTL* lié à PA dans une région du chromosome par analyse de liaison génétique à l'aide du criblage du génome entier. L'analyse permettra d'associer une région chromosomique à la PA.
- (2) Ensuite, la production de lignées congéniques pour l'hypertension permettra de confirmer la présence du *QTL* dans la région chromosomique d'intérêt. Cette étape permet ainsi de faire une cartographie générale de la région chromosomique.
- (3) Par la suite, une cartographie plus spécifique de la région du *QTL* est effectuée pour diminuer le nombre de gènes candidats. Des sous-souches congéniques constituées de substitutions chromosomiques de plus en plus petites sont produites, jusqu'à ce que la région en question soit réduite de 1 à 2 cM.
- (4) Finalement, il faut identifier le *QTL* de la PA, c'est-à-dire les ou le gène, par des méthodes de clonage positionnel et/ou de gène candidat. Le séquençage ou les études d'expression de gènes candidats en font partie.

### 3.1 Détection et estimation de la location d'un *QTL*

Pour détecter un trait polygénique complexe, comme la pression sanguine, la stratégie la plus appropriée est de faire une recherche par criblage du génome entier de l'animal <sup>117</sup>, qui se fait principalement par l'analyse de liaison génétique (voir section 2.2.2.). Cette approche génétique est la plus utilisée pour la localisation approximative d'un *QTL* individuel pour la PA et pour identifier leurs effets <sup>118-120</sup>. La population animale utilisée à cette fin se construit en croisant une lignée de rats hypertendus (DSS) avec une autre qui est normotendus (LEW), pour produire la génération  $F_1$ . Ensuite, un croisement frère-sœur ( $F_1 \times F_1$ ) produit une population  $F_2$ (DSS x LEW). Chez certains individus de cette génération, le génome et le phénotype de la PA vont ségréguer ensemble, ce qui les rend idéaux pour l'analyse de liaison génétique. Dans le cas contraire, il n'y aura pas de la liaison entre le marqueur et la PA <sup>118</sup>.

Pour procéder à une analyse de liaison génétique ainsi qu'à l'analyse des résultats obtenus, le logiciel informatique *Mapmaker/QTL* est utilisé. Ce programme permet de détecter la corrélation entre un marqueur et la PA pour chaque individu de la population  $F_2$ (DSS x LEW). En plus, il permet de cartographier l'intervalle pouvant contenir un *QTL* pour la PA et calcule les *LOD scores* <sup>121</sup>. Dépendamment des situations, il faut environ quelque centaines ou quelque milliers de marqueurs polymorphiques.

Les conclusions obtenues par l'analyse de liaison génétique doivent être confirmées. Pour prouver que la région chromosomique contient vraiment un *QTL* pour la PA, un test génétique plus définitif, tel que l'utilisation de souches congéniques, est requis

<sup>118</sup>

## 3.2 Confirmer la présence du *QTL*

### 3.2.1 Lignées congéniques

L'utilisation de souches de rats congéniques permet de confirmer la présence d'un *QTL* sur une région chromosomique pour la PA suite à une analyse de liaison génétique. Une souche congénique est une souche dans laquelle une petite portion du chromosome de la souche receveuse hypertendue a été sélectivement remplacée par une portion homologue du même chromosome d'une souche donatrice normotendue.

Une souche congénique (Figure 3) se construit en trois étapes consécutives de croisements <sup>115, 118</sup>. Premièrement, il faut intercroiser deux rats provenant de souches contrastantes, une étant la souche donatrice normotendue (LEW) et l'autre la souche receveuse hypertendue (DSS), pour produire une progéniture  $F_1$ . Les individus  $F_1$  sont identiques, ils ont hérité de 50% du matériel génétique de chacun de leurs parents. Deuxièmement, il faut faire un croisement en retour (« *backcross* » ou *BC*), c'est-à-dire qu'il faut croiser un rat de la progéniture  $F_1$  avec le parent contrôle DSS pour produire la première génération de croisement en retour (*BC1*). Les rats de la *BC1* sont alors hétérozygotes pour une région du chromosome d'intérêt. Un autre croisement en retour avec le parent DSS produit la génération *BC2*. Le processus de croisement en retour est ainsi répété plusieurs fois en sélectionnant les rats hétérozygotes ayant la région d'intérêt du chromosome. Après huit à dix générations de *BC*, la composition génétique du rat congénique est composé de plus de 99% de la souche récipiente, et moins de 1% de la souche donneuse <sup>118, 122</sup>. Tout le génome du congénique est alors homozygote pour les loci de la souche receveuse, excepter pour la région d'intérêt qui demeure hétérozygote. Cette région chromosomique d'intérêt sera finalement fixée dans un état homozygote avec les allèles de la souche donatrice. L'arrière-plan génétique de la souche congénique est donc identique à la souche receveuse, sauf pour une région chromosomique précise provenant de la souche donneuse.

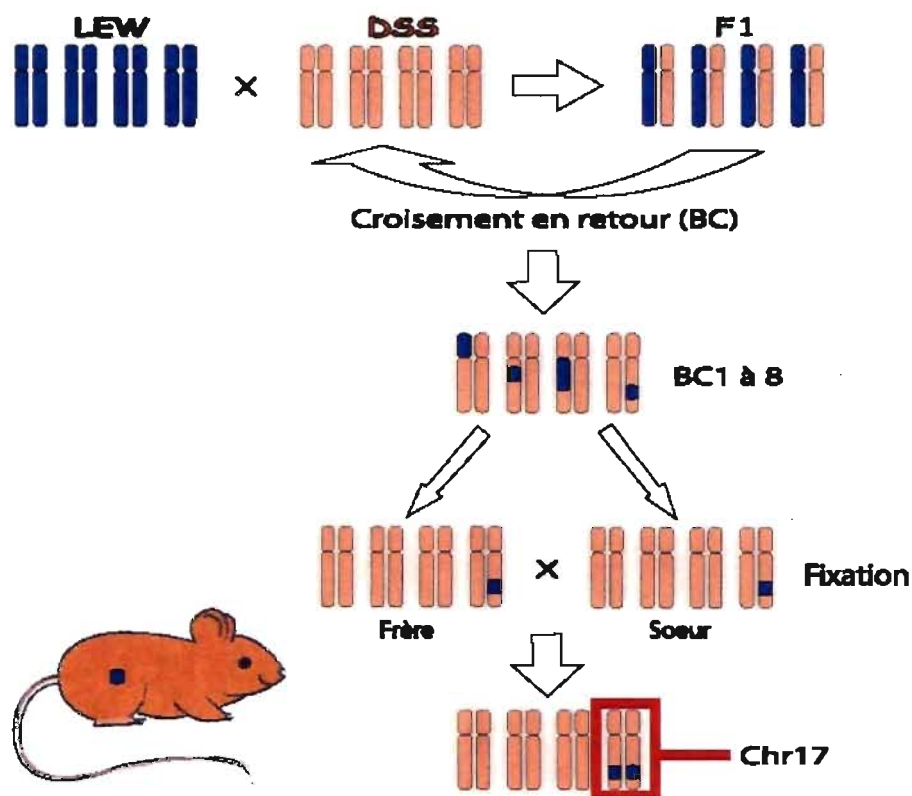


Figure 3. Représentation schématique de la construction d'une souche congénique.

La production d'une lignée congénique selon la stratégie traditionnelle peut durer entre trois à quatre ans <sup>123</sup>. Ce temps peut être réduit grâce à la stratégie de croisement congénique rapide (ou « *speed congenic* ») <sup>124, 125</sup> (Figure 4). En faisant le criblage des marqueurs génétiques polymorphes couvrant tout l'arrière-plan génomique, on peut sélectionner les nouveaux-nés mâles avec peu d'allèles du donneur dans leur génotype. Ainsi, à chaque croisement, l'utilisation du meilleur mâle diminue considérablement le temps nécessaire pour éliminer l'arrière-plan génétique de la souche receveuse. Il a été calculé qu'après quatre générations de *BC*, la présence du génome du donneur est moins de 1%, si 60 marqueurs génétiques espacés d'environ 25 cM l'un de l'autre est utilisé pour cribler 16 mâles à chaque génération. L'approche du « *speed congenic* » permet de diminuer le temps nécessaire à produire une souche congénique d'approximativement 2 ans <sup>125</sup>.

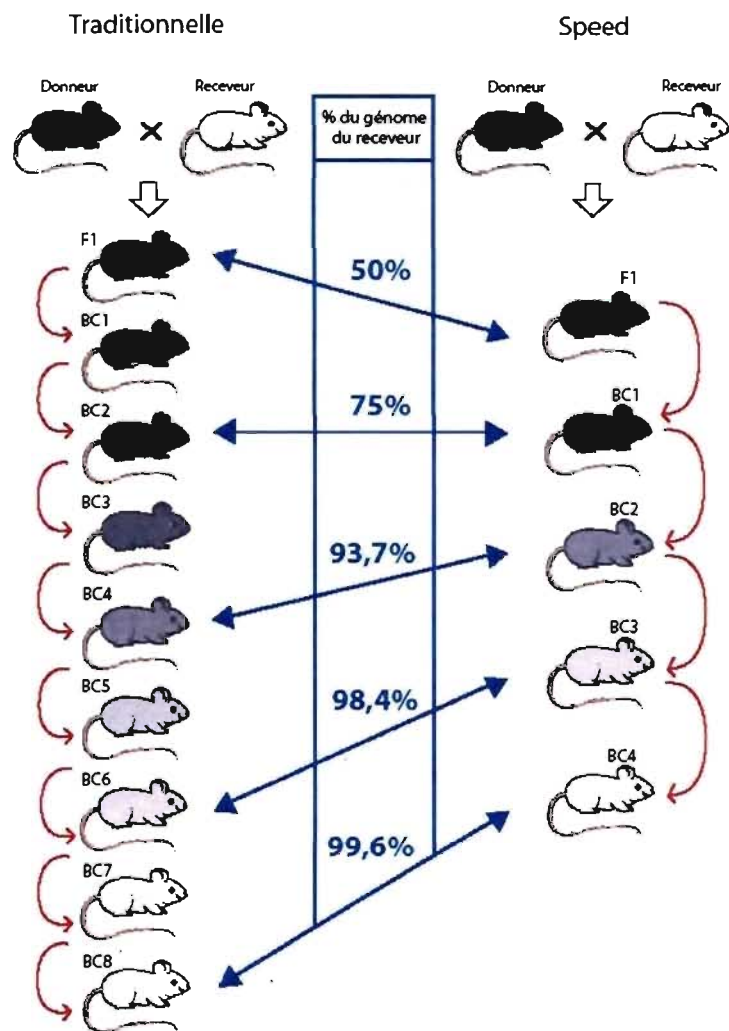


Figure 4. Représentation schématique de la construction d'une souche congénique par la méthode du « speed congenic ».

(Figure modifiée de McBride M.W. et al 2004<sup>122</sup> avec la permission de l'éditeur)

Le génome du rat congénique est constitué d'allèles qui augmentent la PA sauf pour une région à l'étude qui provient de la souche normotendue. Si la PA de cette lignée congénique diminue par rapport à la souche contrôle hypertendue, on peut conclure que ce fragment de chromosome particulier contient un *QTL* qui contribue à la différence de pression entre la souche donneuse et la souche receveuse. Dans le cas contraire, il n'y a pas de *QTL* au niveau de cette région chromosomique.

La méthode expliquée correspond à des rats congéniques avec un arrière-plan hypertendu, sauf pour la région d'intérêt. Cette méthode peut aussi bien se faire

dans une direction inverse avec des rats congéniques ayant un arrière-plan normotendu sauf pour une région d'intérêt provenant de la souche hypertendue. Pour avoir un *QTL*, il faut alors que la PA de la souche congénique augmente. Le désavantage d'avoir un fond génétiquement normotendu se joue au niveau de la détection du *QTL*. Une souche normotendue possède beaucoup d'allèles qui diminuent la PA. La présence d'une région chromosomique du rat hypertendu, même si elle contient véritablement un *QTL*, sera difficile à détecter à cause de l'énorme effet qu'imposent les allèles de la souche normotendue. Il n'y aura pas de variations dans les valeurs de PA parce qu'il sera masqué par la présence de systèmes tampons provenant du génome normotendu, qui empêchent les variations.

### **3.2.2 Cartographie du chromosome**

Pour visualiser la région d'intérêt, la cartographie du chromosome est très importante. La liaison entre les gènes sur un chromosome peut ainsi être représentée sous forme de carte. Pour délimiter avec précision la région d'intérêt d'une lignée congénique, on utilise des marqueurs microsatellites. Les principales cartes utilisées sont la carte génétique, la carte physique et la carte d'homologie. Bien sûr, il est possible de fusionner ces cartes pour n'en faire qu'une.

#### **3.2.2.1 Carte génétique de liaison**

Le concept de carte génétique de liaison a été développé en 1913 par Alfred H. Sturtevant, un élève de T.H. Morgan. Les gènes sont linéairement placés dans l'ordre sur le chromosome et séparés d'une distance proportionnelle à leur fréquence de recombinaison. Chaque point sur la ligne chromosomique représente un gène, et plus précisément un locus.

La recombinaison entre gènes se fait par un enjambement, c'est-à-dire l'échange de segments entre chromosomes homologues. Le mécanisme d'enjambement se matérialise physiquement par un chiasme, un chevauchement croisé, lors de la prophase I de la méiose. L'unité de distance en cartographie génétique est appelée un centimorgan (abrégié cM). Un centimorgan correspond à 1% de recombinaison. Par exemple, lorsque deux gènes ont une fréquence de recombinaison de 3,1%, leur distance en centimorgan est de 3,1. Par contre, cette égalité ne s'applique que si les



enjambements sont simples. Un double enjambement est comptabilisé dans la distance cartographique mais pas dans la fréquence de recombinaison. Il y a en effet une distinction entre la fréquence de recombinaison et la distance cartographique. La distance cartographique entre deux gènes est égale à la moitié du nombre moyen d'un enjambement se produisant dans la région, par cellule méiotique, alors que la fréquence de recombinaison entre deux gènes indique effectivement le nombre de recombinaison observé. Il peut également arriver qu'il y ait l'apparition d'enjambements multiples qui compliquent la conception des cartes génétiques. Certains échanges multiples entre deux gènes ne produisent pas de recombinaisons et ne sont donc pas détectés <sup>78</sup>.

La distance physique est souvent corrélée à la distance cartographique, car plus l'éloignement entre deux marqueurs est importante plus la probabilité qu'un enjambement ait lieu est élevée. Mais ceci n'est pas toujours vrai. En général, les régions condensées proches du centromère, formées d'hétérochromatide, subissent moins de recombinaison que l'euchromatide, qui est décondensé <sup>78</sup>.

L'utilisation de carte génétique tend à disparaître, à cause de la disponibilité récente des marqueurs microsatellites. Les cartes physiques sont d'autant plus précises.

### 3.2.2.2 Carte physique

Le séquençage du génome du rat a permis d'améliorer la précision de la cartographie grâce à la possibilité d'évaluer la distance physique entre les gènes et/ou marqueurs. Contrairement à la carte génétique, où les distances sont exprimées en cM, une carte physique exprime les distances entre marqueurs et/ou gènes en paire de bases (pb). Les distances génétiques sont une approximation de la distance réelle physique mesurée en pb, où l'on considère que 1 cM équivaut à environ  $10^6$  pb ou 1 Mb. Au cours du séquençage, de gros fragments chromosomiques ont été assemblés un à côté de l'autre, pour donner ce qu'on appelle les supercontigs. À l'aide de ces structures, le positionnement des gènes et des marqueurs est plus réel et précis. On peut aligner la séquence d'un marqueur, par exemple, avec celle du contig à l'aide du logiciel *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), disponible sur NCBI.

### 3.2.2.3 Carte d'homologie

Au cours de l'évolution, de larges fragments d'ADN ont été conservés et transmis entre les espèces. Grâce aux séquençages du génome humain, souris et rat, l'évaluation du degré d'homologie entre ces espèces a été possible.

La carte d'homologie consiste à aligner un à côté de l'autre des régions chromosomiques homologues d'espèces différentes, comme le rat, la souris et l'humain. Étant donné que le séquençage du génome humain et souris sont plus avancés, un plus grand nombre de gènes ont été identifiés. La séquence du rat, par contre, présente encore beaucoup de trous et de gènes mal définis. L'information fournie par les régions homologues de l'humain et de la souris nous permet ainsi de mieux évaluer les gènes retrouvés dans notre région candidate chez le rat. À cause du fort degré d'homologie entre ces trois espèces, il y a beaucoup de chances pour qu'un gène isolé chez le rat se retrouve chez l'humain et la souris. Évidemment, un gène qui a un effet sur la PA chez le rat n'a pas nécessairement le même rôle chez l'humain.

De plus, l'utilisation de la carte d'homologie permet de faire le lien entre les données obtenues chez le rat vers l'humain, pour qui les recherches scientifiques sont faites. Le rat n'est qu'un modèle animal pour étudier les maladies complexes des humains.

L'utilisation de souches congéniques sert ainsi à démontrer l'existence réelle d'un *QTL* pour la pression sanguine. La cartographie permet certainement de visualiser jusqu'à quel point la région du *QTL* est grande et contient beaucoup de gènes. L'étape suivante est de diminuer cette région du chromosome entre 1 et 2 cM pour faciliter l'identification des gènes.

## 3.3 Cartographie pointue de la région

Dans la majorité des situations, la région du *QTL* définie par la construction de souches congéniques est très grande et peut ainsi contenir plusieurs centaines de gènes. De plus, il est possible qu'il y ait plus d'un *QTL* dans la région donnée.

C'est pour cette raison qu'il est important de faire une « dissection génétique du chromosome » à l'aide de sous-souches congéniques <sup>126</sup>. Cette dissection consiste à diminuer le nombre de gènes dans un intervalle défini par un *QTL* pour faciliter leur identification.

Pour construire une sous-souche congénique (Figure 5a), on croise un rat de la souche congénique originale homozygote (désignée CC), connue pour avoir un *QTL* d'intérêt, avec un rat de la souche receveuse hypertendue homozygote (désignée RR). La génération F<sub>1</sub> (hétérozygote CR) est ensuite croisée en retour avec RR. Les individus de la F<sub>2</sub>, avec de petits segments chevauchants la région du *QTL* d'intérêt, sont ensuite sélectionnés par génotypage pour être croisés avec le contrôle RR. Finalement, un croisement frère-sœur permet de fixer ce nouveau segment. Ainsi, quatre croisements consécutifs de génération est nécessaire pour diminuer suffisamment la région du *QTL* <sup>113</sup>. En assumant qu'une génération de rat se forme en 9 semaines, c'est-à-dire de l'accouplement à la naissance de la progéniture, une sous-souche congénique s'établit dans environ 9 mois <sup>113</sup>. À chaque fois qu'un croisement a lieu, les événements de recombinaisons de la méiose permettent de produire une progéniture avec des régions chromosomiques de plus en plus courts. La plus courte région de *QTL* identifiable à l'aide de lignées congéniques est de 1 à 2 cM, puisque la possibilité de recombinaison entre deux marqueurs très rapprochés est faible. Les recombinaisons sont détectées par génotypage à l'aide de marqueurs polymorphiques densément distribués <sup>127</sup>.

Ainsi, à partir d'une lignée congénique porteuse d'un grand segment chromosomique, on dérive plusieurs lignées sous-congéniques portant des segments partiellement chevauchants (Figure 5b). C'est en comparant la PA de chaque sous-souche par rapport à la souche receveuse, qu'il sera possible de déterminer quelle sous-souche a un effet sur la PA. En examinant les fragments de chromosome partagés entre les sous-souches ayant un effet sur la pression de ceux qui n'en ont pas, on peut déduire la nouvelle grandeur du *QTL* de la PA sur le chromosome <sup>114</sup>.

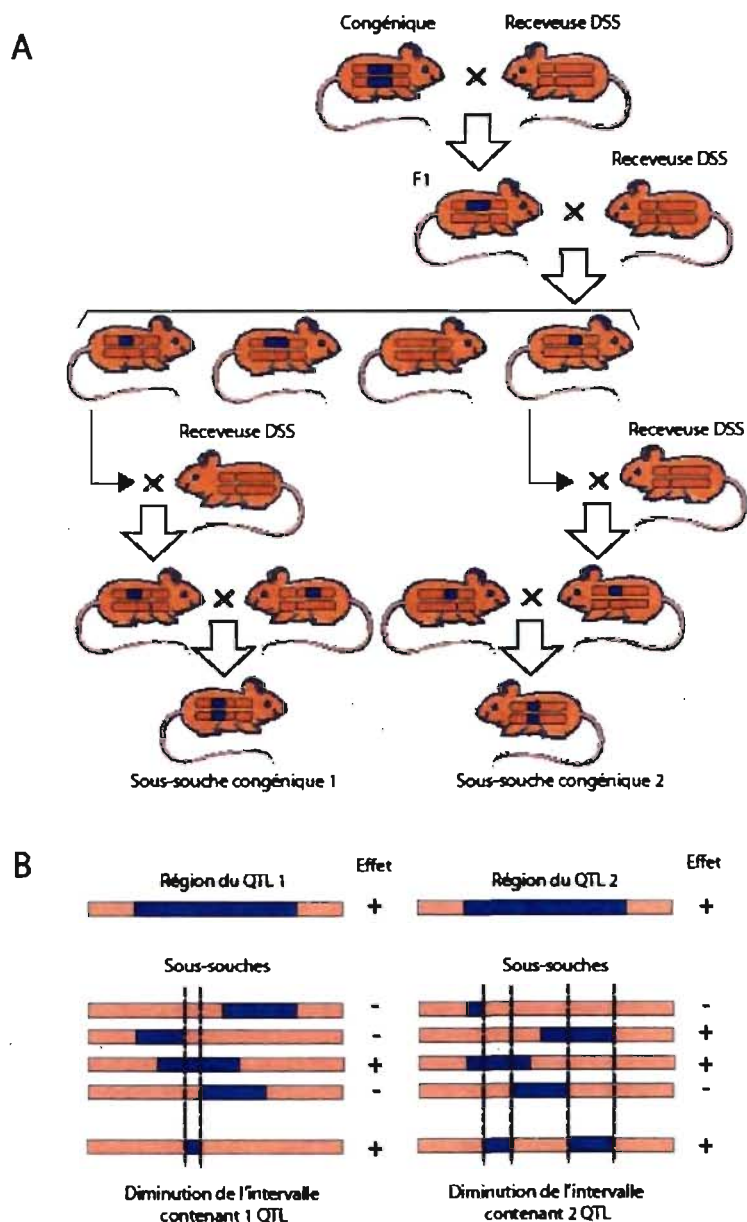


Figure 5. *A* Représentation schématique de la construction d'une sous-souche congénique. *B* Cartographie des fragments de la région du QTL et leur effet. (Figure modifiée de Montagutelli X. et al 2004 <sup>128</sup> avec la permission de l'éditeur)

Pour bien produire des sous-souches congéniques, deux facteurs doivent être pris en considération. Le premier concerne la densité des marqueurs chromosomiques disponible dans la région d'intérêt sur le chromosome. Idéalement les marqueurs chromosomiques doivent être espacés de 1 à 2 cM l'un de l'autre dans la région du QTL de la PA. Le deuxième est que le hasard doit faire en sorte qu'il y ait des

enjambements entre deux marqueurs intimement lié dans la région critique du chromosome. Statistiquement, un produit d'enjambement sur une distance de 1 cM doit survenir approximativement à chaque 100 produits de méiose. En terme pratique, à chaque 200 rats, il y aura possiblement un rat avec un enjambement pour une région chromosomique de 1 cM<sup>114</sup>.

Idéalement, une sous-souche congénique doit contenir un *QTL* capable de diminuer la PA et n'ayant qu'un seul et unique gène possédant des allèles mutés. Malheureusement, ceci n'a pas encore été réalisé. Un des désavantages de l'utilisation de souches et de sous-souches congéniques, reste dans l'habilité à obtenir des enjambements qui ne contiendrait qu'un seul gène d'intérêt. Dépendamment si l'intervalle que délimite le *QTL* contient beaucoup ou peu de gènes et si la région est située sur un enjambement ou non, les enjambements entre deux marqueurs vont dépendre de la fréquence d'échange et de la structure locale du chromosome.

Une fois que la région du *QTL* est réduite de 1 à 2 cM, des gènes candidats inclut dans le *QTL* peuvent être identifier et étudier.

### **3.4 Identification des gènes**

Bien qu'idéalement un *QTL* ne devrait contenir qu'un gène, plusieurs gènes candidats sont retrouvés dans l'intervalle du *QTL*, à cause des limites qu'imposent la construction du congénique. En effet, quand on a épuisé tous les recombinants disponibles, cette région du *QTL* ne peut pas être réduite davantage. Pour pouvoir faire le tri entre ces gènes et savoir lequel ou lesquels sont impliqués dans le contrôle de la PA, plusieurs études sont faites.

#### **3.4.1 Mutation**

Pour qu'un gène soit considéré comme étant un gène candidat, il doit posséder une ou plusieurs mutations capable de changer la PA chez l'individu.

hypertendu. S'il n'y a pas de mutation significative dans le gène candidat, le gène candidat lui-même ne peut pas être considéré comme étant un *QTL* de la PA.

Pour trouver cette mutation, on peut séquencer, chez le congénique et le contrôle normotendu, chacun des gènes inclus dans la région du *QTL*.<sup>122</sup> Une modification dans la séquence codante va modifier la taille et/ou la conformation de la protéine, affectant ainsi sa fonction. Une mutation dans la région non codante va plutôt changer le niveau d'expression du gène. Il a été observé que les mutations situées dans les régions non codantes étaient plus fréquemment responsables de traits complexes, comme la PA, que les mutations dans les séquences codantes<sup>129, 130</sup>. Toutefois, la détection et l'interprétation des conséquences de ces mutations sont beaucoup plus difficiles, et pourraient être responsables d'un ensemble de petits changements d'expression de gènes à travers le génome qui, au bout du compte, crée une importante variation dans la pression sanguine.

La recherche d'une mutation représente un défi majeur car il est essentiel, une fois détectée, de pouvoir distinguer un simple polymorphisme d'une mutation causale.

### 3.4.2 Niveau d'expression

Après avoir détecté une mutation, il faut savoir si cette mutation va affecter le niveau d'expression du gène (ou *gene expression profiling*) qui l'a contient. Trois principales méthodes sont utilisées : l'immunobuvardage Northern, le PCR en temps réel et les micropuces d'ADN.

L'immunobuvardage Northern et le PCR en temps réel permettent de quantifier la présence d'ARNm transcrit par un gène. Le PCR en temps réel est plus sensible car il peut détecter des niveaux d'expression plus faibles. Dans les deux cas, l'ARN va être détecté par une sonde. Contrairement aux méthodes conventionnelles qui étudient un gène à la fois, les micropuces d'ADN peuvent détecter le niveau d'expression de milliers de gènes simultanément. Cette méthode a déjà fait ses preuves avec le glutathione S-transférase, situé dans la région du *QTL* de la PA du chromosome 2, ce gène est différentiellement exprimé entre deux souches de rats

<sup>131</sup>

Les études sur le niveau d'expression des gènes sont très révélateur, mais ne suffisent pas pour prouver l'effet de la mutation sur la pathogenèse.

### 3.4.3 Essais *in vivo*

L'utilisation des essais *in vivo* est nécessaire parce qu'ils constituent une preuve finale de l'effet d'une mutation d'un gène dans une maladie. Parmi les méthodes les plus couramment employées, il y a la production d'animaux transgéniques, d'animaux *knock-out* et l'utilisation d'ARNs d'interférence.

La transgénèse peut être utilisée pour tester les fonctions d'un gène, pour tester un phénotype encodé par un segment de l'ADN <sup>115</sup> et pour trouver les organes où sont exprimés le gène. La méthode se fait comme suit : le gène candidat, ou transgène, est introduit via un vecteur (BAC) dans le pronucléus d'un ovule fertilisé, qui est par la suite implanté dans l'appareil reproducteur d'une rate femelle. Le génome des descendants sera scruté pour voir si le transgène s'est intégré dans le génome. Le site d'insertion du transgène est très important. S'il s'insère dans une région silencieuse du chromosome, l'expression peut être complètement supprimée. Par contre, s'il s'insère près d'un site d'amplification (*enhancer*), le patron d'expression sera erroné. L'intégration dans un autre gène peut l'inactiver ou causer des phénotypes inattendus <sup>132</sup>. L'utilisation d'un transgène antisens qui réprime l'expression d'un gène peut également se faire. Une équipe allemande a réussi à inhiber le système rénine-angiotensine dans le cerveau de rats transgéniques à l'aide d'un transgène antisens <sup>133</sup>.

Un animal *knock-out* est un animal dans lequel on a introduit spécifiquement une modification dans la structure codante du gène ou dans ses éléments régulateurs, afin d'inhiber ou modifier le fonctionnement du gène dans l'organisme étudié. Cette perte de fonctions ou ces modifications génétiques permettent d'étudier les fonctions d'un gène et de ses éléments régulateurs. Malheureusement la perte de fonction entraîne parfois la mort de l'embryon. La technique consiste à remplacer un endogène par le transgène grâce à la recombinaison homologe dans des cellules embryonnaires. Les cellules sont ensuite introduites dans des blastocytes d'une rate femelle. Les rats chimères résultants de cette portée seront croisés et étudiés pour voir la transmission du transgène. Par contre, la méthode n'est pas encore disponible pour le rat, à cause de la difficulté à produire des cellules embryonnaires

de rat<sup>132</sup>. Quoiqu'il en soit, le gène de la souris homologue au gène candidat pour la PA, peut être identifié et une mutation spécifique peut y être introduit pour l'étude de *knock-out* dans les cellules embryonnaires<sup>115</sup>. De plus, de nouvelles approches techniques sont en voie de développement pour l'utilisation d'autres types de cellules autres que embryonnaires.

Une autre méthode est l'utilisation d'ARNs d'interférence (ou *siRNA* pour *small interference RNA*), très utile pour arrêter l'expression d'un gène dans des cultures cellulaires *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans la souris et le rat<sup>115</sup>.

Toutes ces techniques peuvent être utilisées de concert pour prouver qu'un gène candidat retrouvé dans un *QTL* de la PA est véritablement impliqué dans le phénotype de la maladie ou non. Lorsque l'identification des gènes responsables de l'hypertension essentielle est complétée, des études au niveau de la protéine seront envisagées.



## 4- CHROMOSOME 17 ET 16 DE *Rattus norvegicus*

### 4.1 Chromosome 17

Le chromosome 17 de *Rattus norvegicus* possède 97 296 363 pbs (Figure 6), et plus de 711 gènes ([http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/)). Il possède des régions homologues avec les segments des chromosomes 1, 5, 6, 7, 9 et 10 de l'*Homo sapiens* (Figure 7 A) et avec les segments des chromosomes 2, 13 et 18 de *Mus musculus* (Figure 7 B).

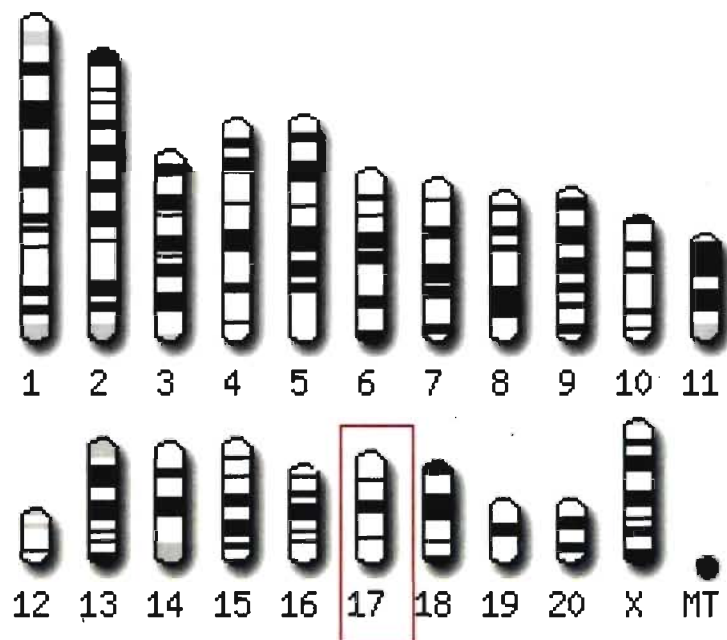


Figure 6. *Caryotype de Rattus norvegicus. Chromosome 17.*

(Figure prise de Ensembl gene : [http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/))

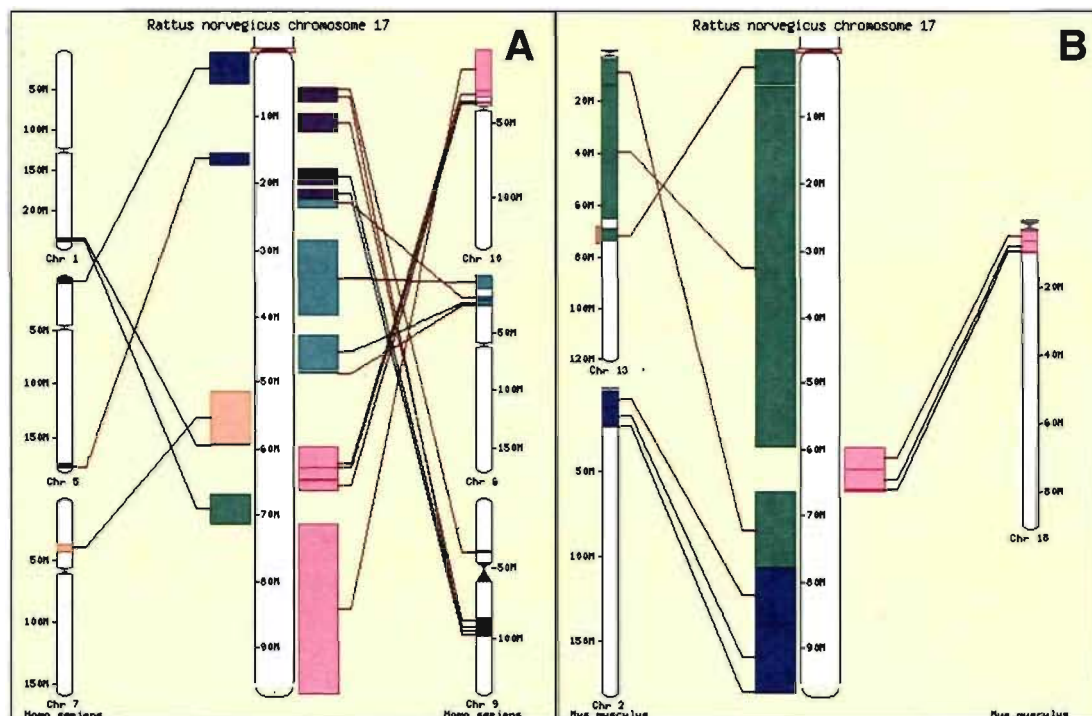


Figure 7. A Régions homologues du chromosome 17 de *Rattus norvegicus* avec *Homo sapiens*. B Régions homologues du chromosome 17 de *Rattus norvegicus* avec *Mus musculus*. (Figure de Ensembl gene :[http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus))

#### 4.1.1 Études précédentes

En 1994, Deng A. Y. et al.<sup>134</sup> ont croisé plusieurs souches de rats hypertendus pour générer des populations F<sub>2</sub>, pour l'analyse de liaison génétique sur le génome entier, afin de trouver des *QTL* impliqués dans le contrôle de la PA. Ces populations suivaient une diète de 8% NaCl pendant 9 semaines. À l'aide du programme *Mapmaker/QTL*, ils ont localisé un *QTL* avec un *LOD score* maximal de 2.90 sur le chromosome 17, résultants du croisement DSS et LEW (Figure 8). Ce résultat suggère donc la présence possible du *QTL*, mais ne représente pas un *LOD score* significatif.

Plus tard en 1998, l'équipe de Garrett M. R. et al.<sup>109</sup> a reproduit le travail de Deng et al, mais juste avec une population F<sub>2</sub> provenant de rats DSS et de rats LEW. En tout, 406 marqueurs microsatellites étendus sur 1757 cM de régions chromosomiques étaient espacés d'environ 4,3 cM/marqueur. L'étude démontrait un *LOD score* sur le chromosome 17 d'approximativement 2.5 (Figure 9 A). Étant donné que les résultats n'étaient pas significativement concluants, ils ont entrepris

de mesurer la PA des souches congéniques qu'ils avaient. Pour chaque souche congénique, les résultats espérés étaient une diminution de la PA au niveau de la région du *QTL* retrouvé initialement par analyse génétique. C'était le cas pour les chromosomes 1, 5 et 10, mais pas pour le chromosome 17, pour lequel aucun effet de la pression n'a été détecté (Figure 9 B).

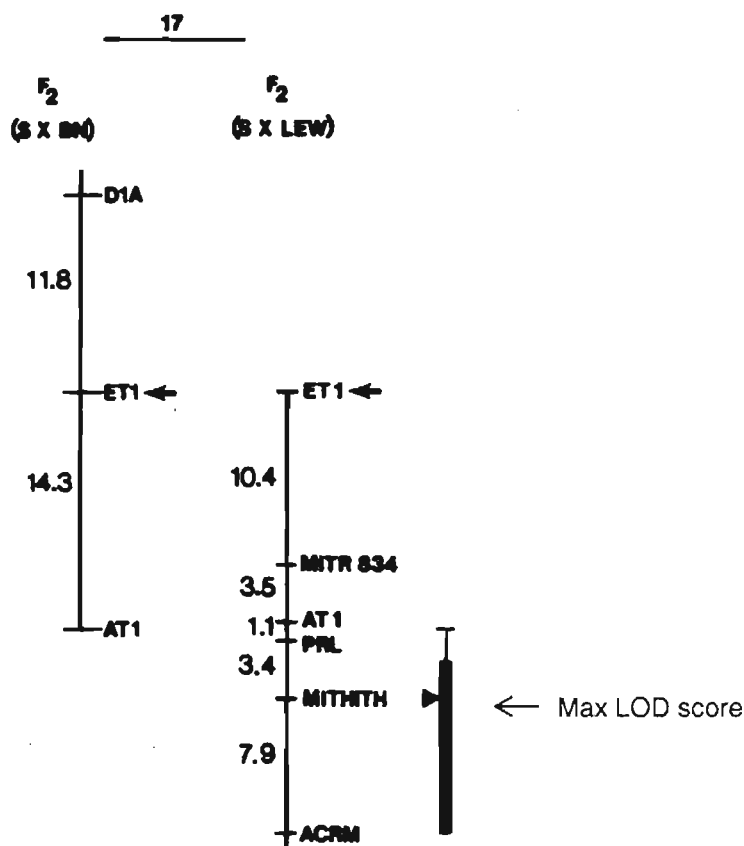


Figure 8. Résultats d'après Deng Y. A. et al., publiés en 1994<sup>134</sup>. Identification d'un *QTL* pour la PA sur le chromosome 17 par analyse de liaison génétique. Les chiffres à la gauche de la ligne indiquent les distances génétiques en centimorgan; le triangle indique la position du *QTL* avec le maximum de LOD score; la ligne épaisse indique une unité  $\pm 1$  LOD et la ligne une unité de  $\pm 2$  LOD. (Figure prise dans Deng A. Y. et al. 1994<sup>134</sup>).

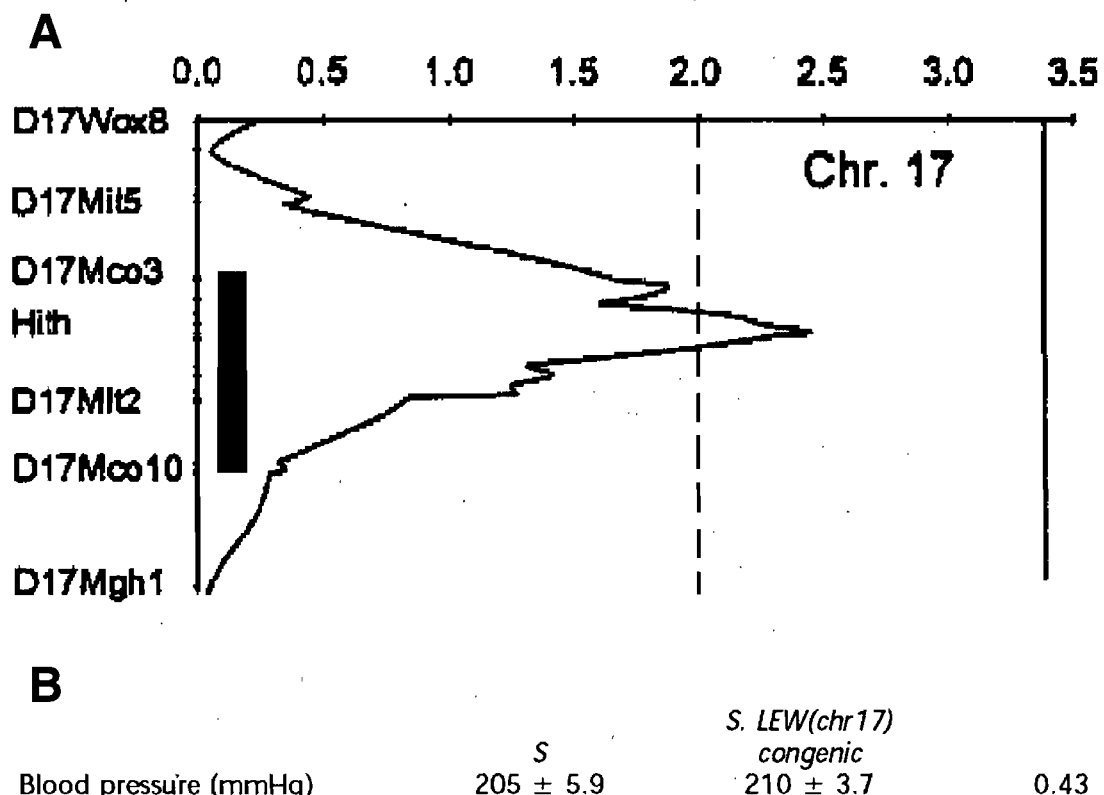


Figure 9. Résultats d'après Garrett M. R. et al., publiés en 1998<sup>109</sup>. A Identification d'un QTL pour la PA sur le chromosome 17 par analyse de liaison génétique. Les chiffres du haut indique les valeurs de LOD scores; la ligne pointillée indique la valeur minimale de LOC score pour avoir une liaison suggestive; la ligne épaisse représente la région LEW intégré dans une génotype DSS d'une souche congénique. B Valeurs de la PAM pour DSS (ou S) et le congénique. 0.43 indique la valeur de la probabilité par le t-test. (Figure prise dans Garrett M. R. et al. 1998<sup>109</sup>).

Le signal obtenu par analyse de liaison génétique sur le chromosome 17 semble donc être un faux positif. Toutefois, il est possible que cette souche congénique (entre D17Mco3 et D17Mit5) ne recouvrait pas une assez grande région du chromosome 17, à cause du nombre limité de marqueurs disponible à l'époque. Le QTL était peut être présent mais pas dans le congénique en question. La méthode employée pour mesurer la PA était le *tail cuff*, une méthode moins fiable que la télémétrie. De plus, un article de Yagil C et al.<sup>135</sup> avec des rats *Sabra salt-sensitive*, a localisé une région du QTL significative (avec un *LOD score* de 3.66) sur le chromosome 17 qui chevauche la région du QTL suggéré par Garrett. À partir de là, de nouvelles souches congéniques devaient être fait.

En 2005, Grondin et al.<sup>136</sup> ont obtenue des résultats positifs pour la PA avec de nouvelles souches congéniques issues du croisement DSS et LEW. Cinq lignées congéniques, désignées C17S.L1 à C17S.L5, ont permis de délimiter une région du *QTL* de la PA pour le chromosome 17 (Figure 10). Étant donné que les résultats de la PA pour les congéniques C17S.L1 et C17S.L2 étaient plus faibles que celles du rat contrôle DSS, et que ceux de C17S.L3, C17S.L4 et C17S.L5 étaient inchangés, la région du *QTL* a été délimitée entre les marqueurs D17Rat97 et D17Rat15. Cette région mesure 34,8 Mb.

## Chromosome 17

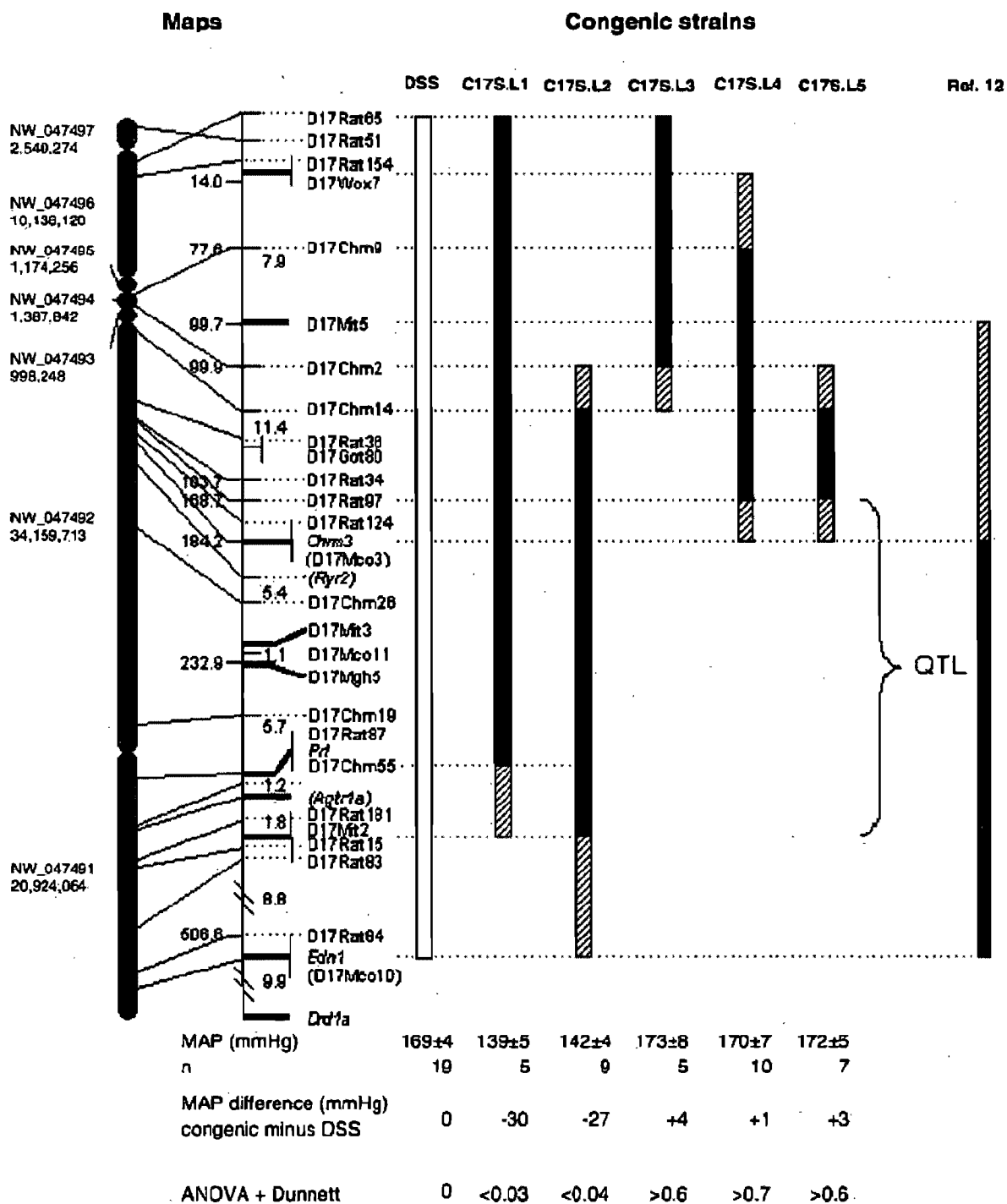


Figure 10. Résultats d'après Grondin M. et al., publiés en 2005<sup>136</sup>. Carte génétique et physique de l'intervalle du QTL de l'hypertension pour le chromosome 17 du rat Dahl salt-sensitive. « Ref. 12 » fait référence à la région du QTL délimitée par Garrett M. R. et al. (Figure prise de Grondin M. 2005<sup>136</sup>)

## 4.2 Chromosome 16

Le chromosome 16 de *Rattus norvegicus* possède 90 238 779 pbs (Figure 11) et plus de 657 gènes ([http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/)). Il possède des régions homologues avec les segments des chromosomes 3, 4, 8, 10, 13 et 19 de l'*Homo sapiens* (Figure 12 A) et avec les segments des chromosomes 8 et 14 de *Mus musculus* (Figure 12 B).

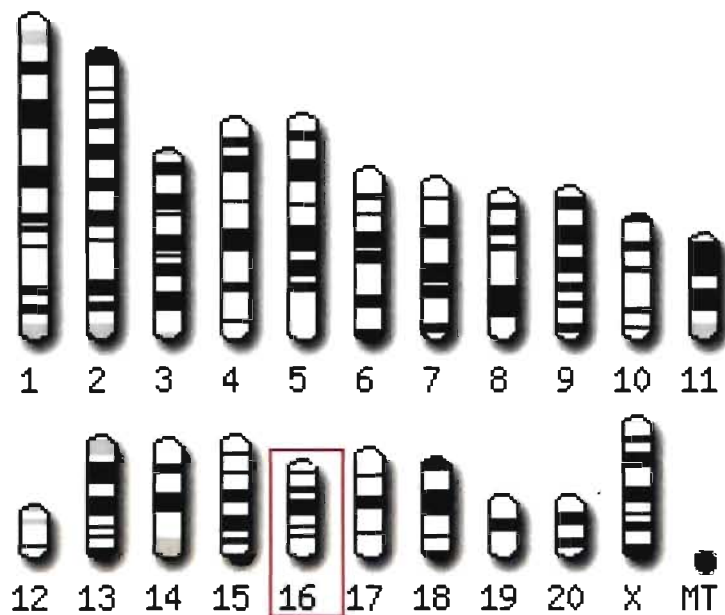


Figure 11. *Caryotype de Rattus norvegicus. Chromosome 16.*

(Figure prise de Ensembl gene : [http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/))

### 4.2.1 Études précédentes

Les résultats obtenus par la même équipe de Garrett M. R. et *al.*<sup>109</sup> ont démontré qu'il existait une évidence significativement suggestive pour un *QTL* de la PA sur le chromosome 16. La valeur du *LOD score* sur ce chromosome se situait autour de 2.3 (Figure 13). Ce résultat suggérait la présence d'un *QTL*.

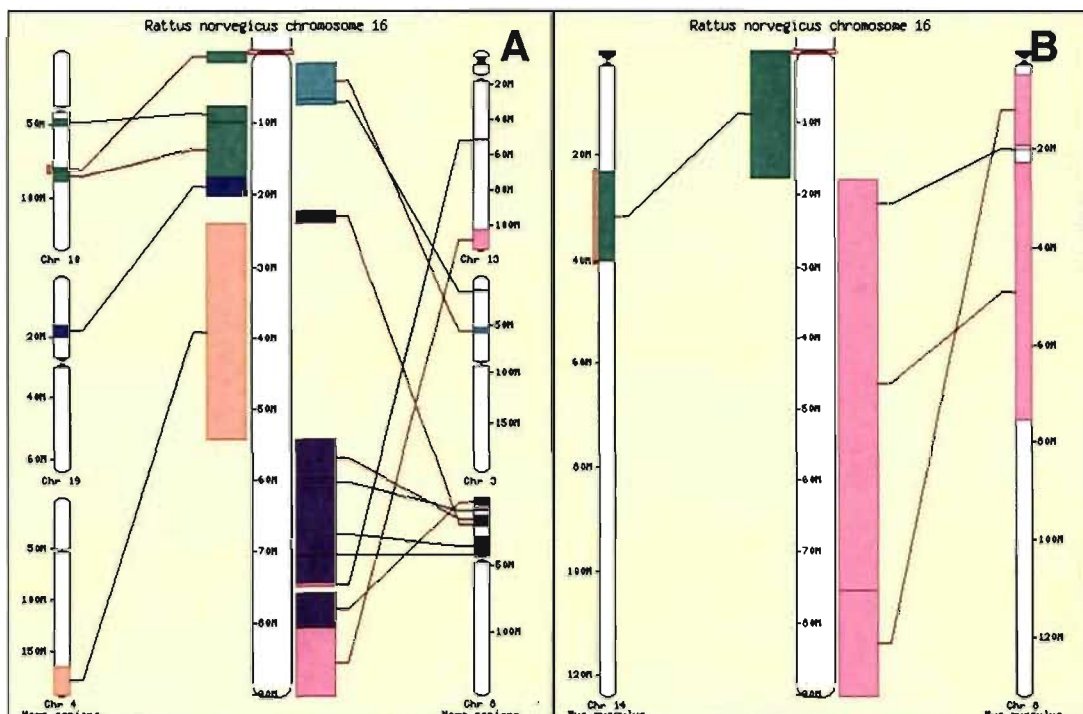


Figure 12. A Régions homologues du chromosome 16 de *Rattus norvegicus* avec *Homo sapiens*. B Régions homologues du chromosome 16 de *Rattus norvegicus* avec *Mus musculus*. (Figure de Ensembl gene :[http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus))

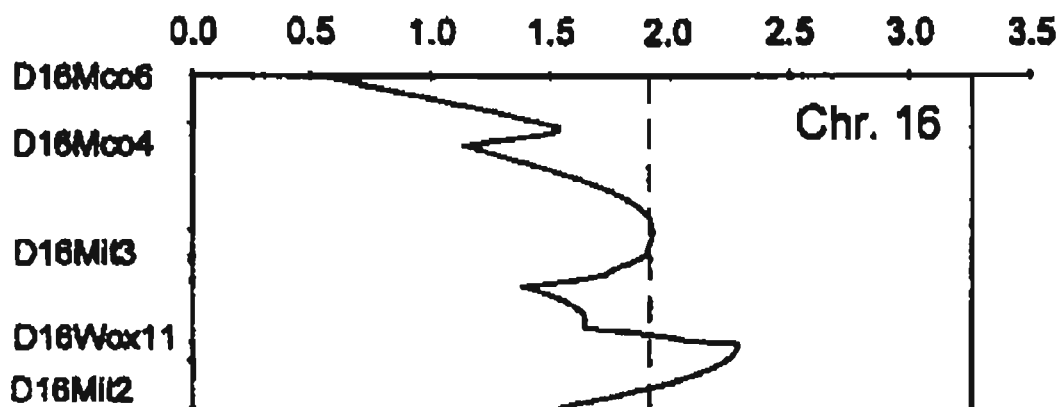


Figure 13. Résultats d'après Garrett M. R. et al., publiés en 1998<sup>109</sup>. Identification d'un QTL pour la PA sur le chromosome 16 par analyse de liaison génétique. Les chiffres du haut indique les valeurs de LOD scores; la ligne pointillée indique la valeur minimale de LOC score pour avoir une liaison suggestive. (Figure prise dans Garrett M. R. et al. 1998<sup>109</sup>).



Toutefois, trois ans plus tôt avec Schork N. J. et al.<sup>137</sup>, des études de biométrie et de techniques de génétiques moléculaires ont démontré que le chromosome 16 avait de forte chance de posséder un *QTL*. La valeur de *LOD score* qu'ils ont obtenu étaient de 4.3.

À partir de souches congéniques pour le chromosome 16, Moujahidine M. et al.<sup>138, 135</sup> ont délimité une région du *QTL* positive pour la PA entre les marqueurs D16Chm66 et D16Chm36, mesurant 2,16 Mb (Figure 14).

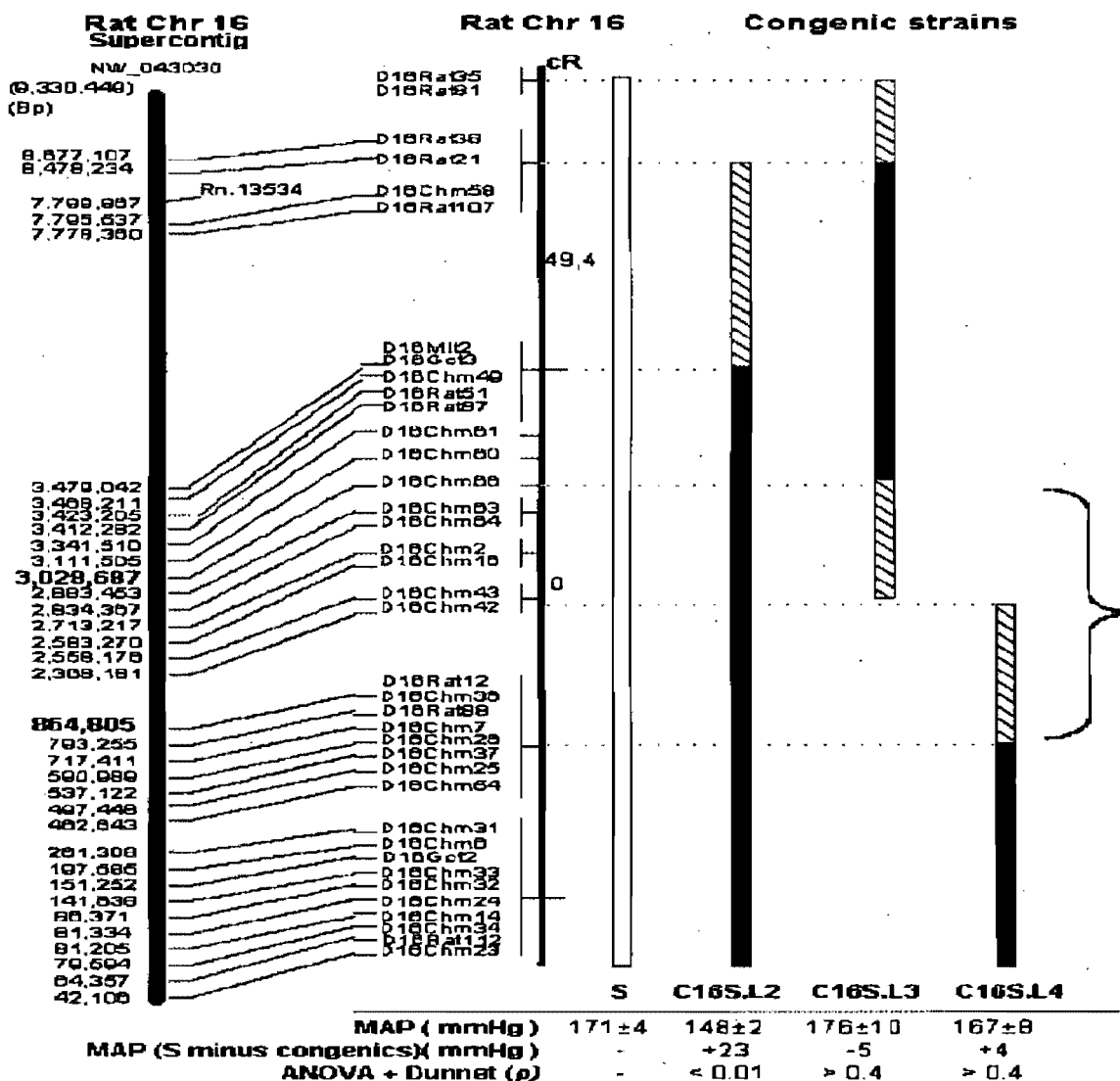


Figure 14. Résultats d'après Moujahidine M. et al., publiés en 2003<sup>139</sup>. Carte physique de l'intervalle du *QTL* de l'hypertension pour le chromosome 16 du rat Dahl salt-sensitive. (Figure prise de Moujahidine M. et al. 2003<sup>139</sup>)

CHAPITRE II

# **PROJET DE RECHERCHE**

L'objectif principal de ces travaux est de déterminer si les chromosomes 17 et 16 du rat DSS contient un ou plusieurs *QTLs* de la PA. Si c'est le cas, il faut les isoler et déterminer quel(s) gène(s), contenu(s) dans ces *QTLs* est responsable de la variation de la PA observée chez les hypertendus.

Comme il a été mentionné précédemment (section 4.1), des études d'analyses de liaison génétique ont permis de détecter un *QTL* de la PA sur le chromosome 17 et 16 du rat DSS. Ces résultats ont été confirmés par la production de lignées congéniques et ont permis de cartographier une grande région du *QTL* du chromosome 17 de 34,8 Mb et du chromosome 16 de 2,16 Mb.

À l'aide des résultats déjà obtenus, l'objectif de mon projet est de diminuer la région du *QTL* de la PA sur le chromosome 17 et 16 de 1 à 2 cM. Des sous-souches congéniques constituées de substitutions chromosomiques de plus en plus petites doivent être produites. Si les lignées sous-congéniques ont une PA significativement plus basse que celle du rat contrôle DSS, alors il y a un *QTL*. De plus, de nouveaux marqueurs microsatellites polymorphes du chromosome 17 et 16 me permettent de cibler plus précisément la région du *QTL*. Par la suite, il faut identifier les gènes candidats inclus dans cette région du *QTL* de la PA sur les chromosomes 17 et 16. Un autre objectif est de produire des allèles hétérozygotes pour ces deux régions de *QTL* pour étudier leurs rôles fonctionnels et leurs bases génétiques sur la PA. Ainsi, on peut étudier les fonctions de chaque *QTL* tout en maintenant le reste du génome en uniformité.

L'identification d'un *QTL* pour la PA chez le rat permet de mieux comprendre l'hypertension chez l'humain. L'objectif de notre recherche est de tenter d'approfondir les connaissances que nous avons sur l'hypertension chez le rat DSS. Une extrapolation du savoir du rat vers l'humain nous permettrait ainsi de développer des traitements mieux ciblés pour les patients souffrant d'hypertension.

CHAPITRE III

# MÉTHODOLOGIE

## 5- MESURE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE

### 5.1 Animal

Les lignées de rats SS/Jr utilisée pour construire des souches congéniques et des sous-souches proviennent du Dr. John P. Rapp et sont désignées ici DSS. La lignée *Lewis* LEW/CrlBR, désignée ici LEW, a été achetée de Charles Rivers (Lasalle, Québec, Canada). Pour s'assurer que la souche DSS et la souche LEW ne soient pas génétiquement contaminées, un strict et rigoureux test de contrôle de qualité a été fait. En tout, 88 marqueurs espacés d'environ 10 à 15 cM, répartis sur tout le génome du rat ont été utilisés pour être génotypé à chaque troisième générations, en partant de la cinquième. À chaque génération, au moins un marqueur choisit au hasard pour chaque chromosome est génotypé. Chaque échantillon d'ADN de rat DSS testé, par exemple, est comparé à l'ADN du rat DSS standard provenant des travaux initiaux. Le génotypage des marqueurs élimine les possibilités d'erreurs. De plus, pour éliminer les erreurs de croisements pouvant conduire à une contamination, une stratégie d'étiquetage (*Tag*) des rats sur la peau permet de les identifier dès la naissance<sup>140</sup>. Tous les protocoles de manipulations et de maintenances des animaux sont approuvés par notre comité institutionnel sur les animaux, ainsi que par les règlements provinciaux et fédéraux.

### 5.2 Souche congénique et sous-souche

Les souches et sous-souches sont désignées par un « C » pour congénique, suivit d'un chiffre qui représente le chromosome, des lettres « S.L » pour le croisement DSS et LEW, puis d'un chiffre pour l'identifier. Ainsi, pour le chromosome 17 ont obtenu les souches C17S.L1, C17S.L2, C17S.L3, C17S.L4 et C17S.L5, et pour le chromosome 16 ont a C16S.L1, C16S.L2, C6S.L3 et C16S.L4.

La construction de congénique est la même qu'expliquée précédemment dans la partie 3.2.1. Dans les lignées congéniques pour le chromosome 17, tout l'arrière-plan génétique du rat est sensible au sel (DSS), alors qu'une petite portion du chromosome 17 est normotendue (LEW). C'est la même chose pour le chromosome 16, tout l'arrière-plan génétique du rat est sensible au sel (DSS), sauf pour une petite région du chromosome 16 qui est normotendue (LEW).

### 5.3 Marqueurs microsatellites polymorphes

La délimitation d'une sous-souche congénique se fait à l'aide de marqueurs microsatellites polymorphes. Plusieurs marqueurs existent déjà et sont disponibles sur Internet, alors que pour d'autres, nous devons les chercher. Peu importe le chromosome, le principe est le même. À partir d'un contig dans lequel la délimitation doit se faire, on recherche des répétitions de di-, tri-, ou tétranucléotides caractéristiques des microsatellites. Cette recherche se fait automatiquement à l'aide d'un programme informatique disponible au laboratoire. Il suffit de rentrer la séquence nucléotidique du contig, et le programme nous donne une liste des répétitions ainsi que de leur position. Toutefois, il arrive que des répétitions ne soient pas détectées parce qu'elles ne répondent pas aux paramètres du programme informatique. Lorsque c'est le cas et que la liste des répétitions est épuisée, la recherche peut se faire selon l'ancienne méthode, qui consiste à imprimer la séquence nucléotidique du contig, puis de chercher page par page les microsatellites. Selon le guide de la nomenclature pour le rat (<http://rgnc.gen.gu.se/Brief.html>), lorsqu'un marqueur est trouvé, on le désigne par la lettre « D », suivie du chromosome et de l'institut (Chm pour CHUM ou Centre hospitalier de l'Université de Montréal) où il a été trouvé. Un marqueur du chromosome 17 et 16 se nomme donc avec le préfixe D17Chm et D16Chm, respectivement.

Les amorces d'amplification qui bornent le microsatellite trouvé au laboratoire, sont détectées par le logiciel *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Ce logiciel détermine les meilleures séquences nucléotidiques à utiliser pour amplifier un fragment d'ADN d'intérêt. Les marqueurs sont commandés des compagnies comme *Alpha DNA* et

*Invitrogen*. Pour tester le polymorphisme de ces marqueurs et sélectionner ceux qui mesurent environ 250 pb et moins, les amorces sont amplifiées par PCR avec des échantillons d'ADN DSS et LEW témoins. Pour savoir à quelle température les bandes sont plus visibles, l'amplification par PCR se fait à trois températures différentes, 50°C, 55°C et 60°C. La réaction de PCR obtenue est migrée par électrophorèse pendant 1 à 2 heures sur un gel d'agarose 4% coloré de bromure d'éthidium. Une photo est prise pour voir les bandes d'ADN sous lampe UV.

L'ADN utilisé pour le génotypage est extrait d'une biopsie de la pointe de la queue en utilisant un *Qiagen Genome kit*<sup>®</sup> (Mississauga, Ontario, Canada). Les conditions des cycles de PCR utilisés sont : 1 cycle de 95°C pour 5 minutes, 30 cycles de 94°C pour 40 secondes, 50°/55°/60°C pour 40 secondes, 72°C pour 1,5 minutes et un cycle de 72°C pour 5 minutes.

#### **5.4 Télémétrie**

La mesure de la PA se fait par télémétrie comme dans les études précédentes<sup>108, 136, 138, 139</sup>. Les couples de rats DSS et congéniques sont croisés en même temps dans les mêmes conditions. Seuls les rats mâles âgés de 21 jours sont sélectionnés pour le sevrage et sont maintenus sur une diète faible en sel de 0,2% NaCl (Harlan Teklad 7034). À partir de 35 jours d'âge et jusqu'à la fin de l'expérience, ils sont nourris par une diète riche en sel de 2% NaCl (Harlan Teklad 94217).

Les sondes de télémétrie (modèle PA-D70 de Data Sciences International) sont implantées dans l'artère fémorale lorsque les rats ont 56 jours, c'est-à-dire 3 semaines après le début de la diète riche en sel. À ce stade, les rats pèsent entre 205 et 320 g. La chirurgie se fait par anesthésie avec inhalation de 4% d'isoflurane pendant 3 minutes et maintenue avec 1 à 2% d'isoflurane. Le cathéter de l'implant contient le gel biocompatible situé au bout et le fluide non compressible qui relie le bout et le capteur de pression ensemble. Le cathéter atteint l'aorte abdominale et est retenu et fixé par des sutures au vaisseau sanguin. Le corps de l'implant qui contient le capteur de pression, le module électronique et la batterie, est fixé au

muscle de la cavité abdominale. Après la chirurgie, les rats ont 10 jours de convalescence avant que la PA soit lue. La diète riche en sel continue et est complétée par de l'analgésique buprenorphine à 0,5% mg/kg. Le système d'implant télémétrique provient de Data Sciences Inc. (St. Paul, MN). Chaque sonde de télémétrie est calibrée avant et nettoyée avant chaque usage, selon les instructions du fabricant.

Les résultats de la télémétrie sont la PAS, la PAD et la PAM. Étant donné que la PAS et la PAD sont constants avec les valeurs de PAM, seulement la PAM est montré. La lecture de la PA se fait à chaque 2 minutes durant la période de mesure. Ensuite, l'ensemble de ces résultats est regroupé pour faire une moyenne sur 24 heures qui apparaît comme un point sur le graphique. Les PA de toutes les souches sont mesurées au même moment, à au moins à deux moments différents, pour exclure les influences des variations saisonnières sur les mesures.

## 5.5 Analyse statistique

Pour comparer la PA entre une souche congénique et une souche contrôle DSS, l'analyse de variance de mesures répétées ANOVA, suivit du test de Dunnett, est fait à l'aide du programme SYSTAT 9 (SPSS Sci, Chicago, IL). Cette analyse permet de déterminer la différence ou l'absence de composantes de la PA entre une souche congénique et une souche DSS. La correction de Dunnett tient compte des comparaisons de plusieurs groupes et de la grandeur des groupes qui sont comparés.

Si la région du congénique est un *QTL* pour la PA, alors la PA de cette lignée congénique est significativement plus faible par rapport au témoin DSS. La lignée congénique est dite « positive » pour contenir un *QTL*. Par contre, si aucune différence significative de PA n'est observée entre les deux lignées, alors la souche congénique est dite « négative » pour contenir un *QTL*. En examinant les fragments de chromosome partager entre les sous-souches ayant un effet sur la pression de ceux qui n'en ont pas, on peut déduire la nouvelle grandeur du *QTL* de la PA sur le chromosome <sup>113</sup>.



## 5.6 QTL hétérozygote

Pour avoir des QTLs hétérozygotes, un mâle d'une souche congénique connu pour avoir un QTL de la PA est croisé avec une femelle DSS pour produire une progéniture  $F_1$ . Étant donné que tous les QTLs étudiés sont localisés sur des chromosomes autres que X et Y, un croisement réciproque entre une femelle de la même souche congénique et un mâle DSS est fait. Les PA des mâles hétérozygotes de la  $F_1$  provenant des deux croisements sont mesurées.

CHAPITRE IV

# RÉSULTATS

## 6- PRESSION ARTÉRIELLE DES CONGÉNIQUES

### 6.1 Lignées congéniques

#### 6.1.1 Chromosome 17

Dans l'étude précédente portant sur le chromosome 17, la construction des souches C17S.L1 à C17S.L5 avait permis d'identifier une région du *QTL* de la PA entre les marqueurs D17Rat15 et D17Rat97. Ce *QTL* mesurait 34,8 Mb <sup>136</sup>. Depuis ce temps, cinq nouvelles souches congéniques ont été construites (Figure 15) dans la même région que les souches précédentes, pour essayer de réduire la région que couvre ce même *QTL*. La souche C17S.L6 se situe entre les marqueurs D17Mgh5 et D17Chm14. Les sous-souches C17S.L8 et C17S.L11 dérivent de la souche C17S.L7. C17S.L8 se situe entre D17Chm75 et D17Rat34, C17S.L11 se situe entre D17Chm75 et D17Chm70, et C17S.L7 se situe entre D17Got50 et D17Rat34. La sous-souche C17S.L2 se situe entre D17Rat83 et D17Chm14.

Sur la figure 15, chaque région congénique est représentée par une bande noire, entourée de bandes hachurées pour les régions d'ambiguïté. La longueur de la bande représente la grandeur de la région congénique et est délimitée par les marqueurs microsatellites polymorphes. Les positions des marqueurs sur la carte physique sont obtenues par un *blast* de leur séquence sur la base de données du génome du rat (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10116>). Les marqueurs D17Chm ont été découverts au laboratoire (Tableau III), alors que les marqueurs D17Rat, D17Got, D17Mgh, D17Mit, D17Mco, D17Uia, D17Wox et autres proviennent de base de données sur Internet (Tableau IV). Le polymorphisme de ces marqueurs entre les souches DSS et LEW est représenté par le signe plus grand ou plus petit. En plus de ces informations, on retrouve aussi les contig et leur grandeur et les valeurs de PA pour chaque souche sur la figure 15.

De plus, les nouveaux marqueurs microsatellites permettent de corriger la région congénique de souche déjà existante comme C17S.L5, qui mesurait initialement 7,14 Mb (entre D17Rat97 et D17Chm14) et qui mesure maintenant 8,94 Mb (entre D17Chm93 et D17Mit5). Cette souche congénique est considérée comme étant négative pour contenir un *QTL*. Étant donné qu'elle couvre maintenant une plus grande région du chromosome, la région du *QTL* qu'elle délimite devient plus petite.

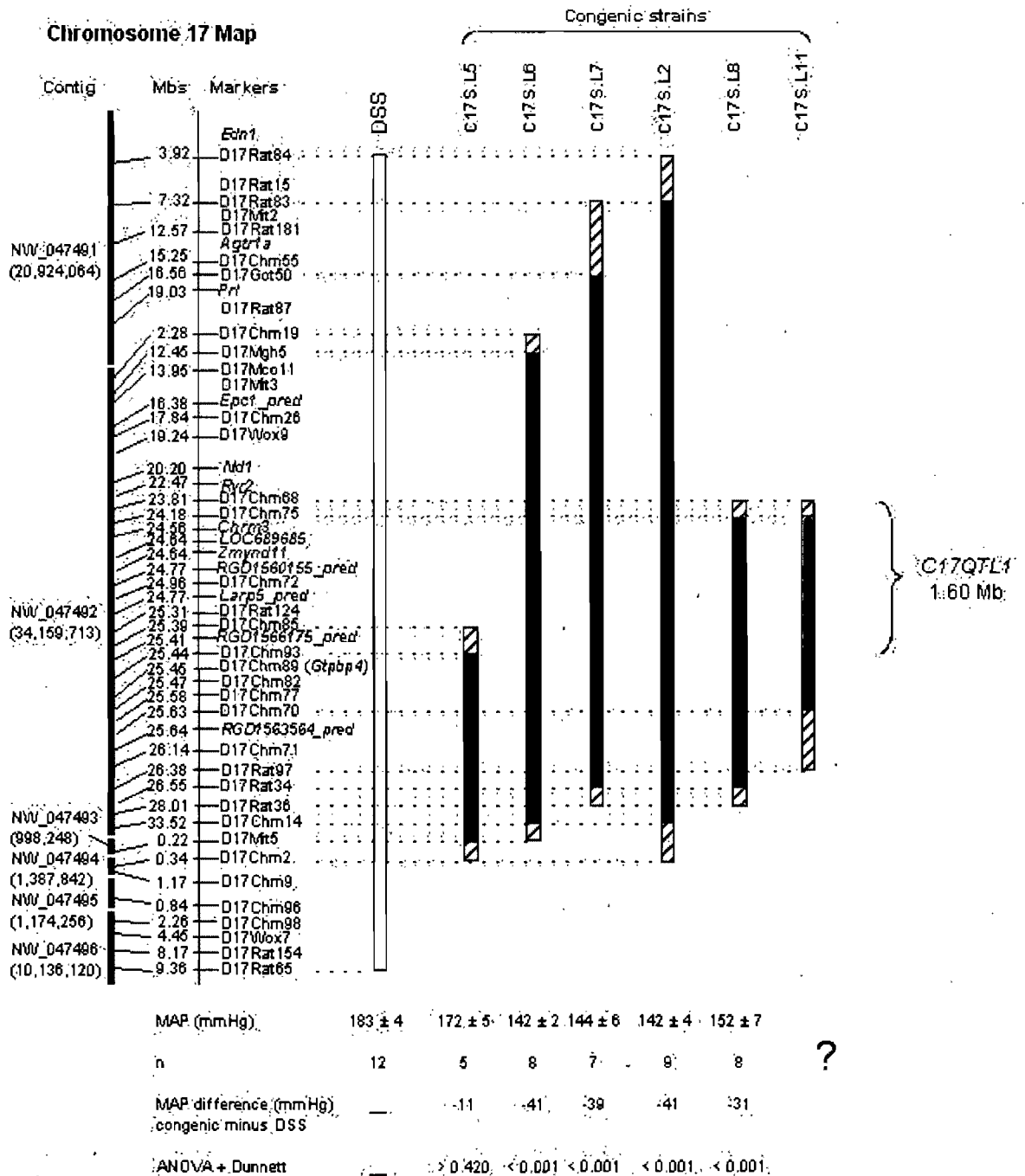


Figure 15. Carte physique du chromosome 17.

Une bande noire représente un fragment chromosomique provenant de la souche LEW. Une bande blanche représente un fragment chromosomique provenant de la souche DSS. Une bande hachurée aux extrémités des bandes noires indique une région d'ambiguïté entre deux marqueurs. Une bande grise représente une souche congénique pour laquelle les valeurs de la PA ne sont pas obtenues encore. Le reste du chromosome 17 et le reste du génome entier de chaque souche congénique sont homozygotes DSS/DSS. Les lignées congéniques représentées sont DSS.LEW-D17Rat83/D17Chm14 (C17S.L2), S.LEW-D17Chm93/D17Mit5 (C17S.L5), S.LEW-D17Mgh5/D17Chm14 (C17S.L6), S.LEW-D17Got50/D17Rat34 (C17S.L7), S.LEW-D17Chm75/D17Rat34 (C17S.L8) et S.LEW-D17Chm75/D17Chm70 (C17S.L11). À la droite, il y a les contig avec les positions des marqueurs en Mb, méga base. Les régions couvertes par l'apostrophe représentent le C17QTL1 et C17QTL2. Les valeurs de PAM, du nombre de rats « n » testés, de la différence entre les valeurs de PAM entre DSS et les congéniques et la valeurs de ANOVA+Dunnett sont présentés sous la carte. « ? » indique que les valeurs de PA pour C17S.L11 sont encore inconnues. QTL pour quantitative trait loci, Mb pour méga base.

Tableau III. Marqueurs microsatellites polymorphes D17Chm entre DSS et LEW pour le chromosome 17.

Marqueur du rat	Poids (pb)	Contig	Position	T. PCR (°C)	Polym	Séquence des amorces	
						F (5' > 3')	R (5' > 3')
D17Chm2	221	NW_047494	339,936	50	S>L	gagcaggaactggtctcattg	tgccatgacattggctaaaa
D17Chm5	230	NW_047495	1,076,666	60	S<L	aagtctcgggatagcctgag	cagctctgtggttctctg
D17Chm9	196	NW_047494	1,165,982	55	S>L	cagatggccaatgtgacagga	cctctgactctggcctaca
D17Chm14	199	NW_047492	33,523,935	60	S<L	gcagatcaggcaggagta	caggaggcagaagcattgt
D17Chm17	198	NW_047492	20,103,808	60	S<L	gtatcagagccctgcttg	cattacaccgcttctgcac
D17Chm19	193	NW_047492	2,274,796	60	S<L	tagtcccagcaattgtgc	gccatctgtgtgtgtgct
D17Chm26	241	NW_047492	17,842,593	50	S<L	ggcaacgatgcaaagaca	aaggtggtgattacccttg
D17Chm34	191	NW_047492	5,173,259	45	S<L	tggtcactatcgcgtgcc	ggcaagctgggtgctaata
D17Chm54	481	NW_047491	15,276,572	60	S<L	ctgaaaaccggagagctgag	gatggaactgtggaacagca
D17Chm55	393	NW_047491	15,252,889	55	S<L	cagcagcccatcactgtaaa	aaagttgtccccagtgfg
D17Chm62	280	NW_047491	4,806,549	60	S>L	tgtaggctgtgattcaatgg	gccagggtacacaagaana
D17Chm66	220	NW_047491	6,406,679	55	S<L	cctccaaggctagctgagt	ggcaaggtcaatgctgagag
D17Chm67	250	NW_047491	6,520,159	50	S<L	gccaggctggactacagagt	ttcccatcattctctcg
D17Chm68	206	NW_047492	23,807,656	60	S>L	actgaccctgggacatcaag	cagcctctggtgtctgat
D17Chm70	217	NW_047492	25,629,685	55-60	S<L	tcccgtaggaacagcattc	aaagcaagaaccaggacagc
D17Chm71	239	NW_047492	26,141,111	60	S<L	ggctagttgatctctcttg	gaatggggaggaggaaagcta
D17Chm72	244	NW_047492	24,956,304	60	S<L	cccagtcctgaattctctct	gggtttgaggtgggtgta
D17Chm75	184	NW_047492	24,182,235	60	S<L	aggccaccataccatcttg	ggcagagtcacattgcgta
D17Chm77	246	NW_047492	25,581,901	55-60	S>L	gtgaacacatgcatgcagaa	cacacagggacgtgcatcta
D17Chm80	245	NW_047492	23,110,733	55-60	S<L	ttgggtgctcactggcta	ccctctctctctccacct
D17Chm82	232	NW_047492	25,467,320	60	S<L	gatcattgcgagatccagg	tcactagggagtggtgct
D17Chm85	242	NW_047492	25,390,441	50	S>L	ccatagtggtgcatgtg	gggaccagcccctgtatatt
D17Chm86	249	NW_047492	25,422,491	60	S>L	actgctgctctccaggga	agccatctctccagcccta
D17Chm89	233	NW_047492	25,448,101	50	S<L	tttgggatgctcttatgc	gcagggtcaaggtcagccta
D17Chm93	222	NW_047492	25,440,961	55?	S>L	ctgctgccacttacagcta	aagttcaggacagccaagg
D17Chm96	213	NW_047495	835,775	60	S>L	ggaaactctaccacagccaag	ggctgagaagagggggaact
D17Chm98	234	NW_047496	2,262,121	55-60	S>L	gcctaggcacataggtgagtg	ttccagactcccaaacagc

T pour température, pb pour paires de bases, polym pour polymorphisme, F pour *forward*, R pour *reverse*, S pour Dahl *salt-sensitive*, L pour LEW.

Tableau IV. Marqueurs microsatellites polymorphes D17Rat, D17Got, D17Mgh, D17Mit, D17Mco, D17Uia, D17Wox et autres entre DSS et LEW pour le chromosome 17.

Marqueur du rat	Poids (pb)	Contig	Position	T. PCR (°C)	Polym	Séquence des amorces F (5' > 3')	R (5' > 3')
D17Rat15	133	NW_047491	12,043,980		S>L	cggggagtgtgatgtatgtg	gacaatcaactgtcaccgga
D17Rat16	154	NW_047491	15344541	50-55-60	S<L	ctcctgaaagttgccctctg	tccatggatgggaactgtg
D17Rat34	175	NW_047492	26,550,215	50-55	S<L	tgcaagtctcctaaaagtct	tctcccaggagcttgagtt
D17Rat36	184	NW_047492	28,005,804	50	S>L	attgccttctactcgggtg	agccaatgtggatgatgta
D17Rat51	143	NW_047497	1,831,506	50-55-60	S<L	tcccactgttcaatccattt	acatgcagacagaacattct
D17Rat65	226	NW_047496	9,359,859	50-55-60	S>L	gggtaaggacaaggctctga	tgccagcttttcaatgtgg
D17Rat83	132	NW_047491	7,323,281	55	S>L	tggcaagcacttggattcac	caatcatgaaaacaatcacaca
D17Rat84	138	NW_047491	3,919,875	50-55	S<L	ccaatccaagctccagag	tcgtcagccagactccctat
D17Rat87	149	Chr7		50-55	S>L	cctttccacttactctgatcica	gagatggcttctactcaacagg
D17Rat97	234	NW_047492	26,383,201	50-55	S<L	gagccctctctgcattcatc	tcggccaaagggtacaataag
D17Rat116	155	NW_047491	4,762,867	55	S<L	tcagttaatcaggcattgcg	atcacatgagacaaaacccc
D17Rat124	148	NW_047492	25,312,333	55	S<L	gccagactgtgtctgtgctc	tgttctgaatgatgcttggt
D17Rat162	200	NW_047491	12,320,089	55-60	S>L	acataatgggacttcttctaaca	ccaggttctgggctgttcta
D17Rat181	170	NW_047491	12,573,341	50	S<L	tcaaggacacaactgaggg	gaagaccatttagatcccc
D17Got37	111	NW_047491	9,891,456	55,60	S<L	ctctggctccacaggca	agagagaggagagagatgtg
D17Got38	94	NW_047491	9,252,653	45,50,55	S>L	gtcaccagagtggtatgc	taaatgtcaataaagataggaagt
D17Got39	152	NW_047491	9,772,223	60	S>L	aaatgattggtctgggactg	tgaggatggaattataggctg
D17Got42	245	NW_047491	7,725,136	50,55,60	S>L	tgccctctgttagcaccg	ctcgtactgatttctatcccaa
D17Got47	177	NW_047491	16,506,414	50,55,60	S<L	ttaaattggatggggacttca	cacccaacatagacatgatc
D17Got50	212	NW_047491	16,564,021	50,55,60	S>L	ctgaccaggcatatggaa	tcagtactgaggattgacactcg
D17Got114	108	NW_047491	11,401,594	55	S>L	tagggaaagacggacctgtg	aaattttgcaaaagagctggag
D17Mgh5	122	NW_047492	12,446,807	55	S<L	atggagtggactgaaaattg	caccatgttacaacccccag
D17Mit2	127	NW_047491	12,669,858	50-55	S>L	tgtgtccacagaatactt	ataccatgctcccacacat
D17Mit3	200	No Séq		55-60	S>L	taaggctccctcagactcca	tgggcagagaacagcagtc
D17Mit5	266	NW_047494	217,308	50	S>L	cccttggttattttgcc	tctctgtctggaagtag
D17Mco1	155	NW_047491	3,596,358	55-60	S>L	tgtgtaagggtgcatactgtg	tcgaagaccccaaatcccca
D17Mco2	272	NW_047491	10,441,458	50	S>L	tcaactctgaggaagtacg	ccttggagttcattgac
D17Mco3	259	NW_047492	23,631,034	50	S<L	ggggagacatagatttg	agatgaaggaggcaccgt
D17Mco11	155	NW_047492	13,904,946	50	S>L	cctgtaatggcatttaag	tccagcgattcatccctt
D17Uia3	132	NW_047491	2,568,801	50-55	S>L	ggacctacaagctggattca	cctcaaccttattctttgtg
D17Wox7	185	NW_047496	4,448,555	50	S>L	caagggagtgggtgtgctta	tgcatcagtgcttactgtgg
D17Wox9	108	NW_047492	19,242,265	55	S>L	gccagcctgatatacaaagtg	cttctaactctgtgagtgtgg
Chrm3	155	No Séq		55	S<L	gacactgggatgagtagaca	gggggaaaagagaagagat
Agtr1a	274	No Séq		50	S>L	gtatcagagtgattctggctcc	ccttctagtttacagcttc
ETI (Edn1)	194	No Séq		55	S>L	tcaggggtgattacacac	gaagagctctttctagctg
PRL	230	NW_047491	19,026,811	50	S<L	cacccttattggaatgtgtgg	gcttctgaccttatttttggc
G45205	131	NW_047491	3,044,184	50,55,60	S<L	caatgaggactggaggaaa	gcttccagctctgttctg

T pour température, pb pour paires de bases, polym pour polymorphisme, F pour *forward*, R pour *reverse*, S pour Dahl *salt-sensitive*, L pour LEW.

### 6.1.2 Chromosome 16

Dans l'étude précédente sur le chromosome 16<sup>139</sup>, les souches congéniques C16S.L1, C16S.L3 et C16S.L4 ont permis de délimiter une région du *QTL* de 2,19 Mb, situé entre les marqueurs D16Chm36 et D16Chm66. Depuis, trois nouvelles sous-souches congéniques C16S.L5, C16S.L6 et C16S.L7 ont été construites, plus deux autres dont les noms n'ont pas encore été attribués (Figure 16). Les sous-souches C16S.L5, C16S.L6 et C16S.L7 dérivent de la souche C16S.L1 et se situent respectivement entre les marqueurs D16Rat112 et D16Got3, D16Chm70 et D16Got3, D16Rat112 et D16Chm66 et finalement, D16Rat112 et D16Mit2. La souche C16S.L4 se situe entre les marqueurs D16Rat112 et D16Chm36, alors que la souche C16S.L3 se situe entre les marqueurs D16Chm66 et D16Rat38.

En général, l'organisation de la carte physique du chromosome 16 et le processus pour trouver les marqueurs sont les mêmes que pour le chromosome 17. Les marqueurs D16Chm ont été découverts au laboratoire (Tableau V), alors que les marqueurs D16Rat, D16Got, D16Mit et D16Uia proviennent de base de données sur Internet (Tableau VI).

Comme on peut le voir sur la figure 16, nous n'avons pas réussi à diminuer la région du *QTL* à partir des nouvelles sous-souches congéniques. Toutefois, nous avons confirmé une fois de plus qu'il existe bien un *QTL* dans cette région du chromosome 16 du rat Dahl. Les valeurs de PAM des sous-souches congéniques pour le chromosome 16 sont expliquées dans la section 6.2.2.



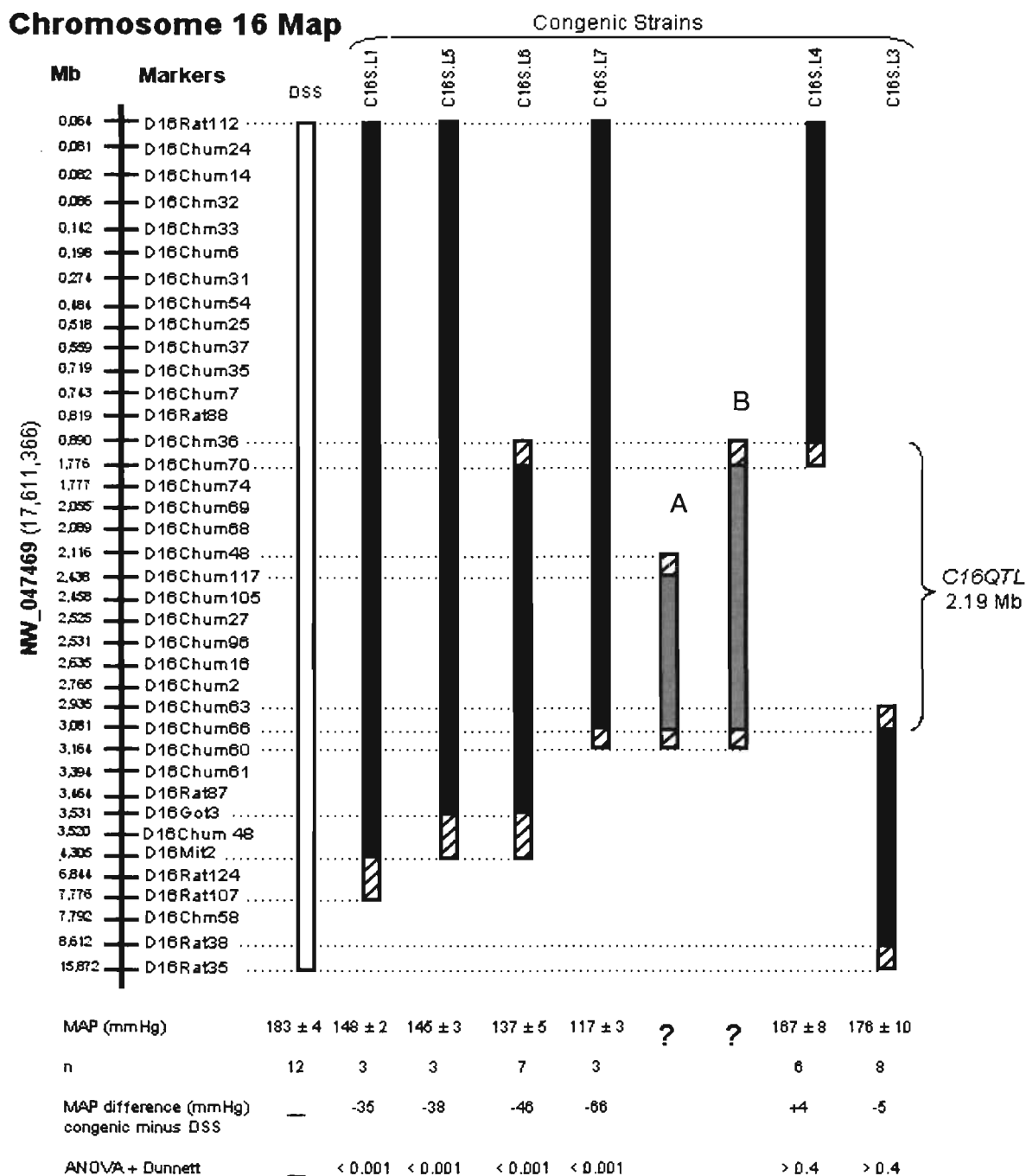


Figure 16. Carte physique du chromosome 16.

Une bande noire représente un fragment chromosomique provenant de la souche LEW. Une bande blanche représente un fragment chromosomique provenant de la souche DSS. Une bande hachurée aux extrémités des bandes noires indique une région d'ambiguïté entre deux marqueurs. Une bande grise représente une souche congénique pour laquelle les valeurs de la PA ne sont pas obtenues encore. Le reste du chromosome 16 et le reste du génome entier de chaque souche congénique sont homozygotes DSS/DSS. Les lignées congéniques représentées sont DSS.LEW-D16Rat124/D16Mit2 (C16S.L1), S.LEW-D16Chm66/D16Rat38 (C16S.L3), S.LEW-D16Rat112/D16Chm36 (C16S.L4), S.LEW-D16Rat112/D16Got3 (C16S.L5), S.LEW-D16Chm70/D16Got3 (C16S.L6) et D16Rat112/D16Chm66 (C16S.L7). À la droite, il y a le contig avec les positions des marqueurs en Mb, méga base. La région couverte par l'apostrophe représente le C16QTL. Les valeurs de PAM, du nombre de rats « n » testés, de la différence entre les valeurs de PAM entre DSS et les congéniques et la valeur de ANOVA+Dunnett sont présentés sous la carte. « ? » indique que les valeurs de PA pour A et B sont encore inconnues. QTL pour quantitative trait loci, Mb pour méga base.

Tableau V. Marqueurs microsatellites polymorphes D17Chm entre DSS et LEW pour le chromosome 16.

Marqueur du rat	Poids (pb)	Contig	Position	T. PCR (°C)	Polym	Séquence des amorces	
						F (5' > 3')	R (5' > 3')
D16Chm2	208	NW_047469	2,764,829	50-55-60	S>L	agtatgccgtcacaccact	.gagggaggtgcagacctta
D16Chm3	196	chr1		50-55-60	S>L	cacctctcgtcactttt	aatacgtcaaggggaacacg
D16Chm6	229	NW_047469	198,728	50	S>L	tcctcatacaccatccactca	gcctttctctccccata
D16Chm7	208	NW_047469	743,515	50	S<L	accagctctgtaccagtg	gaatgactccatgccaggaa
D16Chm14	193	NW_047469	81,463	60	S>L	gtttatggctcgggggtca	gctgtctctgttagccatg
D16Chm15	205	no blast		50-55-60	S>L	agcatctgcaccttggcat	tcataggcaaatggatgaa
D16Chm16	181	NW_047469	2,635,424	50	S>L	gctgtaacacccatgtgagg	ctttatgcaaacgtgacca
D16Chm21	218	no blast		55	S>L	attgtctcgcgaatccaac	gaagatgtggctggagggtg
D16Chm23	190	NW_047469	42,459	60	S>L	cacacaagcctccggtcta	tgagaatattggaggcagagg
D16Chm24	193	NW_047469	81,352	60	S>L	gtttatggctcgggggt	gctgtctctgttagccatg
D16Chm25	206	NW_047469	518,893	55	S>L	aggaatgggcctacagttt	tgggatggtaggctgttag
D16Chm26	201	NW_047469	612,793	60	S>L	tgcaaatgacagagtcagtg	caggggtgtgtgtgtctt
D16Chm27	207	NW_047469	2,530,780	50	S>L	attggctgctgtctattc	aatttggtaagccgatgtgg
D16Chm31	205	NW_047469	274,411	55	S<L	aggacttgaggcattttga	cctctaacctccgcacacat
D16Chm32	217	NW_047469	86,786	50	S>L	tggcttggctcaccagtaat	ggcttccatctagtctc
D16Chm33	198	NW_047469	142,127	55	S>L	ccaggagtgtggtggaaaag	tgaaaacaaggcagttgcag
D16Chm34	189	NW_047469	79,732	50	S>L	tcataacgcagccattttaa	ggcgcctttatagcaaat
D16Chm35	210	NW_047469	719,495	55	S>L	tgcacactctgaaatccata	ggggcctataagaaggcaag
D16Chm36	216	NW_047469	890,291	55	S>L	cacggaggccaatagaagat	cccagacaaggaatgtctca
D16Chm37	201	NW_047469	559,111	55	S>L	cctagccctctctgatgtgg	ggataggccctccattctgt
D16Chm40	199	chr15		55	S<L	tcacacaactaaccggaagtg	tgagagaccccctctcacag
D16Chm49	213	NW_047469	3,520,914	45	S<L	ggccaaaggtctgaagaaag	cgggctctgtctctgtgtt
D16Chm54	201	NW_047469	484,455	50	S>L	ttctgagcctgtgaagcaga	cagaaacagggcagcctaag
D16Chm56	253	chr5		50-55-60	S>L	ctcaacctctctgacacca	ttggctcatgataaaatgtctg
D16Chm57	278	chr19		55	S<L	gggaggaggatggttttgt	atgggtgaaggagagcaatg
D16Chm58	199	NW_047469	7,792,479	55	S<L	ccagcctgctctacacactg	ctcagacaccatctgggaca
D16Chm60	261	NW_047469	3,164,577	50	S>L	catggattaatggtcccagt	tcggtctatctgtccgtctg
D16Chm61	190	NW_047469	3,394,486	50	S<L	agcagtaatgtgcccagctc	atgcttagacaccgcagat
D16Chm63	238	NW_047469	2,935,356	50	S<L	gaccagccccactttatga	gtgcctggcttgagaattg
D16Chm64	250	NW_047469	2,886,881	50	S>L	accacagatgccaccagttt	accactcagtcaacctca
D16Chm66	238	NW_047469	3,080,404	50	S>L	actgggagggagagactggt	tccagatgatggccttta
D16Chm68	255	NW_047469	2,089,122	50	S>L	ggctctctgagtggaaacca	tccgacattcaacatctgc
D16Chm69	237	NW_047469	2,055,116	50	S>L	ccttatgggatctggggagt	aaagtccgtcgtctctcc
D16Chm70	208	NW_047469	1,776,170	55	S<L	cagcaagctcaggccttta	ttctcgcctctctgttagacc
D16Chm74	217	NW_047469	1,776,235	50	S<L	atgtgcacaccccacgaat	ccgctaaaatcaacctgtct
D16Chm75	234	chr2		55-60	S<L	acagtcctcccacttaggc	cccaccacacctagcttttc
D16Chm78	158	no blast		60	S<L	cgaccagtgtaggggattgt	ggtttctgtccctaatacc
D16Chm96	248	NW_047469	2,525,795	60	S<L	ttgcacacactcagcatacg	aaacacggggtgactcaaac
D16Chm105	240	NW_047469	2,458,981	55	S>L	tgttcaggagtgtgcgtgt	gcaggggaggtttaggagt
D16Chm117	229	NW_047469	2,438,221	60	S<L	cagcctctctgtgtctgg	gggttgcctgagccactat

T pour température, pb pour paires de bases, polym pour polymorphisme, F pour *forward*, R pour *reverse*, S pour Dahl *salt-sensitive*, L pour LEW.

Tableau VI. Marqueurs microsatellites polymorphes D16Rat, D16Got, D16Mit et D16Uia entre DSS et LEW pour le chromosome 16.

Marqueur du rat	Poids (pb)	Contig	Position	T. PCR (°C)	Polym	Séquence des amorces F (5' > 3')	R (5' > 3')
D16Rat7	165	NW_047470	1,849,395	55-60	S>L	aggttgctcagcacc	tccaaccagggttaactgc
D16Rat8	156	NW_047470	4,859,658	50-55	S<L	aagaggctcattcttaagca	tcaactgcacggactgagac
D16Rat10	138	NW_047470	1,444,903	50-55	S<L	ctgaagccaccagacttc	tcagctcagcatgtcacac
D16Rat12	112	NW_047469	350,093	55	S<L	cagacagggagagacaaacacc	accctgtgtccaatgggg
D16Rat14	146	NW_047475	10,580,898	55	S>L	caatactggatcggatctgggggtg	atggtgcgctgctatgtcta
D16Rat35	281	NW_047469	16,359,278	55	S>L	ccaaatcagggcataaaca	gggaaatgtaacctgaga
D16Rat38	229	NW_047469	8,612,371	50	S>L	ctgggccttcaatcaag	ttgtccccacaattgtca
D16Rat46	213	no blast		50-55	S>L	tgctaatggcatcatacatcc	tcagaaaaagtgacagagaaaaaga
D16Rat50	249	NW_047473	5,677,334	50-55	S<L	gctcaaattaggtggaagaa	aatggcagcaacagattacg
D16Rat67	254	NW_047473	10,822,634	45-50	S>L	ggcataagatgaggctaacga	gtgacttacctgtggcagc
D16Rat78	132	NW_047470	2,003,151	45	S>L	ggaggggactataggatt	taaagtggaaaatgcctggg
D16Rat81	153	NW_047469	15,872,404	55	S>L	gagccttagcagctggctt	ggccacatgtgcatgtata
D16Rat87	207	NW_047469	3,464,993	50-55	S<L	ctacatggcttgccttctc	ggcactgggatactgaaa
D16Rat88	148	NW_047469	819,188	50-55	S<L	gtcagaggccatctggaag	tccatgcatgtatgtgatca
D16Rat107	133	NW_047469	7,776,089	50-55	S>L	ttgtcctccacctctatgtg	tttattccacctgtgactg
D16Rat112	246	NW_047469	64,707	50-55	S>L	cctctgttctacataccaatcc	agtcacatccctgtgctcc
D16Rat124	145	NW_047469	6,844,441	55-60	S>L	aacagcacggtttcaaaga	tctgccagtcactgacat
D16Uia2	229	NW_047473	1,136,063	50-55	S>L	tcaaatccccctaaaacaca	atgtgtccactgggcatac
D16Uia4	93	NW_047473	8,339,090	50	S<L	agatacattatagatgatgaca	tggtatctgtccatcgct
D16Mit2	169	NW_047469	4,304,340	55	S<L	aacgaggggaaataagcacc	atccaaacctgacatctggc
D16Mit3	144	NW_047473	8,140,986	50-55	S<L	ataaatatccacacgcgatgg	gtgacgtcacagaagcaaca
D16Got2	176	NW_047469	152,078	55	S<L	aatttggagggcatgggt	tttggtcatgattttgtgg
D16Got3	267	NW_047469	3,531,402	50-55	S<L	actctatctaattgtagggcaggt	cacttggcgcagttcagag

T pour température, pb pour paires de bases, polym pour polymorphisme, F pour *forward*, R pour *reverse*, S pour Dahl *salt-sensitive*, L pour LEW.

## 6.2 Mesure de la pression artérielle

Les résultats de la télémétrie sont la PAS, la PAD et la PAM. Étant donné que la PAS et la PAD sont constants avec les valeurs de PAM, seulement la PAM est montré.

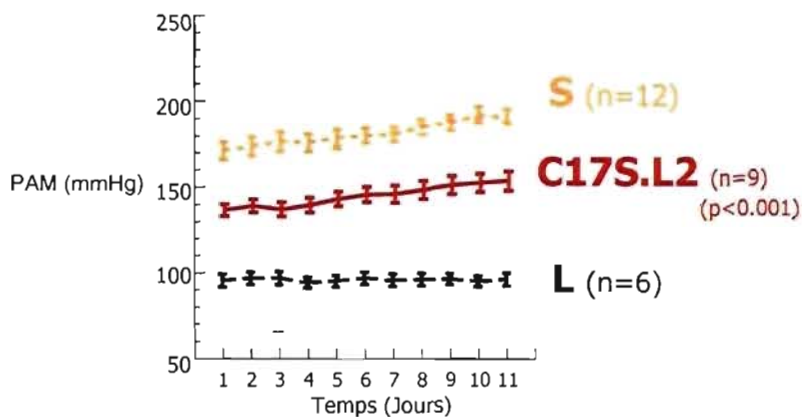
Les mesures sont prises de façon directe et continue sur une période de 10 à 20 jours. Une lecture de 10 secondes de la PA se fait à chaque 2 minutes, 24 heures sur 24 tout au long de la durée de l'expérience. Pour simplifier la présentation graphique, l'ensemble de ces résultats est regroupé pour faire une moyenne sur 24 heures qui apparaît comme un point sur le graphique. Les PA de toutes les souches

sont mesurées au même moment, à au moins à deux moments différents, pour exclure les influences des variations saisonnières sur les mesures.

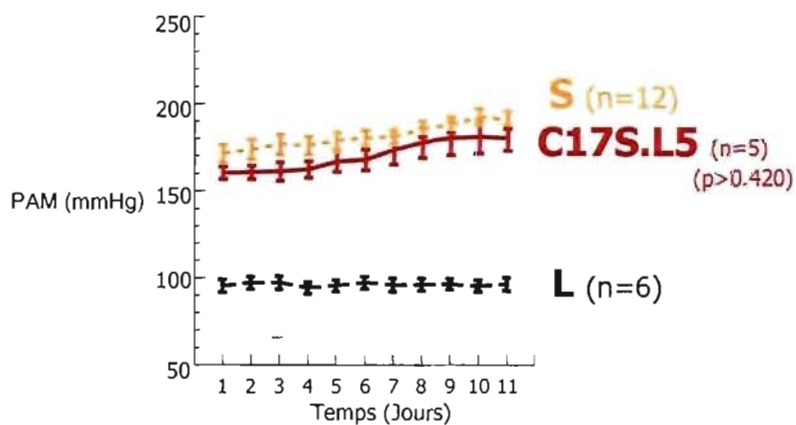
### 6.2.1 Chromosome 17

Les graphiques suivants (Figure 17) présentent les valeurs de PAM des souches C17S.L2, C17S.L5, C17S.L6, C17S.L7 et C17S.L8. Les résultats de la PA de la sous-souche C17S.L11 ne sont pas encore disponibles.

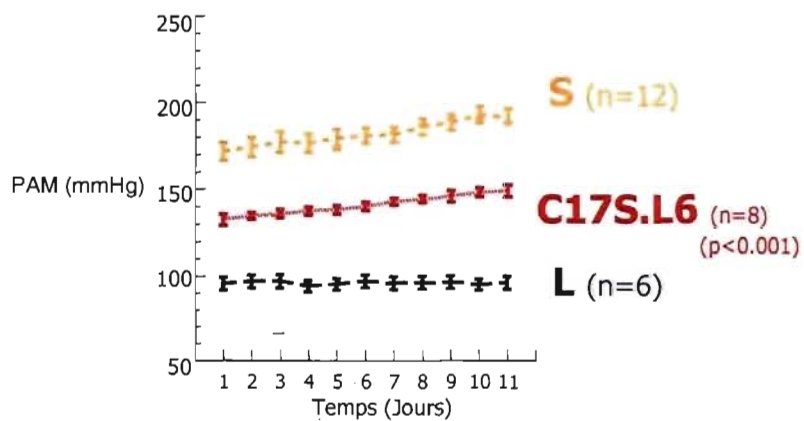
A



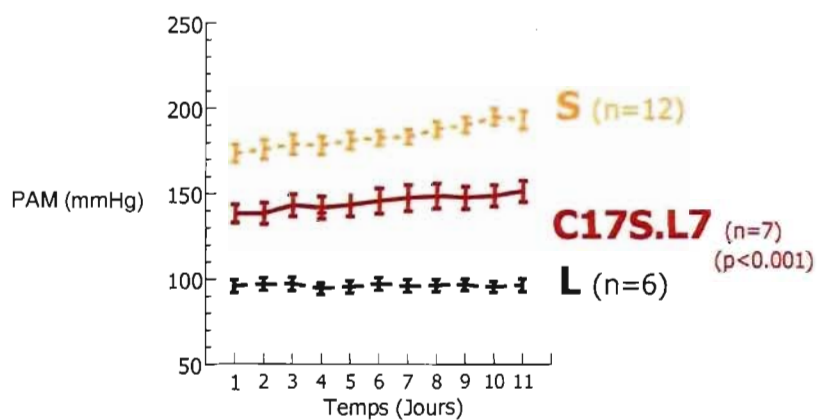
B



C



D



E

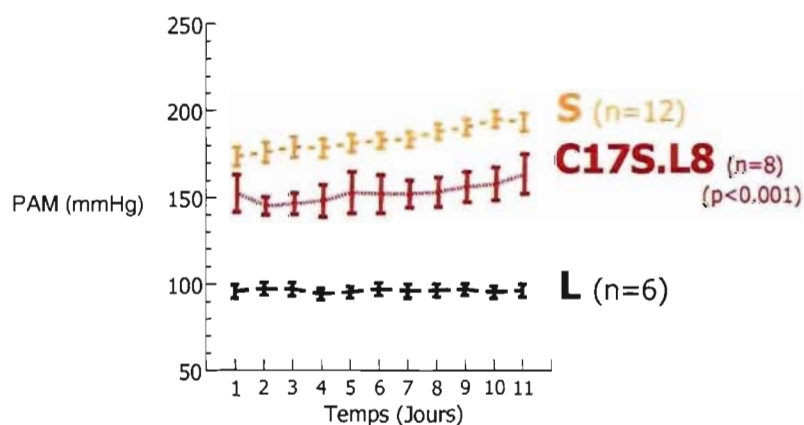


Figure 17. De A à E. Graphiques de la PA pour les souches congéniques du chromosome 17. Chaque point sur le graphique représente une moyenne des lectures sur 24 h. L'axe des « Y » représente la PAM en millimètres de mercure (mm Hg). L'axe des « X » représente le temps en jour. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. S pour DSS et L pour LEW.

Le tableau VII résume les valeurs de PAM des souches du chromosome 17. Les PAMs des sous-souches C17S.L2 ( $142 \pm 4$  mm Hg), C17S.L6 ( $142 \pm 2$  mm Hg), C17S.L7 ( $144 \pm 6$  mm Hg) et C17S.L8 ( $152 \pm 7$  mm Hg) diminuent significativement ( $p < 0,001$ ) par rapport à la souche contrôle DSS ( $183 \pm 4$  mm Hg). Par contre, la PAM n'est pas significativement différente ( $p > 0,420$ ) entre la sous-souche C17S.L5 ( $172 \pm 5$  mm Hg) et DSS ( $183 \pm 4$  mm Hg). Les valeurs de PA pour la souche C17S.L11 ne sont pas encore obtenues.

La sous-souche C17S.L5 est négative pour contenir un *QTL* et les autres sous-souches sont positives pour contenir un *QTL*. Ce *QTL* se situe dans la région partagée entre les sous-souches positives, mais non partagée par les sous-souches négatives. Le C17QTL1 mesure 1,60 Mb. Ce *QTL* a été identifié grâce aux valeurs de PA obtenues par radiotéléométrie et représente des segments communs entre les souches positives pour la PA.

Tableau VII. *Résumé des moyennes de la PAM pendant 11 jours pour chaque sous-souche congénique du chromosome 17 et des souches témoins DSS et LEW.*

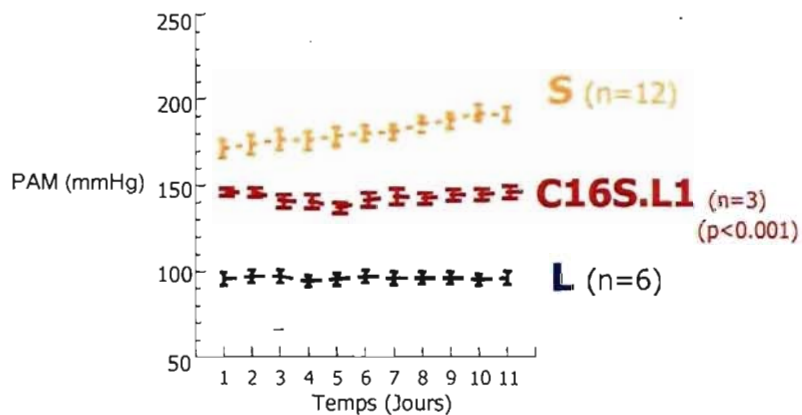
Souche	n	PAM (mm Hg)	Variation de la PAM (mm Hg)	ANOVA + Dunnett
DSS	12	$183 \pm 4$	-	-
LEW	6	$95 \pm 6$	-	-
C17S.L2	9	$142 \pm 4$	-41	$p < 0,001$
C17S.L5	5	$172 \pm 5$	-11	$p > 0,420$
C17S.L6	8	$142 \pm 2$	-41	$p < 0,001$
C17S.L7	7	$144 \pm 6$	-39	$p < 0,001$
C17S.L8	8	$152 \pm 7$	-31	$p < 0,001$

n pour nombre de rats, PAM pour mean arterial pressure, mm Hg pour millimètre de mercure,

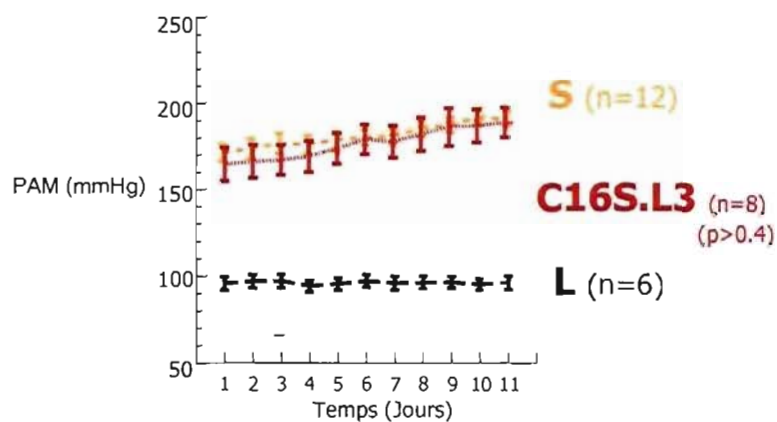
## 6.2.2 Chromosome 16

Les graphiques suivants présentent les valeurs de PAM des souches C16S.L1, C16S.L3, C16S.L4, C16S.L5, C16S.L6 et C16S.L7.

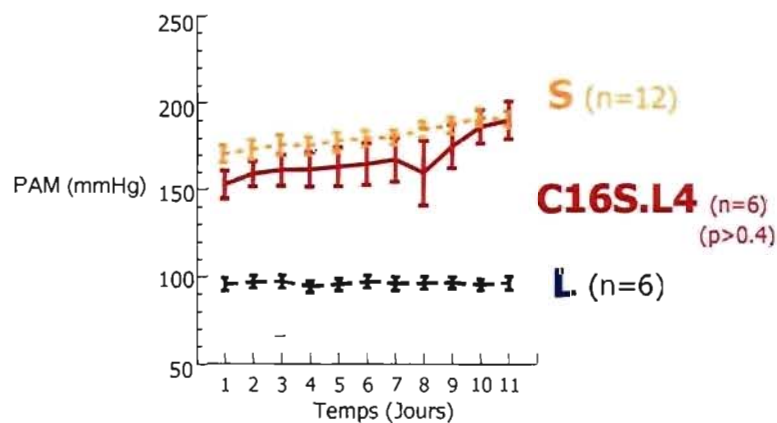
A



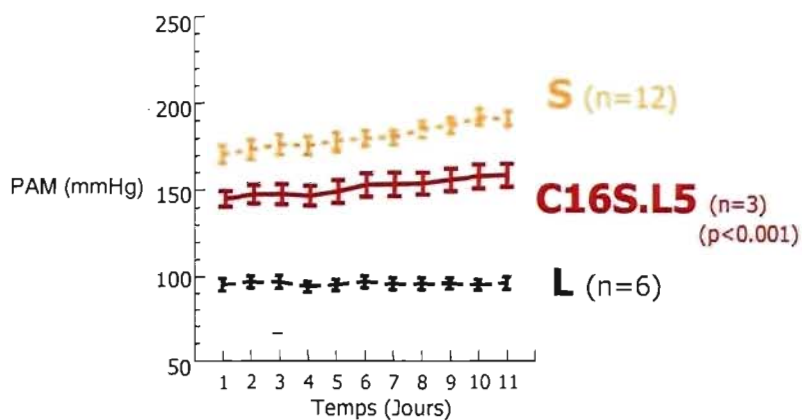
B



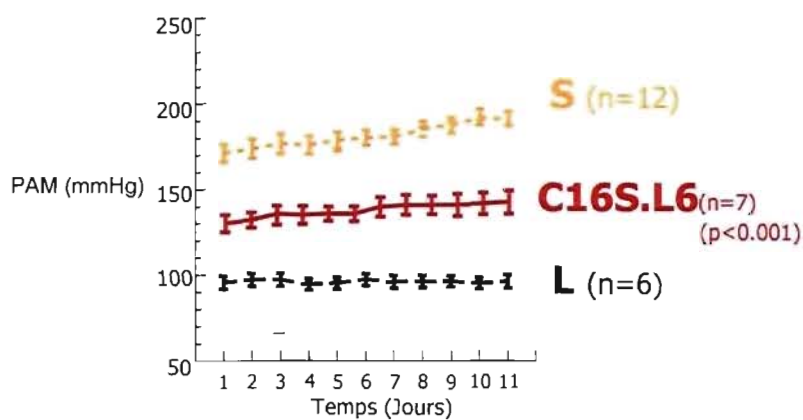
C



D



E



F

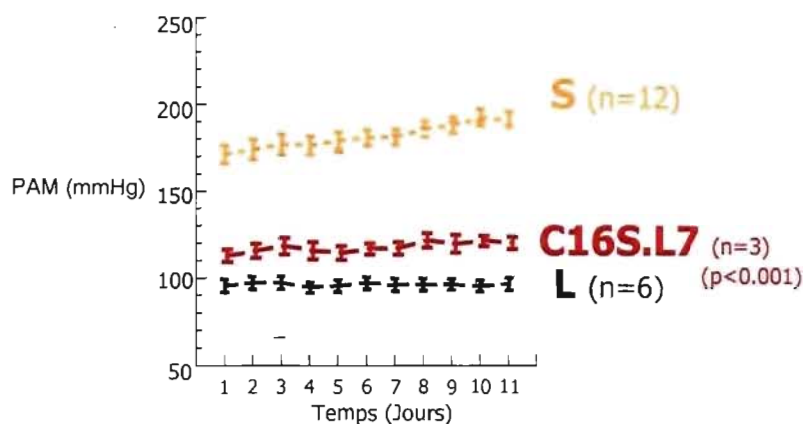


Figure 18. De A à F. Graphiques de la PA pour les souches congéniques du chromosome 16. Chaque point sur le graphique représente une moyenne des lectures sur 24 h. L'axe des « Y » représente la PAM en millimètres de mercure (mm Hg). L'axe des « X » représente le temps en jour. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. S pour DSS et L pour LEW.



Le tableau VIII résume les valeurs de PAM des souches du chromosome 16. Les PAMs des sous-souches C16S.L1 ( $148 \pm 2$  mm Hg), C16S.L5 ( $145 \pm 3$  mm Hg), C16S.L6 ( $137 \pm 5$  mm Hg) et C16S.L7 ( $117 \pm 3$  mm Hg) diminuent significativement ( $p < 0,001$ ) par rapport à la souche contrôle DSS ( $183 \pm 4$  mm Hg). Par contre, la PAM n'est pas significativement différente ( $p > 0,400$ ) pour les sous-souches C16S.L3 ( $176 \pm 10$  mm Hg) et C16S.L4 ( $167 \pm 8$  mm Hg) par rapport au contrôle DSS ( $183 \pm 4$  mm Hg). Les PAM des souches A et B ne sont pas encore obtenues.

Les sous-souches C16S.L3 et C16S.L4 sont négatives pour contenir un *QTL*, alors que les autres sous-souches sont positives pour contenir un *QTL*. Ce *QTL* se situe dans la région partagée entre les sous-souches positives, mais non partagée par les sous-souches négatives. Le C16QTL1 mesure 2,19 Mb. Ce *QTL* a été identifié grâce aux valeurs de PA obtenues par radiotélémetrie et représentent des segments communs entre les souches positives pour la PA.

Tableau VIII. *Résumé des moyennes de la PAM pendant 11 jours pour chaque sous-souche congénique du 16 et des souches témoins DSS et LEW.*

Souche	n	PAM (mm Hg)	Variation de la PAM (mm Hg)	ANOVA + Dunnett
DSS	12	$183 \pm 4$	-	-
LEW	6	$95 \pm 6$	-	-
C16S.L1	3	$148 \pm 2$	-35	$p < 0,001$
C16S.L3	8	$176 \pm 10$	-5	$p > 0,400$
C16S.L4	6	$167 \pm 8$	+4	$p > 0,400$
C16S.L5	3	$145 \pm 3$	-38	$p < 0,001$
C16S.L6	7	$137 \pm 5$	-46	$p < 0,001$
C16S.L7	3	$117 \pm 3$	-66	$p < 0,001$

n pour nombre de rats, PAM pour mean arterial pressure, mm Hg pour millimètre de mercure.

## 7- HOMOLOGIE AVEC L'HUMAIN ET LA SOURIS

### 7.1 Chromosome 17

La figure 19 illustre la carte d'homologie de C17QTL1. Tel qu'il est montré, la région C17QTL du rat Dahl *salt-sensitive* contient 6 gènes : *Chrm3*, *LOC689685*, *Zmynd11*, *RGD1560155\_predicted*, *Larp5\_predicted* et *RGD1566175\_predicted*. *Chrm3* est un gène qui code pour un récepteur cholinergique muscarinique 3, couplé à la protéine G, et qui induit la contraction de la majorité des muscles lisses<sup>141, 142</sup>. Chez la souris, le gène homologue à *Chrm3* se situe sur le chromosome 13, alors que chez l'humain, *CHRM3* se situe sur le chromosome 1. *Zmynd11* code pour une protéine en forme de doigt de zinc, contenant un domaine MYND 11, qui expose un site de liaison à l'ADN et qui est impliqué dans la régulation de l'ADN-dépendante à la transcription. Chez la souris, le gène homologue à *Zmynd11* se situe sur le chromosome 13, alors que *ZMYND11* se situe sur le chromosome 10 de l'humain. Le gène prédit *RGD1560155\_predicted* du rat est homologue au gène *Dip2c* de la souris et au gène *DIP2C* de l'humain. Chez ces deux espèces, *Dip2c* code pour une protéine d'interaction disco 2 homologue C (*Drosophila*). *Larp5\_predicted* code pour une protéine prédite, *La ribonucleoprotein domain family, member 5*. Chez la souris *Larp5* est sur le chromosome 13 et chez l'humain sur le chromosome 10. *LOC689685* et *RGD1566175\_predicted* sont des gènes prédits et n'ont pas d'homologue chez la souris et l'humain. L'identification des gènes se fait à l'aide du site Rat Genome Data (<http://rgd.mcw.edu/>).

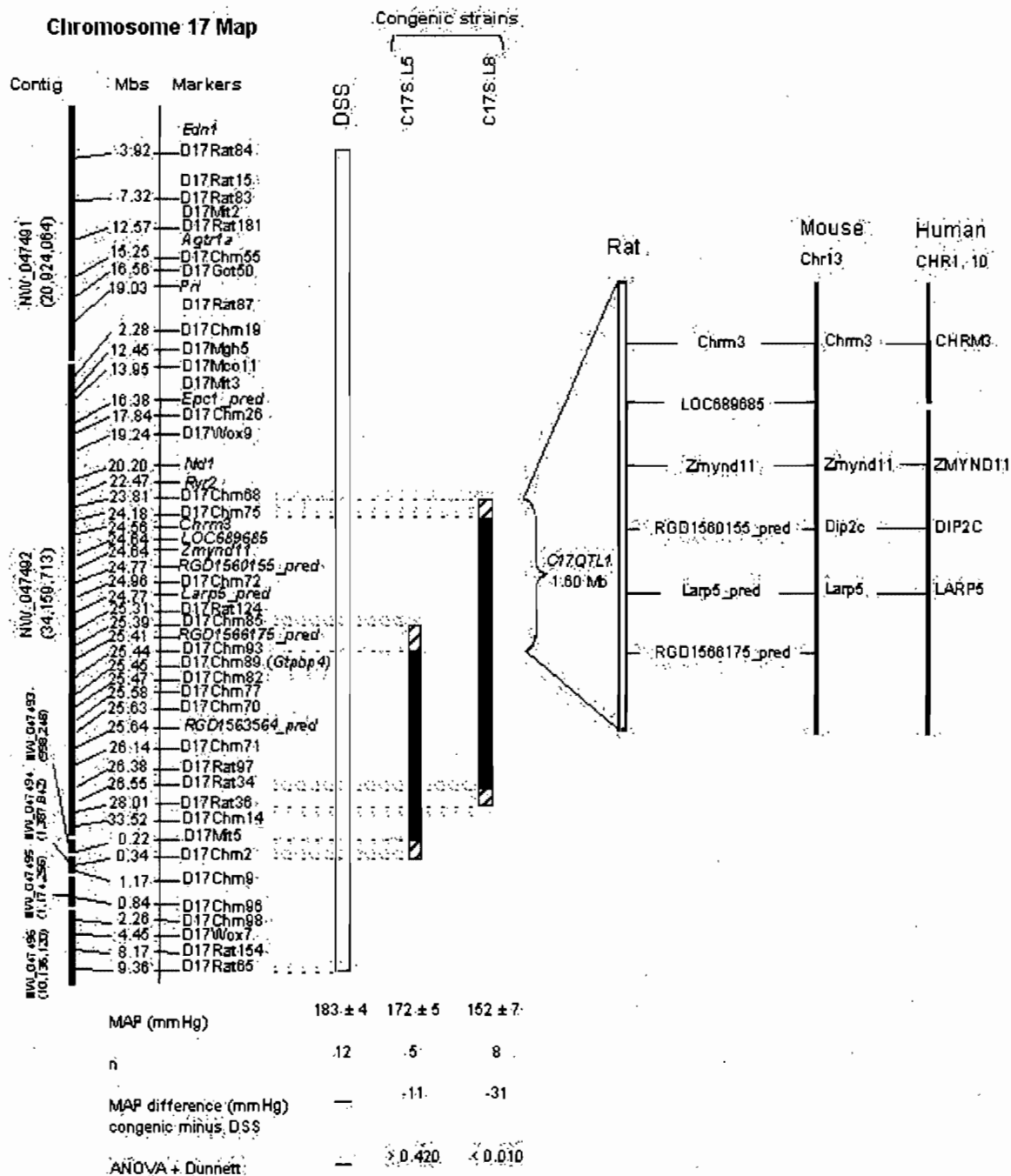


Figure 19. Carte d'homologie du chromosome 17 pour C17QTL1.

Une bande noire représente un fragment chromosomique provenant de la souche LEW. Une bande blanche représente un fragment chromosomique provenant de la souche DSS. Une bande hachurée aux extrémités des bandes noires indique une région d'ambiguïté entre deux marqueurs. Le reste du chromosome 17 et le reste du génome entier de chaque souche congénique sont homozygotes DSS/DSS. Les lignées congéniques représentées sont S.LEW-D17Chm93/D17Mit5 (C17S.L5) et D17Chm75/D17Rat34 (C17S.L8). À la droite, il y a les contigs avec les positions des marqueurs en Mb, méga base. La région couverte par l'apostrophe représente le C17QTL1. Les gènes de C17QTL du rat Dahl salt-sensitive sont énumérés. Les deux lignes noires représentent la région chromosomique homologue à C17QTL chez la souris et l'humain respectivement, avec les gènes homologues. Les valeurs de PAM, du nombre de rats « n » testés, de la différence entre les valeurs de PAM entre DSS et les congéniques et la valeurs de ANOVA+Dunnnett sont présentés sous la carte. QTL pour quantitative trait loci, MAP pour mean arterial pressure.

## 7.2 Chromosome 16

## Chromosome 16 Map

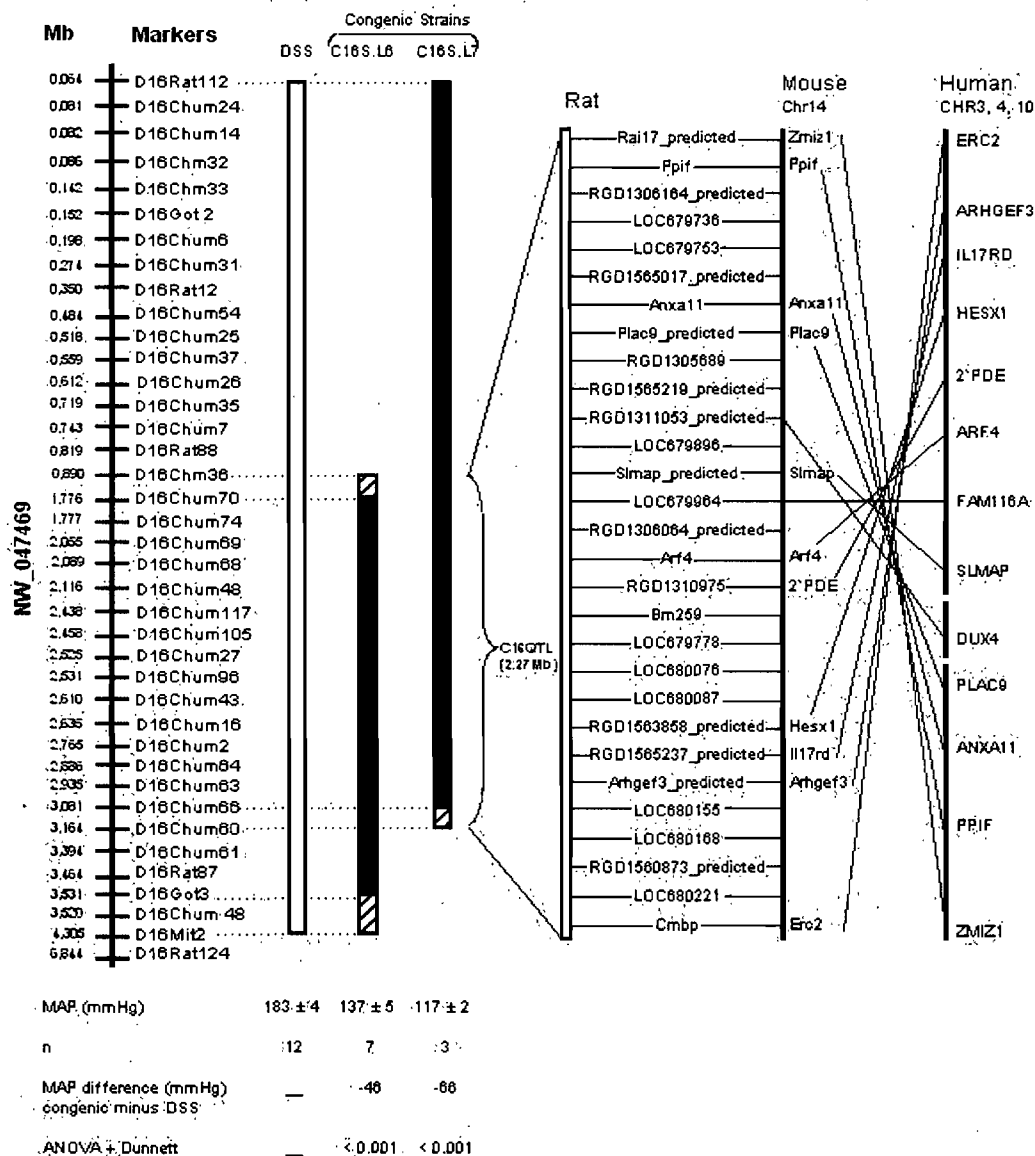


Figure 20. Carte d'homologie du chromosome 16.

Une bande noire représente un fragment chromosomique provenant de la souche LEW. Une bande blanche représente un fragment chromosomique provenant de la souche DSS. Une bande hachurée aux extrémités des bandes noires indique une région d'ambiguïté entre deux marqueurs. Le reste du chromosome 16 et le reste du génome entier de chaque souche congénique sont homozygotes DSS/DSS. Les lignées congéniques représentées sont S.LEW-D16Chm70/D16Got3 (C16S.L6) et D16Rat112/D16Chm66 (C16S.L7). À la droite, il y a le contig avec les positions des marqueurs en Mb, méga base. La région couverte par l'apostrophe représente le C16QTL. Les gènes de C16QTL du rat Dahl salt-sensitive sont énumérés. Les deux lignes noires représentent la région chromosomique homologue à C16QTL chez la souris et l'humain respectivement, avec les gènes homologues. Les valeurs de PAM, du nombre de rats « n » testés, de la différence entre les valeurs de PAM entre DSS et les congéniques et la valeur de ANOVA+Dunnnett sont présentés sous la carte. QTL pour quantitative trait loci, MAP pour mean arterial pressure.

La liste des gènes dans la région de C16QTL1 contient trop de gènes. Une étude des gènes candidats plus poussée de cette région est pour l'instant inutile. De plus, parmi ces gènes, plusieurs sont des gènes prédits ou non identifiés (Annexe A). Pour entreprendre des études de clonage positionnel, il faut que la région du *QTL* soit plus petite que 2 cM, soit environ 2 Mb et moins, ou sinon qu'elle contient moins d'une dizaine de gènes.

## 8- *QTLs* HÉTÉROZYGOTES

Pour étudier les fonctions d'un *QTL* tout en maintenant le reste du génome en uniformité, il faut construire des souches hétérozygotes pour un *QTL* déjà connu. La représentation visuelle des *QTLs* hétérozygotes est présentée dans les figures 21 et 23, pour le chromosome 17 et 16 respectivement. Les mesures de la PAM pour ces deux chromosomes sont représentées par les figures 22 et 24.

### 8.1 Chromosome 17

Sur la figure 21, la région du *QTL* utilisée pour faire la souche hétérozygote du chromosome 17 s'étend de D17Rat83 à D17Chm14. Cette région ne correspond pas à C17QTL1 mais le contient. Les PAM de DSS/DSS, LEW/LEW et DSS/LEW sont respectivement de  $184 \pm 5$  mm Hg,  $143 \pm 4$  mm Hg et  $162 \pm 6$  mm Hg. L'allèle LEW qui contient C17QTL1 dans la souche hétérozygote DSS/LEW n'est ni récessif ni dominant. La PAM de C17QTL1 hétérozygote DSS/LEW se situe entre les deux extrêmes homozygotes DSS/DSS et LEW/LEW (Figure 22). Les valeurs absolues des différences de PAM entre DSS/LEW et DSS/DSS (22 mm Hg), et entre DSS/LEW et LEW/LEW (19 mm Hg), correspondent à la moitié de la différence de PAM entre DSS/DSS et LEW/LEW (41 mm Hg).

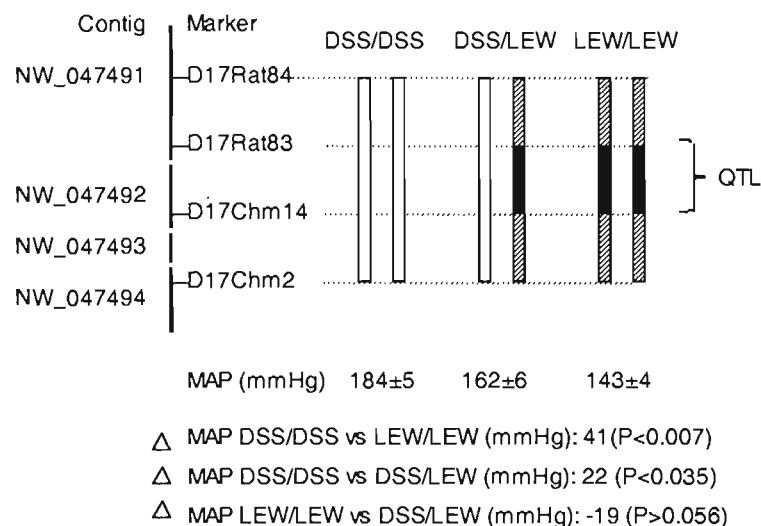


Figure 21. Carte du chromosome 17 démontrant l'aspect hétérozygote du QTL1. Une bande noire représente un fragment chromosomique provenant de la souche LEW. Une bande blanche représente un fragment chromosomique provenant de la souche DSS. Une bande hachurée aux extrémités des bandes noires indique une région d'ambiguïté entre deux marqueurs. QTL pour quantitative trait loci.

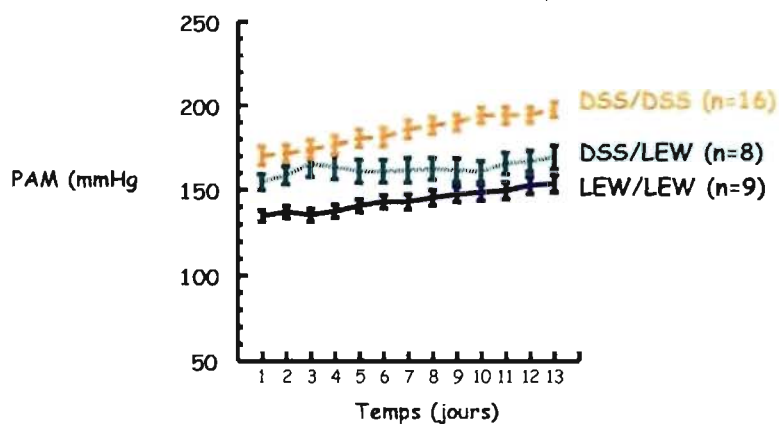


Figure 22. Graphique de la PA pour les souches hétérozygotes pour le QTL1 du chromosome 17. Chaque point sur le graphique représente une moyenne des lectures sur 24 h. L'axe des « Y » représente la PAM en millimètres de mercure (mm Hg). L'axe des « X » représente le temps en jour. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. S pour DSS et L pour LEW.

## 8.2 Chromosome 16

La région du QTL utilisée pour faire la souche hétérozygote du chromosome 16 s'étend de D16Rat112 à D16Chm66 (Figure 23). Cette région est un peu plus large que celle de C16QTL1. Les PAM de DSS/DSS, LEW/LEW et DSS/LEW sont respectivement de  $184 \pm 5$  mm Hg,  $151 \pm 6$  mm Hg et  $158 \pm 10$  mm Hg. L'allèle LEW de l'hétérozygote DSS/LEW qui contient C16QTL1 est dominant par rapport à l'allèle DSS. En effet, la PAM de C16QTL1 hétérozygote DSS/LEW se situe au même niveau que l'homozygotes LEW/LEW (Figure 24). La différence de PAM de DSS/LEW par rapport à LEW/LEW est très faible, soit de  $-7$  mm Hg.

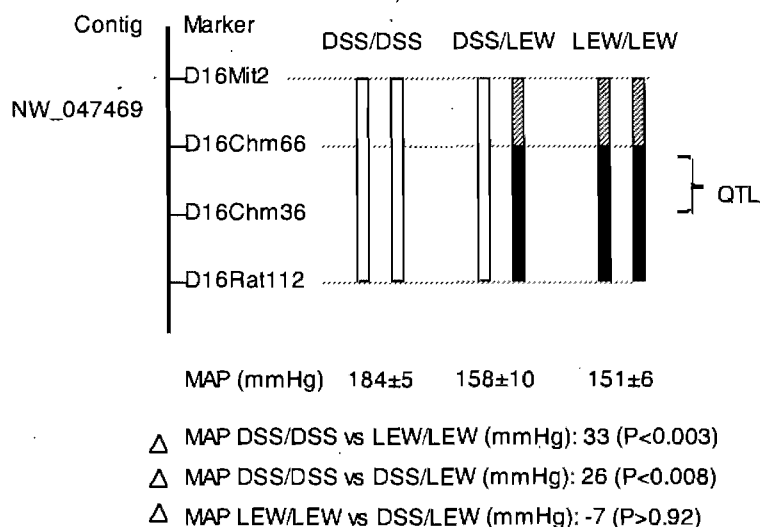


Figure 23. Carte du chromosome 16 démontrant l'aspect hétérozygote du QTL. Une bande noire représente un fragment chromosomique provenant de la souche LEW. Une bande blanche représente un fragment chromosomique provenant de la souche DSS. Une bande hachurée aux extrémités des bandes noires indique une région d'ambiguïté entre deux marqueurs. QTL pour quantitative trait loci.



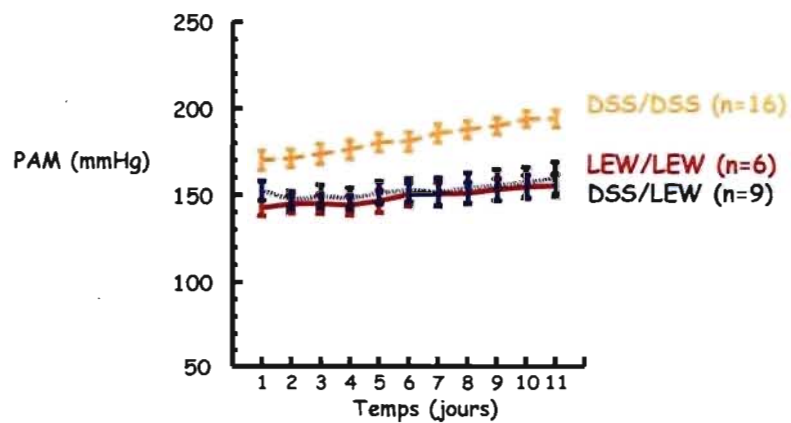


Figure 24. Graphique de la PA pour les souches hétérozygotes pour le QTL du chromosome 16. Chaque point sur le graphique représente une moyenne des lectures sur 24 h. L'axe des « Y » représente la PAM en millimètres de mercure (mm Hg). L'axe des « X » représente le temps en jour. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. S pour DSS et L pour LEW.

CHAPITRE V

# **DISCUSSION**

## 9- CRITIQUE DE LA MÉTHODE

### 9.1 Construction de congénique

#### 9.1.1 Choix du modèle animal

L'utilisation de modèle animal est une stratégie adéquate pour étudier les traits complexes comme la PA chez l'humain. Les manipulations sont faciles et contrôlées sous la gouverne du laboratoire qui effectue des croisements spécifiques dans un environnement fixe. Le modèle animal comme le rat permet entre autre de développer les marqueurs génétiques nécessaires pour la dissection du trait complexe en composantes génétiques individuelles.

#### 9.1.2 Le rat vs la souris

L'utilisation de *Rattus norvegicus* en laboratoire remonte à bien longtemps. Le chapitre 2.3.1 élabore certaines des raisons de son utilisation en tant que modèle animal.

En résumé, le rat possède des gènes similaires avec l'humain, possède un phénotype plus contrastant pour l'étude de l'hypertension que la souris et il existe plusieurs souches d'élevages de rats pour l'hypertension. De plus, sa pathophysiologie de l'hypertension, ses complications et sa réponse au traitement sont similaires avec l'humain <sup>139</sup>.

La souris, par contre, même si elle est très utilisée dans la recherche, n'est pas appropriée pour des études physiologiques complexes comme l'hypertension. Son volume sanguin est limité, sa physiologie cardiaque est différente, sa sensibilité au calcium du cœur est très faible et sa dépendance à la stimulation adrénérgique sur la fonction cardiaque systolique est faible <sup>140</sup>. De plus, les mesures de PA prises sur

la souris montre qu'elle possède une grande capacité d'adaptation dans la régulation de sa PA <sup>79</sup>.

### 9.1.3 Souches congéniques

Les souches consanguines de rat possèdent une homogénéité génétique qui permet d'exclure les effets des autres allèles de gènes directement ou indirectement reliés à l'hypertension. Comme il a été mentionné à plusieurs reprises, les deux souches de rats consanguines utilisées au laboratoire pour l'étude de l'hypertension, sont la souche hypertendue DSS et la souche normotendue LEW. Ces deux lignées étaient initialement disponibles et l'équipe de Garrett M. R. avait déjà entrepris des expériences avec ces souches pour le chromosome 17 et 16.

Les lignées congéniques construites à partir de ces souches ont permis de confirmer la présence des *QTLs* des chromosomes 17 et 16, détectés auparavant par analyse de liaison génétique. De plus, les sous-souches congéniques qui en dérivent ont permis de diminuer les régions des *QTLs* à environ 1 à 2 cM.

#### 9.1.3.1 DSS et LEW

La souche hypertendue DSS a été choisie parce qu'elle démontrait une forte sensibilité au sel. Ainsi, on peut contrôler l'hypertension à l'aide d'un facteur environnemental, tel que le sel, et étudier les *QTLs* ou gènes impliqués dans la sensibilité au sel. Les lignées GH, SHR et MHS ont donc été écartées du projet parce qu'elles ne répondent à aucun stimuli externe. La souche SBH a été croisée pour une PA qui répond à la néphrectomie, aux traitements avec l'acétate désoxycorticostérone et à 1% NaCl <sup>95</sup>. De plus, un plus grand nombre de *QTLs* a été retrouvé dans la souche DSS par rapport à d'autres souches. Quant aux autres souches, elles n'étaient pas disponibles en Amérique (comme la lignée LH) ou ne répondaient pas aux critères de sélections.

Comme il a été mentionné dans la partie 2.3.3, l'utilisation de souches normotendues autre que DSR offre l'avantage d'être génétiquement plus contrastante. L'avantage d'avoir un grand polymorphisme (de 50% entre LEW et DSS) est que la densité de marqueurs microsatellites est plus grande. La

cartographie physique est plus précise et on détecte plus de *QTLs* entre DSS et LEW que DSS et DSR. Bien que le taux de polymorphisme entre WKY et DSS est plus grand que LEW et DSS, soit de 67%, les différences de pression sanguine ne sont pas toutes de causes génétiques, le but de l'analyse génétique étant d'identifier les causes génétiques de l'hypertension <sup>113</sup>. Quant à la souche MNS, une contamination de la lignée a limité son utilisation au chromosome 2 du rat Dahl *salt-sensitive*.

#### 9.1.3.2 Arrière-plan génétique

L'arrière-plan génétique de nos souches congéniques provient du génome du rat hypertendu DSS, parce que cette souche est plus permissive à l'hypertension que la souche normotendue LEW. Les lignées congéniques avec fond génétique DSS sont donc plus informatives. La méthode peut se faire dans la direction inverse, soit un arrière-plan génétique LEW, mais la détection de *QTL* de la PA est beaucoup plus difficile. Ce sujet est élaboré davantage dans la section 11.2.1.

## 9.2 Marqueurs microsatellites

Il est vrai qu'un marqueur microsatellite se retrouve à chaque 20 kb d'ADN de rat <sup>79</sup>, ce qui fait qu'il y a une bonne densité de marqueurs. De plus, les souches DSS et LEW ont 50% de polymorphismes entre eux. Toutefois, ce ne sont pas tous les marqueurs qui sont polymorphiques. Sur les 90 marqueurs microsatellites D17Chm de ce segment du chromosome 17, 61 marqueurs microsatellites ne présentaient pas de polymorphisme entre l'échantillon DSS et LEW (résultats non montrés). Pour le chromosome 16, sur 123 marqueurs microsatellites D16Chm de ce segment, 83 marqueurs microsatellites ne présentaient pas de polymorphisme entre l'échantillon DSS et LEW (résultats non montrés). Lorsqu'un marqueur n'est pas polymorphe, la recherche de d'autres microsatellites se poursuit pour pouvoir faire la cartographie du chromosome.

L'absence de polymorphisme pour les marqueurs microsatellites est un handicap pour la cartographie. Certaines régions ne peuvent pas être diminuées davantage, comme par exemple les régions d'ambiguïté.

### 9.3 Mesure de la PA

Deux méthodes sont communément utilisées pour mesurer la PA chez le rat et la souris : *tail cuff* et télémétrie <sup>145</sup>.

La méthode du *tail cuff* a permis initialement de localiser la majorité des *QTLs* de la PA du rat Dahl *salt-sensitive*. Toutes les souches de rats hypertendus <sup>93</sup>, et même de souris hypertendues, ont été sélectionnées par la méthode du *tail cuff*. De plus, tous les *QTLs* localisés par *tail cuff* ont été confirmés par télémétrie. La technique du *tail cuff* offre des avantages, mais également des désavantages (Tableau IX) qui limitent son utilisation à du criblage initial, et non direct, de la mesure de la PA. Principalement parce que les mesures de la PAD et de la PAM ne sont pas fiables, qu'aucune mesure à long terme ne peut être envisagée, et qu'il est impossible de détecter de petits changements de la PA, cette méthode n'est pas utilisée pour faire la cartographie pointue de la région d'un *QTL* <sup>113</sup>.

La télémétrie est une méthode plus précise et directe pour la mesure de la PA et offre ce que la méthode de *tail cuff* n'est pas capable de faire. Cette technique demeure « invasive », parce qu'elle exige une insertion matérielle dans l'animal qui peut affecter les organes avoisinants. Toutefois, la télémétrie présente moins de sources d'erreurs et s'applique mieux à l'utilisation de souches congéniques <sup>110</sup>. C'est pour ces raisons que la méthode de mesure utilisée est la télémétrie.

Pour limiter les variations dues aux facteurs environnementaux et génétiques, les mesures de la PA par télémétrie sont effectuées sur différentes portées de la même souche à l'intérieur d'une même vague d'implantation. De plus, lorsqu'un *QTL* est identifié ou susceptible d'appartenir à une souche, les mesures de la PA par télémétrie sont effectuées sur plusieurs vagues d'implantations différentes. Les résultats ainsi obtenus sont regroupés pour faire une moyenne globale des valeurs de la PA.

Tableau IX. *Méthodes de mesure de la pression artérielle.*

Méthodes	Avantages	Désavantages
<b>Tail cuff</b>	Non « invasif » Non dispendieuse Rapide pour la mesure de la PAS	Stress imposé à l'animal dut à l'immobilisation physique Mesure de la PA indirecte Mesure de la PAD et de la PAM non fiable Induit une vasoconstriction Aucune mesure à long terme Augmenter la température corporelle de l'animal Ne détecte pas les changements de PA de moins de 10 mm Hg
<b>Télémetrie</b>	Précis pour la PAS, PAD et la PAM Mesure de PA directe Mesure continue, chronique et à long terme	Très dispendieux à l'achat et aux maintient de l'équipement « Invasive »

(Figure inspirée de Deng A. Y. 1998 <sup>113</sup>)

#### 9.4 Approche statistique

Pour comparer les moyennes des PAM de plus de deux souches congéniques avec les groupes témoins DSS et LEW, l'analyse de la variance (ou ANOVA) est effectuée. Cette analyse statistique nous permet de savoir s'il y a une différence significative ou non entre les populations. Un test de Student ne serait pas approprié étant donné qu'il ne compare que deux échantillons.

Le test d'ANOVA 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. Puisqu'en télémetrie, les mesures sont étendues sur plusieurs jours, l'utilisation d'une variante de l'ANOVA est plus appropriée. Il s'agit de l'ANOVA à mesure répétée. Le principe est le même, sauf qu'elle tient compte de la durée pendant laquelle les mesures sont prises.

Pour localiser les différences détectées par l'ANOVA, deux techniques de comparaisons multiples sont disponibles : Tukey et Dunnett. Le test de Tukey compare toutes les paires possibles, alors que le test de Dunnett compare chaque groupe avec le groupe témoin. Le test de Dunnett ne permet pas de comparer des lignées entre elles pour faire des études d'interaction. Le test de Tukey pourrait alors succéder au test d'ANOVA, mais à cause du nombre de comparaisons effectuées, ce test est moins puissant.

## 10- ANALYSE DES RÉSULTATS

### 10.1 QTL

Pour démontrer l'évidence de l'emplacement de ces *QTLs* sur les cartes physiques, trois critères doivent être respectés. Premièrement, les *QTLs* répondent aux critères de Lander et Kruglyak qui stipulent que les valeurs de *LOD score* pour l'analyse de liaison doivent être supérieures à 3 pour être significative et entre 2 et 3 pour être significativement suggestive. Deuxièmement, les *QTLs* obtenus suite à l'analyse de liaison génétique ont été confirmés par la construction de souches congéniques. Les lignées congéniques qui contiennent ces *QTLs* sont capables de diminuer la PA de façon significative. Troisièmement, les *QTLs* ont été confirmés par au moins deux expériences indépendantes <sup>79</sup>.

#### 10.1.1 C17QTL1

C17QTL1 de la PA du chromosome 17 avait initialement été suggéré par analyse de liaison génétique <sup>109, 134</sup>, puis confirmé par des lignées congéniques <sup>132</sup>. C17QTL1 mesurait environ 34,8 Mb.

La région du C17QTL1 du chromosome 17 est véritablement un *QTL* parce qu'il répond aux critères énumérés précédemment. Les sous-souches congéniques C17S.L2, C17S.L6, C17S.L7 et C17S.L8 démontrent clairement une différence de PA par rapport au contrôle DSS (Figure 17 et Tableau VII) et partagent la région de C17QTL1 en commun (entre D17Chm68 et D17Chm93) (Figure 15). C17S.L5 n'a pas d'effets sur la PA et ne partage pas de segment en commun avec les souches « positives ». De plus, les valeurs de PA de C17S.L2 (+), C17S.L7 (+), C17S.L8 (+) et C17S.L5 (-) ont été confirmées lors d'au moins deux vagues de portées différentes. Pour la souche C17S.L6 seule une vague de portée montre un résultat « positif ». Toutefois, il y a suffisamment de données concluantes pour affirmer que la différence de PA observés dans ces souches « positives » est directement attribuée



à la présence d'un *QTL* et non de l'influence provenant du reste du génome. Des résultats « positifs » supplémentaires de télémétrie pour les souches C17S.L6 et C17S.L11 sont envisagés, si l'on tient compte de la disposition des autres souches sur la carte physique.

Les nouveaux marqueurs microsatellites ont permis de corriger la région congénique de la souche C17S.L5 en l'agrandissant. Puisque cette souche est « négative » pour contenir un *QTL*, la région qui délimite le *QTL* devient plus petite. C17QTL1 est délimité par D17Chm93 de l'extrémité supérieure de la souche C17S.L5 « négative » et par D17Chm68 de l'extrémité inférieure d'ambiguïté de la souche C17S.L8 « positive ».

Idéalement, pour isoler un *QTL*, on soustrait la région commune des souches « positives » par les souches « négatives ». Deux souches « négatives » devraient entourer la région du *QTL*. Une nouvelle souche congénique nouvellement construite se situe en haut (résultat non montré) de la région du *QTL* et a été nommée C17S.L9. Si cette souche est dite « négative » pour contenir un *QTL*, alors C17QTL1 est véritablement restreint à cette position. Si elle est dite « positive », C17S.L9 correspondrait à un deuxième *QTL* du chromosome 17, étant donné que les régions d'ambiguïtés ne chevauchent pas ceux de C17S.L8.

Nous avons diminué la région de C17QTL1, qui mesurait initialement environ 34,8 Mb, à une grandeur approximative de 1,60 Mb (Figure 15). Puisque 1 cM équivaut à approximativement 1 Mb, la grandeur de C17QTL1 est plus petite que 2 cM. Des expériences de clonage positionnel peuvent être envisagées pour identifier le *QTL* ou le gène du chromosome 17 et pour déterminer son rôle dans la PA.

### 10.1.2 C16QTL1

C16QTL1 de la PA du chromosome 16 a aussi été trouvé initialement par analyse de liaison génétique<sup>109, 137</sup>, puis confirmé par des lignées congéniques<sup>138, 139</sup>. C16QTL1 mesurait environ 2,16 Mb et mesure aujourd'hui 2,19 Mb.

Tout comme pour le chromosome 17, C16QTL1 est délimité par l'effet de la PA qu'a chaque sous-souche congénique. La soustraction du segment commun des souches

« positives », C16S.L1, C16S.L5, C16S.L6 et C16S.L7, par les souches « négatives », C16S.L3 et C16S.L4, (Figure 18 et Tableau VIII), isole la région de C16QTL1. De plus, les valeurs de PA de C16S.L1 (+), C16S.L5 (+), C16S.L6 (+), C16S.L3 (-) et C16S.L4 (-) ont été confirmées lors d'au moins deux vagues de portées différentes. Même si la souche C16S.L7 n'a qu'une seule vague de portée « positive », nous pouvons conclure que la différence de PA observée dans ces souches « positives » est directement attribuée à la présence d'un *QTL* et non de l'influence provenant du reste du génome. Tel qu'il est montré sur la figure 16, deux nouvelles souches A et B non identifiées chevauchent la région du *QTL*. Si A est « positive », la région du *QTL* diminuera entre D16Chm48 et D16Chm66. Si B est « positive », la région du *QTL* se situera dans la région d'ambiguïté partagée entre C16S.L4 et B, soit de D16Chm36 et D16Chm70. Si A est « négative », et B « positive », la région du *QTL* diminuera entre D16Chm36 et D16Chm48.

Depuis la dernière publication <sup>139</sup> faite sur le chromosome 16 du rat Dahl, la région du *QTL* n'a pas diminué contrairement C17QTL1. Ceci s'explique entre autre par une mauvaise cartographie du chromosome 16. La souche C16S.L4 (-) s'étendait initialement de D16Chm42 (2 417 551 pb sur NW\_047496) à D16Rat112, mais des résultats de PCR sur agarose ont démontré que le marqueur D16Chm42 n'est pas polymorphique. De plus, des PCR sur polyacrylamide et agarose ont diminué C16S.L4 de D16Chm70 (1 776 170 pb sur NW\_047496) à D16Rat112. Nous n'avons donc pas diminué C16QTL1.

## 10.2 Carte d'homologie

### 10.2.1 C17QTL1

La région de C17QTL1 mesurant 1,6 Mb contient six gènes dont trois sont connus (Figure 19). Parmi ces trois gènes candidats, *Chrm3* est un candidat qui peut jouer un rôle intéressant dans la détermination de la pression sanguine. *Chrm3* est un gène qui code pour un récepteur cholinergique muscarinique 3, couplé à la protéine G, et qui induit la contraction de la majorité des muscles lisses <sup>141, 1142</sup>. C'est

au niveau des artères et des artérioles que la résistance périphérique est la plus importante, à cause de la présence d'une couche épaisse de muscle lisse.

*Chrm3* a également été retrouvé dans un *QTL* lié au poids du ventricule droit sur le chromosome 17 de la souche de rat Wistar-Kyoto <sup>111</sup>. Les résultats de cette étude ont démontrés que ce *QTL* induit l'hypertension pulmonaire et une hypertrophie du ventricule droit suite à l'hypoxie. En effet, une hypertrophie du ventricule peut être associée à l'augmentation de la PA.

Le mécanisme par lequel *Chrm3* affecte la PA, dépend principalement de sa liaison avec l'acétylcholine, un neurotransmetteur. *Chrm3* fait partie des récepteurs muscariniques qui ont un effet excitateur lorsque couplés avec la phospholipase C. L'enzyme catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol diphosphate membranaire (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol et inositol-1-4-5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> se lie à son récepteur sur la membrane du réticulum endoplasmique, qui résulte en une libération des ions Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme de la cellule. L'augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> induit l'interaction actine-myosine, responsable de la contraction des muscles lisses des artérioles, et conséquemment de l'augmentation de la PA. Normalement, la cellule s'ajuste à cette augmentation en Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> par des mécanismes qui empêchent le relâche de l'ion, tels que la déphosphorylation de l'IP<sub>3</sub> en IP<sub>2</sub> et la phosphorylation de l'IP<sub>3</sub> en IP<sub>4</sub>, ou tout simplement par le relâchement des ions Ca<sup>2+</sup> du cytoplasme. Un défaut du gène pourrait, par exemple, induire une excitation constante de la cascade, pouvant expliquer l'augmentation de la PA chez certains individus hypertendus.

Chez les personnes qui consomment beaucoup de sel, le relâchement des ions Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> à l'extérieur de la cellule pour maintenir l'équilibre peut être compromis. En présence d'une forte concentration d'ions Na<sup>+</sup> dans la circulation, les pompes à proton Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> font entrer le sodium dans la cellule, augmentant du même coup la concentration de Na<sup>+</sup><sub>i</sub>. En même temps, le récepteur *Chrm3*, stimulé par son ligand, induit une cascade qui libère le Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. La concentration en Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, de même que celle du Na<sup>+</sup><sub>i</sub> augmente. Étant donné que la consommation en sel est grande, les pompes Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> vont faire sortir 3 ions Na<sup>+</sup> vers le milieu extracellulaire, plutôt que les ions calciques. 2 ions Ca<sup>2+</sup> entrent alors dans le cytoplasme via la pompe. En plus de la concentration d'ions

$Ca^{2+}$  stimulée par le récepteur *Chrm3*, une quantité additionnelle de  $Ca^{2+}$  s'y ajoute. L'accumulation des ions  $Ca^{2+}$  dans la cellule induirait alors la contraction des muscles lisses. Pour un individu dont la diète en sel est appropriée, la pompe  $Na^+/Ca^{2+}$  relâche les ions  $Ca^{2+}$  accumulés suite à la stimulation du récepteur. Un article, publiée par Chau W. H. et al<sup>146</sup>, sur la contraction des artères pulmonaires a effectivement démontré un lien entre les pompes à proton  $Na^+/H^+$ , qui font entrer le sodium dans la cellule, et la liaison de l'acétylcholine au récepteur *Chrm3* chez le rat SHR. En ajoutant des agonistes pouvant se lier au récepteur *Chrm3*, ils ont premièrement observé qu'il y avait bien une contraction au niveau des artères pulmonaires induisant une hypertension chez le rat. Dans un deuxième partie, les travaux de Chau W. H. et al. on montré que l'inhibition de la pompe  $Na^+/H^+$  diminue la contraction artérielle pulmonaire induite par le récepteur *Chrm3* chez le rat SHR. Ainsi, une faible concentration en sodium intracellulaire permet de libérer de  $Ca^{2+}$  de la cellule, favorisant une diminution de la PA.

Les rôles que pourraient jouer les autres gènes dans la variation de la PA sont incertains. Toutefois, ces gènes demeurent des gènes candidats de la PA, puisqu'ils sont inclus dans la région de C17QTL1.

Notre étude a également démontré que le gène *Gtpbp4* n'influence pas la PA du rat Dahl. Initialement *Gtpbp4* était inclus dans la région du *QTL*, mais une cartographie pointue de la région l'a exclu. *Gtpbp4* était un bon candidat pour la PA parce qu'il est différentiellement exprimé dans les maladies rénales<sup>147</sup>. L'association entre les maladies rénales et l'hypertension est très bien établie dans la littérature. Un changement au niveau de l'expression de ce gène pourrait influencer la fonction du rein et ainsi entraîner des variations de la PA. En effet, les reins jouent un rôle essentiel dans le contrôlent de la PA.

### 10.2.2 C16QTL1

La région de C16QTL1 mesurant 2,19 Mb contient approximativement 29 gènes dont 11 sont connus (Figure 20). Parmi ces gènes candidats, *Cmbp* est un gène candidat pouvant joué un rôle dans la PA. *Cmbp* est la protéine p110 de la cytomatrice qui joue un rôle dans la formation de synapses et dans l'exocytose  $Ca^{2+}$ -dépendant des neurotransmetteurs<sup>148, 149</sup>. Son rôle pourrait avoir lieu lors de la

formation des synapses entre une cellule neuronale et une cellule musculaire d'une artère, où des neurotransmetteurs activeraient des molécules impliquées dans la PA. Malgré cette théorie, les résultats de séquençages (résultats non montrés) entrepris par d'autres étudiants montrent la présence d'aucune mutation.

Pour ce qui est des autres gènes, leurs descriptions (Annexe A) ne suggèrent pas leurs participations dans la PA. Toutefois, ces gènes doivent être considérés comme des gènes candidats parce qu'ils sont inclus dans la région de C16QTL1. Cette liste de gènes dans la région de C16QTL1 est trop longue. Une étude poussée de cette région est pour l'instant inutile. De plus, parmi ces gènes, plusieurs sont des gènes prédits ou non identifiés (Annexe A). D'autres souches congéniques pour cette région doivent être construites pour que C16QTL1 soit plus petite que 2 cM, soit environ 2 Mb et moins, ou sinon qu'elle contienne moins d'une dizaine de gènes. À ce moment, une sélection des gènes pourra être envisagée.

### 10.2.3 Gènes candidats

Pour identifier un *QTL*, on peut choisir des candidats susceptibles d'influencer la PA. Les gènes conservés chez le rat, la souris et l'humain ont plus de chances qu'une défectuosité de ce gène puisse trouver un équivalent chez l'humain hypertendu. De plus, le lieu d'expression et la description de la fonction physiologique des gènes peuvent aussi guider le choix du candidat. Il est clair que des homologies de séquences n'assurent pas l'homologie de fonctions, et qu'une telle association doit être établie expérimentalement.

Quoiqu'il en soit, tous les gènes inclus dans la région du *QTL* sont des gènes candidats pour l'hypertension. En effet, l'hypertension est polygénique et des gènes insoupçonnés peuvent être impliqués dans le contrôle de la PA. Bien que certains gènes candidats soient connus théoriquement pour avoir des produits qui influencent la PA, bon nombre d'entre eux n'en ont pas et sont ainsi exclus en tant que gènes candidats. On retrouve par exemple les gènes de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), l'oxyde nitrique synthase (Nos2) et la kinase sérine/thréonine WNK4 (Wnk4). Ces gènes ont été exclus des régions de *QTLs* sur le chromosome 10 du rat Dahl *salt-sensitive*<sup>150</sup>. Il est donc très important de considérer tous les

gènes comme des gènes candidats. Les *QTLs* peuvent ainsi correspondre à de nouveaux gènes qui contrôlent la PA.

### 10.3 *QTLs* hétérozygotes

L'étude des fonctions d'un *QTL* s'est fait tout en maintenant le reste du génome en uniformité avec des souches hétérozygotes pour un *QTL* déjà connu.

L'allèle LEW de l'hétérozygote C17QTL1, n'est ni récessif ni dominant, parce qu'il se situe entre les deux extrêmes homozygotes DSS/DSS et LEW/LEW (Figure 22). Il y a donc une corrélation quantitative entre le nombre de copies de l'allèle LEW pour C17QTL1 et la régulation de la PA. Deux copies LEW de C17QTL1 sont nécessaires pour diminuer la PA à un niveau normotendu. Cette différence quantitative entre DSS et LEW sert de base génétique à l'action du C17QTL1. Ces variations de la PA suivent un effet de dose réponse qui dépend du nombre de copies de chaque allèle. Plus il y a de copies DSS, plus la PA augmente, ou sinon, plus il y a de copies LEW, plus la PA diminue. Des mécanismes de régulation de l'expression entre les deux allèles peuvent expliquer ces différences quantitatives chez C17QTL1.

L'allèle normotendu LEW de C16QTL1 est dominant par rapport à son homologue DSS, parce que la PAM de C16QTL1 hétérozygote DSS/LEW se situe au même niveau que l'homozygotes LEW/LEW (Figure 24). La différence de PAM de DSS/LEW par rapport à LEW/LEW étant de -7 mm Hg. Ce résultat démontre qu'une seule copie d'allèle LEW de C16QTL1 est capable de diminuer la PA à des valeurs équivalentes à celle de deux copies LEW. Les changements de la PA sont donc contrôlés par des différences qualitatives entre les deux allèles, comme des différences dans la fonction des produits du gène. Les produits de la région LEW de C16QTL1 jouent un rôle dans la diminution de la PA. Les produits de la région DSS de C16QTL1, qui devraient normalement augmenter la PA, sont absents ou défectueux ce qui expliquerait qu'ils sont récessifs. Dans ce cas, les deux allèles DSS de C16QTL1 sont nécessaires pour augmenter la PA. À l'opposé, si un allèle normotendu d'un *QTL* est récessif par rapport à son homologue DSS, comme pour le chromosome 2, ceci indique que ce *QTL* exprime des agents qui augmentent la

PA<sup>151</sup>. Pour le *QTL* du chromosome 2, deux allèles normotendus sont nécessaires pour diminuer la PA. Pour le *QTL* du chromosome 16, les différences qualitatives pour l'un ou l'autre des agents réducteurs ou amplificateurs entre DSS et LEW peuvent probablement sous-tendre les bases génétiques des rôles de C16QTL1.

Cette expérience permet d'en savoir un peu plus sur le fonctionnement des *QTLs*, toutefois, elle ne répond pas aux questions entourant les bases moléculaires des *QTLs*. Par contre, l'analyse des *QTLs* hétérozygotes ajoute un support à la nature « monogénique » des *QTLs* individuelles.

#### **10.4 *QTL* comme un trait monogénique**

Dans les études précédentes, la PA était exclusivement considéré comme un trait polygénique, dont la combinaison de plusieurs *QTLs* était nécessaire pour l'expression finale de la maladie ou du phénotypique. Ce raisonnement conclue que chaque *QTL* possède seulement des effets « mineurs » sur la PA. Contrairement à cette croyance, presque tous les *QTLs* trouvés par le laboratoire ont des effets « majeurs » sur la PA. Ainsi, un seul *QTL* est capable de suffisamment diminuer la PA (de >20 mm Hg) sans la présence additionnelle des autres *QTLs*. En d'autres mots, chaque *QTL* est capable de fonctionner comme une unité génétique indépendante des autres *QTLs* dans un contexte et un arrière-plan génétique approprié<sup>152, 153, 154</sup>.

Comme il a été fait dans cette étude, chaque région du *QTL* de la PA a été analysée séparément comme un trait monogénique pour chaque souche congénique. Nous pouvons donc conclure que la PA est un trait quantitatif contrôlé par des *QTLs* « monogéniques » individuelles, qui suivent un mode d'hérédité mendélien<sup>155</sup>. De plus, l'étude réalisée avec des congéniques hétérozygotes démontre qu'un seul allèle dominant est capable d'avoir un effet majeur sur la PA<sup>151</sup>.

Aucune étude sur les gènes majeurs n'a été réalisée chez l'humain. L'hétérogénéité génétique en est une cause, car elle dilue l'effet individuel de chaque *QTL* de la PA. La détection de *QTLs* « majeurs » est donc difficile à réaliser. De plus, même chez

les animaux consanguins où l'environnement est contrôlé, les *QTLs* isolés avec des effets « majeurs » comme C18*QTL1* (48%), ne manifeste qu'un faible effet (7,5%) lorsqu'ils sont présents avec le reste du génome LEW<sup>156</sup>.

### 10.5 Reproductibilité de l'expérience

La comparaison entre les *QTLs* localisés par des laboratoires différents est difficile pour plusieurs raisons: les différents marqueurs produits par différents laboratoires, les différentes diètes de NaCl, l'utilisation de différentes souches ayant des arrière-plans génétiques différents, l'âge à laquelle les animaux sont pris pour mesurer la PA, la méthode employée pour la mesure de la PA et plusieurs autres. Ces expériences sont difficilement reproductibles par d'autres laboratoires et les comparaisons des résultats ne sont pas évidentes<sup>79</sup>. Néanmoins, certains *QTLs* sont retrouvés sur des souches de rats hypertendus différents<sup>157</sup>.

Les *QTLs* identifiés par des analyses de liaison ou de congéniques sont souvent unique aux deux souches consanguines, dont le croisement a donné la population qui porte les *QTLs*<sup>79</sup>. Le polymorphisme signifie qu'à un locus à *QTL*, il y a une différence allélique d'ADN qui cause des différences dans l'expression ou l'activité du produit qu'encode le locus<sup>79</sup>. Donc, si une paire de souches consanguines est homozygote pour le même *QTL*, ce *QTL* n'aura pas d'effet sur le trait quantitatif dans la population dérivant de ces souches<sup>79</sup>. L'arrière-plan génétique (voir 11.2.1) des souches influence l'expression d'un *QTL*<sup>79</sup>.

Le fait que deux populations présentent des *QTLs* de la PA différents pourrait correspondre au fait qu'une des populations soit un faux positif ou un faux négatif. Toutefois, la PA est un trait quantitatif dont les défauts peuvent être spécifiques à des populations, comme dans le cas de l'hypertension monogénique. L'influence provient autant de l'environnement que de l'information dans le génome.



# 11- FACTEURS GÉNÉTIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX

## 11.1 Facteurs environnementaux

Comme il a été mentionné à plusieurs reprises, l'hypertension essentielle est multifactorielle. Des composantes environnementales, comme le sexe, l'âge et la diète de l'animal influencent l'expérience et les résultats de la PA. Pour maintenir une constante dans les résultats et s'assurer que les variations de la PA sont influencées par des gènes candidats, l'environnement des rats est des plus contrôlé.

### 11.1.1 Sexe de l'animal

Certaines données prétendent que les *QTLs* de la PA identifié chez le rat Dahl peuvent dépendre du sexe de l'animal <sup>158</sup>. Toutefois, la plupart des études sur la PA du rat sont effectuées sur des rats mâles. En effet, les mâles développent l'hypertension plus rapidement que les femelles. Les résultats sont ainsi obtenus dans une période de temps plus court que ceux obtenus par les femelles. De plus, l'oestrogène féminin est connue pour interférer avec la PA, alors que chez les mâles aucune hormone sexuelle n'est connue pour influencer la PA. Par leur physique plus large, les mâles sont plus faciles à manipuler lors de la chirurgie d'implantation des sondes télémétries.

La plupart des études qui analysent les *QTLs* de la PA liés aux sexes, étudient chaque sexe indépendamment de l'autre. Des expériences d'analyse de liaison effectuées sur des rats Sabra par le groupe de Yagil et *al.* <sup>135</sup> rapporte qu'un des deux *QTLs* qu'ils ont identifiés sur le chromosome 1 était présent chez les femelles rates alors que l'autre était présent chez les deux sexes. De plus, cette même étude a identifié un *QTL* du chromosome 17 présents que chez les femelles rates Sabra <sup>135</sup>. Toutefois, la région que couvre ce *QTL* se situe autour de C17QTL1, qui a été identifié chez le rat mâle Dahl. L'architecture génomique de chaque souche peut

expliquer cette spécificité de *QTL* au sexe. Les résultats réalisés par ce groupe doivent être confirmés par la construction de souches congéniques.

Quoiqu'il en soit, des méthodes expérimentales pour l'analyse de *QTLs* propre aux sexes de l'individu doivent être élaborées pour l'hypertension. Des *QTLs* communs aux mâles et aux femelles existent et la présence de *QTLs* spécifiques au sexe crée un besoin pour des études spécifiques avec des femelles et pour des interventions spécifiques aux femmes chez l'humain.

### **11.1.2 Âge de l'animal**

L'analyse de la PA se fait sur des animaux adultes, car la PA augmente avec l'âge et le développement. Le phénotype est alors exprimé à son maximum. D'un autre côté, certaines études démontrent que des composantes impliquées dans le développement pourrait jouer un rôle sur la PA et serait observable que durant la croissance et le développement de l'individu <sup>159, 160</sup>. Et que la principale évidence que l'hypertension est liée à l'âge, est que la PA augmente avec l'âge <sup>159</sup>.

Des recherches spécifiques sur le développement de l'hypertension selon l'âge constitueraient un projet de recherche en soit.

### **11.1.3 Diète de l'animal**

La prise de sel est imposée à travers la nourriture. Les rats développent ainsi une hypertension exagérée. L'influence de la diète sur l'animal peut varier à plusieurs niveaux, par exemple, certains rats peuvent manger plus que d'autres, ce qui influencerait la PA. Toutefois, les rats soumis à la télémétrie ont tous un intervalle de poids déterminer ce qui suggère qu'ils consomment la même quantité de nourriture. Une étude a démontré chez le rat génétiquement hypertendu SHR, qu'il existait un lien entre l'hypertension et le contrôle du poids <sup>160</sup>, ou plus précisément un lien entre l'hypertension et la diète.

## 11.2 Facteurs génétiques

Pour optimiser la recherche de gènes candidats pouvant participer au contrôle de la PA, les facteurs génétiques des individus doivent être pris en compte. De plus, plusieurs mécanismes génétiques peuvent influencer les résultats de la PA, et introduire des faux positifs et des faux négatifs. Il est donc très important de connaître ces facteurs génétiques et de savoir comment faire pour les éliminer de nos résultats.

### 11.2.1 Arrière-plan génétique DSS et LEW

L'arrière-plan génétique de nos souches congéniques provient du génome du rat hypertendu DSS, parce que cette souche est plus permissive à l'hypertension que la souche normotendue LEW. Les lignées congéniques avec fond génétique DSS sont donc plus informatives. La méthode peut se faire dans la direction inverse, soit avec un arrière-plan génétique LEW, mais la détection de *QTL* de la PA est beaucoup plus difficile.

Il est vrai que les rats DSS et LEW semblent avoir les mêmes allèles de *QTL* sur plusieurs chromosomes, parce que plusieurs marqueurs dans ces régions ne coségrègent pas lors du croisement des deux lignées<sup>134</sup>. Toutefois, la lignée LEW a toujours une PA plus basse que DSS, parce qu'elle possède beaucoup d'allèles qui diminuent la PA. En effet, plusieurs *QTLs* de la PA contrôlent collectivement l'ensemble de la pression sanguine. L'effet d'un allèle qui augmente la PA pour un *QTL* donné chez le rat LEW peut être compensé par les effets des allèles qui diminuent la PA des autres *QTLs*. Ainsi, malgré la présence de *QTLs* qui augmentent la PA, l'arrière-plan génétique normotendu LEW peut maintenir la valeur de sa PA basse.

Un arrière-plan normotendu n'est donc pas suffisant pour générer l'hypertension. Des expériences de ce genre ont été réalisées au laboratoire sur le chromosome 18 du rat Dahl. La souche C18S.L1 avec fond génétique hypertendu démontrait une diminution de la PA en télémétrie, par contre, la souche C18L.S1 avec fond génétique normotendu ne montrait aucune différence de pression<sup>162, 163</sup>.

La présence d'une région chromosomique du rat hypertendu, même si elle contient véritablement un *QTL*, sera difficile à détecter à cause de l'énorme effet qu'imposent les allèles de la souche normotendue. Il n'y aura pas de variations dans les valeurs de PA parce qu'elle sera masquée par la présence de systèmes tampons provenant du génome normotendu, qui empêchent les variations.

De plus, il est possible que des gènes de résistance soient impliqués. L'hypertension se développe en absence de ces gènes seulement; la présence de ces gènes réprimerait le phénotype. Dans un croisement avec un arrière-plan génétique normotendu LEW, la section hypertendue DSS qui contient un *QTL* de l'hypertension est masquée par les gènes de résistance très présent dans le génome normotendu. Les *QTLs* distribués dans le génome hypertendu DSS sont donc nécessaires mais individuellement non suffisants à une augmentation de la pression artérielle.

### 11.2.2 Effet de position

La fonction d'un gène ne dépend pas uniquement de ses propres propriétés intrinsèques. Il y a aussi des événements génétiques non contrôlés, comme d'autres gènes, des bouts de séquences d'ADN ou d'ARN, qui joue un rôle d'activation ou de répression. Ces séquences peuvent se retrouver près de notre gène suite à des réarrangements chromosomiques survenus durant la méiose, et à l'occasion lors de la mitose. Parmi les réarrangements chromosomiques, on retrouve la duplication, la délétion, la transposition, la translocation, l'inversion de gènes et l'évènement de recombinaisons inégales.

Le gène *Bar* de la drosophile est un exemple classique d'effet de position. Une mutation dans *Bar* est causée par une duplication du segment du chromosome qui contient le gène. Plus le gène est dupliqué, et plus le degré du défaut augmente. Dans ce cas, les yeux sont plus petits. Il ne s'agit donc pas d'une mutation dans le gène, mais d'un défaut de recombinaison et plus précisément de la juxtaposition accidentelle d'élément amplificateur <sup>164</sup>.

Ce phénomène peut se retrouver dans l'arrière-plan génétique de nos lignées congéniques. De plus, puisque ces effets de position sont généralement

indétectables et se confondent avec l'arrière-plan génétique, il est difficile de différencier les effets de la PA dues à des régions chromosomiques substituées ou à l'arrière-plan génétique. L'interprétation des résultats des effets de la PA d'une souche congénique peut alors devenir erronée. La stratégie pour évaluer si un effet de position est responsable d'une variation dans la PA d'une lignée congénique positive, est de construire une lignée congénique contrôle possédant un fragment chromosomique substitué juste à côté, mais sans chevaucher celui de la souche précédente <sup>113</sup>. Ce type de phénomène justifie pourquoi il est important de répéter l'expérience plusieurs fois.

### **11.3 Hypertension multifactorielle**

#### **11.3.1 Interaction gène-environnement**

L'environnement agit de manière additive et en combinaison avec l'arrière-plan génétique de l'individu <sup>113, 33, 43</sup>. Par exemple, des individus avec la même prédisposition génétique à la PA, dépendante de la sensibilité au sel, auront des valeurs de PA différentes selon que leur diète en sel est riche ou pauvre.

Sur une période de temps prolongée, les composantes génétiques deviennent dépendantes de l'environnement. L'accumulation d'expérience environnementale change ainsi le stade fonctionnel des gènes. L'influence de l'environnement peut aussi coïncider avec un moment spécifique dans la vie d'un individu. L'environnement influence le phénotype à travers la stimulation ou l'atténuation de l'expression des gènes ou via l'interaction avec des produits de gènes. Par exemple, une diète riche en sel altère l'expression de la rénine, ce qui conduit à une augmentation de l'excrétion du sodium <sup>43</sup>.

Les conditions environnementales de nos souches de rat DSS et LEW sont bien contrôlées. Les paramètres (comme la diète, les manipulations) sont les mêmes depuis le tout début des études. La souche DSS est nourrit par une diète riche en sel, alors que la souche LEW est nourrit avec une diète faible en sel.

### 11.3.2 Interaction gène-gène

En générale, lorsque vient le temps d'analyser des *QTLs*, on assume qu'ils interagissent entre eux par un effet additif. Par exemple, C2QTL2 et C2QTL3 agissent ensemble de façon additive<sup>156</sup>. Toutefois, il a été rapporté que la majorité des traits quantitatifs interagissaient ensemble par épistasie<sup>165</sup>.

Un gène est dit épistatique envers un autre gène quand il masque ou empêche l'expression phénotypique de ce gène. Certains *QTLs* interagissent de façon épistatique pour produire des effets combinés de la PA. Un allèle ayant un *QTL* qui diminue la PA peut compenser l'allèle ayant un *QTL* qui augmente la PA. La plupart des *QTLs* de la PA d'un système d'épistasie sont organisés en modules épistatiques qui fonctionnent en hiérarchie et qui participent à des voies ou cascades complexes. Ils peuvent être regroupé en trois groupes : les éléments régulateurs clefs, les différents niveaux d'organisation et les voies de cascades biochimiques commun régissant la PA.

L'épistasie peut être étudiés grâce à la comparaison de la PA entre des souches doubles ou multi-congéniques, qui regroupent plusieurs *QTLs*. Ces informations sont très utiles pour comprendre la manière dont la PA est régulée dans un système complet. La combinaison de plusieurs *QTLs* à travers le génome dans une même lignée congénique pourrait faire varier la pression artérielle. Les interactions épistatiques ont déjà été utilisées pour détecter des *QTLs* inconnus, basé sur l'interaction entre les *QTLs* connus et des locus inconnu<sup>165</sup>.

Le premier phénomène découvert fut avec la forte interaction épistatique qui lie les chromosomes 2 et 10 du rat Dahl *salt-sensitive*<sup>166</sup>. Depuis, environ quatorze *QTLs* sont impliqués dans une dizaine d'interactions épistatiques chez ce rat<sup>126, 155, 163, 167-170</sup>. Toutefois, aucune étude effectuée à ce jour n'a démontré que les *QTLs* des chromosomes 17 et 16 interagissaient avec d'autres de manière épistatique. Étant donné que l'hypertension est une maladie complexe et polygénique, des interactions épistatiques incluant les *QTLs* des chromosomes 17 et 16 doivent nécessairement exister.

De plus, il existe d'autres types d'interaction gène-gène à ne pas négliger dans la PA. La complémentation de gènes survient lorsque les allèles de différents gènes se modifient entre eux pour produire un phénotype final. La suppression de gène peut éliminer ou obstruer l'expression d'un allèle spécifique d'un autre gène.

## 12- DE L'ANIMAL À L'HUMAIN

Beaucoup de progrès ont été observé dans la cartographie de *QTLs* polygéniques de la pression sanguine chez l'humain, toutefois, l'identification de *QTLs* de la PA chez l'humain demeure un déficit. L'utilisation de modèles expérimentaux comme les animaux consanguins hypertendus est devenu une façon complémentaire, et en quelque sorte une extension, et une alternative à l'étude directe de la génétique de l'hypertension chez l'humain. On s'attend à ce que certains mécanismes et pathogénèses révélés par les études d'animaux modèles soient applicables aux études humaines.

L'utilisation de modèle animal a permis de comprendre trois facettes de l'hypertension humaine et contribue ainsi à l'avancement de la recherche. Premièrement, nous savons que certains gènes et *QTLs* ont été conservés au cours de l'évolution. Les *QTLs* découverts chez le rat peuvent alors être utilisés pour identifier des *QTLs* de la PA homologue chez l'humain. Les produits des gènes qui participent physiologiquement au processus de régulation de la pression sanguine pourraient être similaires chez le rat et l'humain. Deuxièmement, des régions du chromosome qui contiennent un *QTL* de la PA chez le rat peuvent être utilisées pour examiner des gènes candidats localisés dans des régions qui se partagent une conservation en synténie avec l'humain (c'est-à-dire une conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces). Un exemple de conservation en synténie a été noté pour le chromosome 10 du rat Dahl salt-sensitive et le chromosome 17 de l'humain<sup>161</sup>. Troisièmement, il a été démontré que la coségrégation d'allèles pour un locus de la pression sanguine pouvait être un phénomène dépendant de la population de rat ou d'humain. Les allèles ECA coségrègent avec la PA dans une population F<sub>2</sub> (DSS x MNS) mais pas dans la population F<sub>2</sub> (DSS x WKY)<sup>172</sup>. Le même phénomène a été observé pour le locus ECA associé à l'HTAe chez l'humain<sup>173</sup>, mais pas dans toutes les populations étudiées<sup>174</sup>.



Les études utilisant des animaux consanguins a permit de localiser des *QTLs* pour la PA, qui ont un lien ou non avec l'HTAe chez l'humain. Jusqu'à maintenant, parmi les 36 régions identifiées pour l'HTAe dans le génome humain, 30 régions ont un homologue avec des régions du *QTL* de la PA du génome du rat<sup>86, 175</sup>. Toutefois, les mutations qui participent à l'hypertension chez le rat ne seront pas toutes impliquées dans les populations humaines hypertendues. Quoiqu'il en soit, les modèles animaux comme le rat, avec leur arrière-plan génétique bien définit et modifiable, contribuent à nous éclairer davantage sur les gènes candidats responsables de l'hypertension.

CHAPITRE VI

# CONCLUSIONS

La présence de C17QTL1 a une fois de plus été confirmée à l'aide de la construction de souches congéniques. Nous avons réduit la région du *QTL*, initialement de 34,8 Mb à 1,60 Mb. La région de C17QTL1 contient six gènes, donc *Chrm3*, un récepteur cholinergique muscarinique 3, couplé à la protéine G, qui induit la contraction de la majorité des muscles lisses. Ce gène possède les caractéristiques d'un gène impliqué dans la régulation de la PA. Nous avons également démontré que *Gtpbp4*, différenciellement exprimé dans les reins, est exclue de la région du *QTL*.

Nous n'avons pas réussi à diminuer la région de C16QTL1 à moins de 2 cM ou 2 Mb. Toutefois, nous avons apporté des corrections au niveau de la cartographie de la région de C16QTL1. Par exemple, le marqueur D16Chm42 n'est pas polymorphique. La région de C16QTL1 qui mesurait avant 2,16 Mb, mesure maintenant 2,19 Mb. Étant donné que cette région du *QTL* contient trop de gènes, soit approximativement 29 gènes dont 11 sont connus, une étude approfondie des gènes n'est pas appropriée. Il faut réduire C16QTL1 davantage à l'aide de sous-souches congéniques.

L'étude des allèles hétérozygotes nous a démontré que les variations de la PA de C17QTL1 suivent un effet de dose réponse qui dépend du nombre de copies d'allèles. Pour C16QTL1, les changements de la PA sont contrôlés par des différences qualitatives entre les deux allèles. Les produits de la région LEW de C16QTL1 jouent en rôle dans la diminution de la PA et les produits de la région DSS de C16QTL1, qui devrait normalement augmenter la PA, sont absents ou défectueux ce qui expliquerait qu'ils sont récessifs.

De plus, nous avons démontré que les *QTLs* peuvent avoir des effets « majeurs » sur la PA et que la PA est un trait quantitatif contrôlé par des *QTLs* « monogéniques » individuelles. L'étude réalisée avec des congéniques hétérozygotes démontre aussi qu'un seul allèle dominant est capable d'avoir un effet majeur sur la PA.

L'identification d'un *QTL* pour la PA chez le rat permet de mieux comprendre l'hypertension chez l'humain. Le regroupement des *QTLs* dépendamment de leur rôle dans les cascades ou les patrons épistatiques va élucider le mécanisme

physiologique qui contrôle la PA. Cette compréhension nous éclaire davantage sur l'architecture génétique, les interactions *QTL-QTL* et les modulations du génome dans l'HTAe. De plus, la découverte de ces *QTLs* facilite notre compréhension sur certain aspect de la recherche génétique dans l'HTAe, comme la spécificité de la population à la maladie. Une extrapolation du savoir du rat vers l'humain nous permettrait ainsi de développer de nouveaux outils de diagnostics génétiques, de nouvelles cibles thérapeutiques et potentiellement l'utilisation d'approches pharmacogénétiques pour l'hypertension.

CHAPITRE VII

**ANNEXE**

## ANNEXE A

Tableau A. Gènes candidats de la région C16QTL1

RAT	SOURIS	HUMAIN	Nom au complet
CHR16	CHR14	CHR 3, 4, 10	
Rai17_predicted	Zmiz1	ZMIZ1	<i>retinoic acid induced 17 (predicted)</i> <i>Bottom of Form</i>
Ppif	Ppif	PPIF	<i>peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)</i> <i>similar to hypothetical protein FLJ90798 (predicted)</i>
RGD1306164_predicted	-	C10orf56	<i>similar to H3 histone, family 3B</i>
LOC679736	-	-	<i>similar to LSM5 homolog, U6 small nuclear RNA associated</i>
LOC679753	-	-	<i>similar to RS21-C6 protein (predicted)</i>
RGD1565017_predicted	-	-	<i>annexin A11</i>
Anxa11	Anxa11	ANXA11	<i>placenta-specific 9 (predicted)</i>
Plac9_predicted	Plac9	PLAC9	<i>similar to DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 449, expressed</i>
RGD1305689	(DNA fragment) D14Ert449e	C10orf57	<i>similar to RIKEN cDNA C330003B14 (predicted)</i>
RGD1565219_predicted	-	-	<i>similar to double homeobox protein (predicted)</i>
RGD1311053_predicted	-	DUX4	<i>hypothetical protein LOC679896</i>
LOC679896	-	-	<i>sarcolemma associated protein (predicted)</i>
Slmap_predicted	Slmap	SLMAP	<i>hypothetical protein LOC679964</i>
LOC679964	-	-	<i>similar to RIKEN cDNA A630054L15; hypothetical protein MGC38041 (predicted)</i>
RGD1306064_predicted	-	FAM116A	<i>ADP-ribosylation factor 4</i>
Arf4	Arf4	ARF4	<i>similar to CG31759-PA</i>
RGD1310975	2'-PDE	2'-PDE	<i>BM259 protein</i>
Bm259	-	-	<i>similar to heat shock protein 8</i>
LOC679778	-	-	<i>similar to ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 14</i>
LOC680076	-	-	<i>similar to Nuclear protein SkiP (Ski-interacting protein) (SNW1 protein) (Nuclear receptor coactivator NCoA-62)</i>
LOC680087	-	-	<i>homeo box gene expressed in ES cells (predicted)</i>
RGD1563858_predicted	Hexx1	HESX1	

RGD1565237_predicted	Il17rd	IL17RD	<i>similar to transmembrane protein (predicted)</i>
Arhgef3_predicted	Arhgef3	ARHGEF3	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 (predicted)</i>
LOC680155	-	-	<i>hypothetical protein LOC680155</i>
LOC680168	-	-	<i>similar to retinoblastoma-associated protein 140</i>
RGD1560873_predicted	-	-	<i>similar to RIKEN cDNA E230015L20 gene (predicted)</i>
LOC680221	-	-	<i>similar to 60S ribosomal protein L21</i>
Cmbp	Erc2	ERC2	<i>cytomatrix protein p110</i>

---

Légende : un « - » veut dire qu'il n'y a pas d'homologie.

CHAPITRE VIII

# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

1. Campbell N. A., *Circulation et échanges gazeux*. In Mathieu R. (ed.), Biologie, 3<sup>e</sup> ed, St-Laurent, ERPI: Édition du nouveau pédagogique Inc, pp. 818-849, 1995.
2. Sherwood L., *Vaisseaux sanguins et pression artérielle*. In Lockhart A. (ed.), Physiologie humaine, 2<sup>e</sup> ed, Paris, De Boeck Université, pp. 238-275, 2000.
3. Greenspan F. S., Gardner D. G., *Basic & Clinical Endocrinology*, 6<sup>e</sup> ed, USA, A Division of The McGraw-Hill Companies, pp. 389-398, 2001.
4. Fournier A., *Hypertension artérielle*. Paris, Hermann : éditeurs des sciences et des arts, pp. 3-573, 1992.
5. Basso N., Terragno N. A., *History about the discovery of the renin-angiotensin system*. Hypertension, 38:1246-9, 2001.
6. Oudart N., *The renin-angiotensin system: current data*. Ann Pharm Fr, 63:144-53, 2005.
7. de Gasparo M., Catt K. J., Inagami T., Wright J. W., Unger T., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 52:415-72, 2000.
8. Nicholls M. G., Richards A. M., Yandle T. G., *The renin-angiotensin system*. In Mancia G., Chalmers J., Julius S., Saruta T., Weber M., Ferrari A., Wilkinson I. (eds.), Manual of hypertension, Londres, Harcourt Publishers Limited, pp. 77-96, 2002.
9. Madeddu P., Vio C. P., Straino S., Salis M. B., Milia A. F., Emanuelli C. *Renal phenotype of low kallikrein rats*. Kidney Int, 59:2233-42, 2001.

10. Krzesinski J. M., Cohen E.P., *Hypertension and the kidney*. Acta Clin Belg, 62:5-14, 2007.
11. Patschan O., Kuttler B., Heemann U., Uber A., Rettig R., *Kidneys from normotensive donors lower blood pressure in young transplanted spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol, 273:R175-80, 1997.
12. Guidi E., Menghetti D., Milani S., Montagnino G., Palazzi P., Bianchi G., *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, 7:1131-8, 1996.
13. Kearney P. M., Whelton M., Reynolds K., Muntner P., Whelton P. K., He J., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*. Lancet, 365:217-23, 2005.
14. Kearney P. M., Whelton M., Reynolds K., Whelton P. K., He J., *Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review*. J Hypertens, 22:11-9, 2004.
15. Vasan R. S., Beiser A., Seshadri S., Larson M. G., Kannel W. B., D'Agostino R. B., Levy D., *Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study*. JAMA, 287:1003-10, 2002.
16. Burt V. L., Whelton P., Roccella E. J., Brown C., Cutler J. A., Higgins M., Horan M. J., Labarthe D., *Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991*. Hypertension, 25:305-13, 1995.
17. Smulyan H., Asmar R. G., Rudnicki A., London G. M., Safar M. E., *Comparative effects of aging in men and women on the properties of the arterial tree*. J Am Coll Cardiol, 37:1374-80, 2001.

18. Staessen J. A., van der Heijden-Spek J. J., Safar M. E., Den Hond E., Gasowski J., Fagard R. H., Wang J. G., Boudier H. A., Van Bortel L. M., *Menopause and the characteristics of the large arteries in a population study.* J Hum Hypertens, 15:511-8, 2001.
19. Safar M. E., Smulyan H., *Hypertension in women.* Am J Hypertens, 17:82-7, 2004.
20. Williams S. S., *Advances in genetic hypertension.* Curr Opin Pediatr, 19:192-8, 2007.
21. Lifton R. P., Dluhy R. G., Powers M., Rich G. M., Cook S., Ulick S., Lalouel J. M., *A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension.* Nature, 355:262-5, 1992.
22. Pascoe L., Curnow K. M., Slutsker L., Connell J. M., Speiser P. W., New M. I., White P. C., *Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 89:8327-31, 1992.
23. Botero-Velez M., Curtis J. J., Warnock D. G., *Brief report : Liddle's syndrome revisited. A disorder of sodium reabsorption in the distal tubule.* N Engl J M, 330:178-181, 1994.
24. Furuhashi M., Kitamura K., Adachi M., Miyoshi T., Wakida N., Ura N., Shikano Y., Shinshi Y., Sakamoto K., Hayashi M., Satoh N., Nishitani T., Tomita K., Shimamoto K., *Liddle's syndrome caused by a novel mutation in the proline-rich PY motif of the epithelial sodium channel beta-subunit.* J Clin Endocrinol Metab, 90:340-4, 2005.
25. Shimkets R. A., Warnock D. G., Bositis C. M., Nelson-Williams C., Hansson J. H., Schambelan M., Gill J. R. Jr, Ulick S., Milora R. V., Findling J. W. et al. *Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel.* Cell, 79:407-14, 1994.

26. Hansson J. H., Nelson-Williams C., Suzuki H., Schild L., Shimkets R., Lu Y., Canessa C., Iwasaki T., Rossier B., Lifton R. P., *Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome*. Nat Genet, 11:76-82, 1995.
27. Morineau G., Sulmont V., Salomon R., Fiquet-Kempf B., Jeunemaitre X., Nicod J., Ferrari P., *Apparent mineralocorticoid excess: report of six new cases and extensive personal experience*. J Am Soc Nephrol, 17:3176-84, 2006.
28. Mune T., Rogerson F. M., Nikkila H., Agarwal A. K., White P. C., *Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. Nat Genet. 10:394-9, 1995.
29. Rafestin-Oblin M. E., Souque A., Bocchi B., Pinon G., Fagart J., Vandewalle A., *The severe form of hypertension caused by the activating S810L mutation in the mineralocorticoid receptor is cortisone related*. Endocrinology, 144:528-33, 2003.
30. Wilson F. H., Kahle K. T., Sabath E., Lalioti M. D., Rapson A. K., Hoover R. S., Hebert S. C., Gamba G., Lifton R. P., *Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100:680-4, 2003.
31. Lander E., Kruglyak L., *Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results*. Nat Genet. 11:241-7, 1995.
32. Lifton R.P., *Molecular genetics of human blood pressure variation*. Science, 272:676-80, 1996.
33. Hamet P., Pausova Z., Adarichev V., Adaricheva K., Tremblay J., *Hypertension: genes and environment*. J Hypertens, 16:397-418, 1998.
34. Connell J. M., Kenyon C. J., Ingram M., Holloway C., Jamieson A., Panarelli M., Inglis G., Fraser R., *Corticosteroids in essential hypertension: multiple*

- candidate loci and phenotypic variation. Clin Exp Pharmacol Physiol, 23:369-74, 1996.*
35. Watson B. Jr, Bergman S. M., Myracle A., Callen D. F., Acton R. T., Warnock D. G., *Genetic association of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2) flanking microsatellites with essential hypertension in blacks. Hypertension, 28:478-82, 1996.*
  36. Preston R. A., Epstein M., *Renal parenchymal hypertension. In* Mancina G., Chalmers J., Julius S., Saruta T., Weber M., Ferrari A., Wilkinson I. (eds.), *Manual of hypertension*, Londres, Harcourt Publishers Limited, pp. 77-96, 2002.
  37. Weinberger M. H., *Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? Curr Opin Nephrol Hypertens, 5:205-8, 1996.*
  38. Fossali E., Ruzza M. L., Codega C., Di Francesco C., Iurato M., Migliaccio M. C., Monti M. C., Sanarico M., Sereni F., *Familial aggregation of blood pressure in a paediatric population, Acta Paediatr Scand, 79:1213-8, 1990.*
  39. Williams R. R., Hunt S. C., Hasstedt S. J., Hopkins P. N., Wu L. L., Berry T. D., Stults B. M., Barlow G. K., Schumacher M. C., Lifton R. P. et al. *Are there interactions and relations between genetic and environmental factors predisposing to high blood pressure? Hypertension, 18:129-37, 1991.*
  40. Kearney P. M., Whelton M., Reynolds K., Muntner P., Whelton P.K., He J., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet, 365:217-23, 2005.*
  41. Kearney P. M., Whelton M., Reynolds K., Whelton P. K., He J., *Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. J Hypertens, 22:11-9, 2004.*

42. Ezzati M., Lopez A. D., Rodgers A., Vander Hoorn S., Murray C. J., Comparative Risk Assessment Collaborating Group., *Selected major risk factors and global and regional burden of disease*. Lancet, 360:1347-60, 2002.
43. Hamet P., *Environmentally-regulated genes of hypertension*. Clin Exp Hypertens, 18:267-78, 1996.
44. Dyer A. R., Elliott P., *The INTERSALT study: relations of body mass index to blood pressure*. INTERSALT Co-operative Research Group, J Hum Hypertens, 3:299-308, 1989.
45. Whyte H. M., *Blood pressure and obesity*. Circulation, 19:511-6, 1959.
46. Hamidi A., Fakhrzadeh H., Moayyeri A., Pourebrahim R., Heshmat R., Noori M., Rezaeikhah Y., Larijani B., *Obesity and associated cardiovascular risk factors in Iranian children: a cross-sectional study*. Pediatr Int, 48:566-71, 2006.
47. Kanai H., Matsuzawa Y., Kotani K., Keno Y., Kobatake T., Nagai Y., Fujioka S., Tokunaga K., Tarui S., *Close correlation of intra-abdominal fat accumulation to hypertension in obese women*. Hypertension, 16:484-90, 1990.
48. Cox K. L., Puddey I. B., Morton A. R., Burke V., Beilin L. J., McAleer M., *Exercise and weight control in sedentary overweight men: effects on clinic and ambulatory blood pressure*. J Hypertens, 14:779-90, 1996.
49. Rehm J., Room R., Monteiro M. et al. *Alcohol as a risk factor for global burden of disease*. Eur Addict Res, 9:157-64, 2003.
50. Corrao G., Bagnardi V., Zambon A., Arico S., *Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: A meta-analysis*. Addiction, 94: 1551-73, 1999.
51. Puddey I. B., Beilin L. J., *Alcohol is bad for blood pressure*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 33:847-52, 2006.

52. Beilin L. J., Puddey I. B., Burke V., *Lifestyle and hypertension*. Am J Hypertens, 12:934-45, 1999.
53. Beilin L. J., *Stress, coping, lifestyle and hypertension: a paradigm for research, prevention and non-pharmacological management of hypertension*. Clin Exp Hypertens, 19:739-52, 1997.
54. Lindquist T. L., Beilin L. J., Knuiman M. W., *Influence of lifestyle, coping, and job stress on blood pressure in men and women*. Hypertension, 29:1-7, 1997.
55. Lindquist T. L., Beilin L. J., Knuiman M., *Effects of lifestyle, coping and work-related stress on blood pressure in office workers*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 22:580-2, 1995.
56. Staessen J. A., Fagard R., Amery A., *Life style as a determinant of blood pressure in the general population*. Am J Hypertens, 7:685-94, 1994.
57. Widgren B. R., Wikstrand J., Berglund G., Andersson O. K., *Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents*. Hypertension, 20:606-11, 1992.
58. Hamet P., Pausova Z., Adarichev V., Adaricheva K., Tremblay J., *Hypertension: genes and environment*. J Hypertens, 16:397-418, 1998.
59. Jennings G. L., *Exercise and blood pressure: Walk, run or swim?* J Hypertens, 15:567-9, 1997.
60. Tanaka H., Bassett D. R. Jr, Howley E. T., Thompson D. L., Ashraf M., Rawson F. L., *Swimming training lowers the resting blood pressure in individuals with hypertension*. J Hypertens. 15:651-7, 1997.
61. Kingwell B. A., Jennings G. L., *Effects of walking and other exercise programs upon blood pressure in normal subjects*. Med J Aust, 158:234-8, 1993.

62. Cutler J. A., Follmann D., Allender P. S., *Randomized trials of sodium reduction: an overview*. Am J Clin Nutr, 65:643S-651S, 1997.
63. Beilin L. J., Puddey I. B., Burke V., *Lifestyle and hypertension*, Am J Hypertens. 12:934-45, 1999.
64. de la Sierra A., Lluch M. M., Coca A., Aguilera M. T., Sanchez M., Sierra C., Urbano-Marquez A., *Assessment of salt sensitivity in essential hypertension by 24-h ambulatory blood pressure monitoring*. Am J Hypertens, 8:970-7, 1995.
65. Litchfield W. R., Hunt S. C., Jeunemaitre X., Fisher N. D., Hopkins P. N., Williams R. R., Corvol P., Williams G. H., *Increased urinary free cortisol: a potential intermediate phenotype of essential hypertension*. Hypertension, 31:569-74, 1998.
66. Miyoshi A., Suzuki H., Fujiwara M., Masai M., Iwasaki T., *Impairment of endothelial function in salt-sensitive hypertension in humans*. Am J Hypertens, 10:1083-90, 1997.
67. Adroge H. J., Madias N. E., *Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension*. N Engl J Med, 356:1966-78, 2007.
68. Krishna G. G., Kapoor S. C., *Potassium depletion exacerbates essential hypertension*. Ann Intern Med, 115:77-83, 1991.
69. Hamlyn J. M., Ringel R., Schaeffer J., Levinson P. D., Hamilton B. P., Kowarski A. A., Blaustein M. P., *A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) ATPase associated with essential hypertension*. Nature, 300:650-2, 1982.
70. Iwamoto T., *Vascular Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: implications for the pathogenesis and therapy of salt-dependent hypertension*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 290:R536-45, 2006.



71. Hamlyn J. M., Hamilton B. P., Manunta P., *Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis*. *J Hypertens*, 14:151-67, 1996.
72. Greenland S., *Meta-Analysis*. In Rothman K. J., Greenland S. (eds.) *Modern Epidemiology*, 2<sup>e</sup> ed, Philadelphia, PA: Lippincott, William & Wilkins, pp. 643-675, 1998.
73. Neal B., MacMahon S., Chapman N., Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials, Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration*. *Lancet*, 356:1955-64, 2000.
74. Newhouse S. J., Huq S. M., Arunachalam G., Caulfield M. J., Munroe P. B., *Genetics of hypertension*. In Battegay E. J., Lip G. Y. H., Bakris G. L. (eds.), *Hypertension: Principles and Practice*, Boca Raton, Taylor & Francis Group, pp. 47-66, 2005.
75. Flack J. M., Ferdinand K. C., Nasser S. A., *Epidemiology of hypertension and cardiovascular disease in African Americans*. *J Clin Hypertens*, 5:5-11, 2003.
76. Staessen J. A., Wang J., Bianchi G., Birkenhager W. H., *Essential hypertension*, *Lancet*, 361:1629-41, 2003.
77. Hartl D. L., Jones E. W., *Génétique : Les grands principes*. 3<sup>e</sup> ed, Paris, Dunod, pp. 539-571, 2003.
78. Hartl D. L., Jones E. W., *Génétique : Les grands principes*, 3<sup>e</sup> ed, Paris, Dunod, pp. 121-159, 2003.
79. Rapp J. P., *Genetic analysis of inherited hypertension in the rat*. *Physiol Rev*, 80:135-72, 2000.

80. Rapp J. P., Wang S. M., Dene H., *Effect of genetic background on cosegregation of renin alleles and blood pressure in Dahl rats*. Am J Hypertens, 3:391-6, 1990.
81. Cicila G. T., Rapp J. P., Wang J. M., St Lezin E., Ng S. C., Kurtz T. W., *Linkage of 11 beta-hydroxylase mutations with altered steroid biosynthesis and blood pressure in the Dahl rat*. Nat Genet, 3:346-53, 1993.
82. Deng Y., Rapp J. P., *Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats*. Nat Genet, 1:267-72, 1992.
83. Bianchi G., Tripodi G., Casari G., Salardi S., Barber B. R., Garcia R., Leoni P., Torielli L., Cusi D., Ferrandi M., et al. *Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 91:3999-4003, 1994.
84. O'Donnell C. J., Lindpaintner K., Larson M. G., Rao V. S., Ordovas J. M., Schaefer E. J., Myers R. H., Levy D., *Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study*. Circulation, 97:1766-72, 1998.
85. Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y. V., Lifton R. P., Williams C. S., Charru A., Hunt S. C., Hopkins P. N., Williams R. R., Lalouel J. M., et al. *Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen*. Cell, 71:169-80, 1992.
86. Cowley A. W. Jr. *The genetic dissection of essential hypertension*. Nat Rev Genet, 7:829-40, 2006.
87. Kato N., *Genetic analysis in human hypertension*. Hypertens Res, 25:319-27, 2002.

88. Lander E., Kruglyak L., *Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results*. Nat Genet, 11:241-7, 1995.
89. Hedrich H. J., *History, Strains, and Models in the Laboratory Rat*. In Krinke G. J. (ed.), San Diego: Academic, 2000.
90. Lindsey J. R., *The Laboratory Rat*. New York, Academic, 1979.
91. Gibbs R. A., Weinstock G. M., Metzker M. L., Muzny D. M., Sodergren E. J., Scherer S., Scott G., Steffen D., Worley K. C., Burch P. E., Okwuonu G., Hines S., Lewis L., DeRamo C., Delgado O., Dugan-Rocha S., Miner G., Morgan M., Hawes A., Gill R., Celera, Holt R. A., Adams M. D., Amanatides P. G., Baden-Tillson H., Barnstead M., Chin S., Evans C. A., Ferriera S., Fosler C., Glodok A., Gu Z., Jennings D., Kraft C. L., Nguyen T., Pfannkoch C. M., Sitter C., Sutton G. G., Venter J. C., Woodage T., Smith D., Lee H. M., Gustafson E., Cahill P., Kana A., Doucette-Stamm L., Weinstock K., Fectel K., Weiss R. B., Dunn D. M., Green E. D., Blakesley R. W., Bouffard G. G., De Jong P. J., Osoegawa K., Zhu B., Marra M., Schein J., Bosdet I., Fjell C., Jones S., Krzywinski M., Mathewson C., Siddiqui A., Wye N., McPherson J., Zhao S., Fraser C. M., Shetty J., Shatsman S., Geer K., Chen Y., Abramzon S., Nierman W. C., Havlak P. H., Chen R., Durbin K. J., Egan A., Ren Y., Song X. Z., Li B., Liu Y., Qin X., Cawley S., Worley K. C., Cooney A. J., D'Souza L. M., Martin K., Wu J. Q., Gonzalez-Garay M. L., Jackson A. R., Kalafus K. J., McLeod M. P., Milosavljevic A., Virk D., Volkov A., Wheeler D. A., Zhang Z., Bailey J. A., Eichler E. E., Tuzun E., Birney E., Mongin E., Ureta-Vidal A., Woodwark C., Zdobnov E., Bork P., Suyama M., Torrents D., Alexandersson M., Trask B. J., Young J. M., Huang H., Wang H., Xing H., Daniels S., Gietzen D., Schmidt J., Stevens K., Vitt U., Wingrove J., Camara F., Mar Alba M., Abril J. F., Guigo R., Smit A., Dubchak I., Rubin E. M., Couronne O., Poliakov A., Hubner N., Ganten D., Goesele C., Hummel O., Kreitler T., Lee Y. A., Monti J., Schulz H., Zimdahl H., Himmelbauer H., Lehrach H., Jacob H. J., Bromberg S., Gullings-Handley J., Jensen-Seaman M. I., Kwitek A. E., Lazar J., Pasko D., Tonellato P. J., Twigger S., Ponting C. P., Duarte J. M., Rice S., Goodstadt L., Beatson S. A., Emes R. D., Winter E. E., Webber C., Brandt P., Nyakatura G., Adetobi M., Chiaromonte F., Elnitski L., Eswara P., Hardison R. C., Hou M., Kolbe D.,

- Makova K., Miller W., Nekrutenko A., Riemer C., Schwartz S., Taylor J., Yang S., Zhang Y., Lindpaintner K., Andrews T. D., Caccamo M., Clamp M., Clarke L., Curwen V., Durbin R., Eyras E., Searle S. M., Cooper G. M., Batzoglou S., Brudno M., Sidow A., Stone E. A., Venter J. C., Payseur B. A., Bourque G., Lopez-Otin C., Puente X. S., Chakrabarti K., Chatterji S., Dewey C., Pachter L., Bray N., Yap V. B., Caspi A., Tesler G., Pevzner P. A., Haussler D., Roskin K. M., Baertsch R., Clawson H., Furey T. S., Hinrichs A. S., Karolchik D., Kent W. J., Rosenbloom K. R., Trumbower H., Weirauch M., Cooper D. N., Stenson P. D., Ma B., Brent M., Arumugam M., Shteynberg D., Copley R. R., Taylor M. S., Riethman H., Mudunuri U., Peterson J., Guyer M., Felsenfeld A., Old S., Mockrin S., Collins F; Rat Genome Sequencing Project Consortium., *Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution*. Nature, 428:493-521, 2004.
92. Smirk F. H., Hall W. H., *Inherited hypertension in rats*. Nature, 182: 727-728, 1958.
93. Dahl L. K., Hein M., Tassinari L., *Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion*. Nature, 194: 480-482, 1962.
94. Dahl L. K., Hein M., Tassinari L., *Effects of chronic excess salt ingestion: evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension*. J.Exp.Med., 115: 1173-1190, 1963.
95. Ben-Ishay D., Saliternik R., Welner J. L., *Separation of two strains of rats with inbred dissimilar sensitivity to DOCA-salt hypertension*. Experientia, 28: 1321-1322, 1972.
96. Dupont J., Dupont J. C., Froment A., Milon H., Vincent M., *Selection of two strains with spontaneously different levels of blood pressure*. Biomedicine, 19: 36-41, 1973.
97. Okamoto K., Aoki K., *Development of strain of spontaneously hypertensive rats*. Jpn.Circ.J., 27: 282-293, 1963.

98. Okamoto K., Yamori Y., Nagaoka A., *Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR)*. *Circ.Res*, 34: I-143-I-153, 1974.
99. Bianchi G., Fox U., Impasciati E., *The development of a new strain of spontaneously hypertensive rats*. *Life Science*, 14: 339-347, 1974.
100. Kuijpers M. H. M., Gruys E., *Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat*. *Br J Exp Pathol*, 65: 181-190, 1984.
101. Markel A. L., *Experimental model of arterial hypertension conditioned by stress (in Russian)*. *Izvestia Acad.Nauk SSSR Seria Biol*, 3: 466-469, 1985.
102. Heller J., Hellerova S., Dobesova Z., Kunês J., Zicha J., *The Prague hypertensive rat: a new model of genetic hypertension*. *Clin Exp Hypertens*, 15: 818, 1993.
103. Rapp J. P., Dene H., *Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats*. *Hypertension*, 7:340-9, 1985.
104. Cicila G. T., Dukhanina O. I., Kurtz T. W., Walder R., Garrett M. R., Dene H., Rapp J. P., *Blood pressure and survival of a chromosome 7 congenic strain bred from Dahl rats*. *Mamm Genome*, 8:896-902, 1997.
105. Dahl L. K., Heine M., *Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats*. *Circ Res*, 36:692-6, 1975.
106. Tobian L., Lange J., Azar S., Iwai J., Koop D., Coffee K., Johnson M. A., *Reduction of natriuretic capacity and renin release in isolated, blood-perfused kidneys of Dahl hypertension-prone rats*. *Circ Res*, 43: 1-92, 1978.
107. Titze J., Rittweger J., Dietsch P., Krause H., Schwind K. H., Engelke K., Lang R., Kirsch K. A., Luft F. C., Hilgers K. F., *Hypertension, sodium retention, calcium excretion and osteopenia in Dahl rats*. *J Hypertens*, 22:803-10, 2004.

108. Ginn D. I., Baptista C. A., Alam K. Y., Deng A. Y., Cicila G. T., Margolius H. S., Rapp J. P., *Estimate of the genetic divergence between inbred Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats*. *J Hypertens*, 11:477-81, 1993.
109. Garrett M. R., Dene H., Walder R., Zhang Q. Y., Cicila G. T., Assadnia S., Deng A. Y., Rapp J. P., *Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats*. *Genome Res*, 8:711-23, 1998.
110. Ferrari P. et Bianchi G., *Lessons from Experimental Genetic Hypertension*. In Lagarh J. H. et Brenner B. M., *Hypertension : Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 2<sup>e</sup> ed, New York, Raven Press, 1995, pp 1261-1279.
111. Zhao L., Sebkhi A., Nunez D. J. R., Long L., Haley C. S., Szpirer J., Szpirer C., Williams A. J., Wilkins M. R., *Right Ventricular Hypertrophy Secondary to Pulmonary Hypertension Is Linked to Rat Chromosome 17 Evaluation of Cardiac Ryanodine Ryr2 Receptor as a Candidate*. *Circulation*, 103:442, 2001.
112. Bee D., Barer G., Wach R., Pallot D., Emery C., Jones S., *Structure and function of the carotid body in New Zealand genetically hypertensive rats*. *Q J Exp Physiol*, 74:691-701, 1989.
113. Deng A. Y., *In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats*. *J Hypertens*, 16:1707-17, 1998.
114. Deng A. Y., *Determining quantitative trait loci for blood pressure in the rat – implication for human genetic hypertension*. In Dragani TA (ed): *Human polygenic diseases: animal models*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp81-111, 1998.
115. Deng A. Y., *Functional Genomics of Blood Pressure Determination: Dissecting and Assembling a Polygenic Trait by Experimental Genetics*. *Current Hypertension Reviews*, 1:35-50, 2005.
116. Abiola O., Angel J. M., Avner P., Bachmanov A. A., Belknap J. K., Bennett B., Blankenhorn E. P., Blizard D. A., Bolivar V., Brockmann G. A., Buck K. J.,

Bureau J. F., Casley W. L., Chesler E. J., Cheverud J. M., Churchill G. A., Cook M., Crabbe J. C., Crusio W. E., Darvasi A., de Haan G., Dermant P., Doerge R. W., Elliot R. W., Farber C. R., Flaherty L., Flint J., Gershenfeld H., Gibson J. P., Gu J., Gu W., Himmelbauer H., Hitzemann R., Hsu H. C., Hunter K., Iraqi F. F., Jansen R. C., Johnson T. E., Jones B. C., Kempermann G., Lammert F., Lu L., Manly K. F., Matthews D. B., Medrano J. F., Mehrabian M., Mittlemann G., Mock B. A., Mogil J. S., Montagutelli X., Morahan G., Mountz J. D., Nagase H., Nowakowski R. S., O'Hara B. F., Osadchuk A. V., Paigen B., Palmer A. A., Peirce J. L., Pomp D., Rosemann M., Rosen G. D., Schalkwyk L. C., Seltzer Z., Settle S., Shimomura K., Shou S., Sikela J. M., Siracusa L. D., Spearow J. L., Teuscher C., Threadgill D. W., Toth L. A., Toye A. A., Vadasz C., Van Zant G., Wakeland E., Williams R. W., Zhang H. G., Zou F., Complex Trait Consortium., *The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view*. Nat Rev Genet, 4:911-6, 2003.

117. Darvasi A., *Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models*. Nat Genet, 18:19-24, 1998.
118. Rapp J. P., Deng A. Y., *Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? Identifying the genes for genetic hypertension*. Hypertension, 25:1121-8, 1995.
119. Rapp J. P., *A paradigm for identification of primary genetic causes of hypertension in rats*. Hypertension, 5:1198-203, 1983.
120. Rapp J. P., *Dissecting the primary causes of genetic hypertension in rats*, *Hypertension*. 18:118-28, 1991.
121. Lincoln S. E., Daly M. J., Lander E. S., *Mapping Genes Controlling Quantitative Traits Using MAPMAKER/QTL Version 1.1: A Tutorial and Reference Manual*. A Whitehead Institute for Biomedical, 2<sup>e</sup> ed, Cambridge, 1993.

122. McBride M. W., Charchar F. J., Graham D., Miller W. H., Strahorn P., Carr F. J., Dominiczak A. F., *Functional genomics in rodent models of hypertension*. J Physiol, 554:56-63, 2004.
123. Frantz S. A., Kaiser M., Gardiner S. M., Gauguier D., Vincent M., Thompson J. R., Bennett T., Samani N. J., *Successful isolation of a rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus in reciprocal congenic strains*. Hypertension, 32:639-46, 1998.
124. Morel L., Yu Y., Blenman K. R., Caldwell R. A., Wakeland E. K., *Production of congenic mouse strains carrying genomic intervals containing SLE-susceptibility genes derived from the SLE-prone NZM2410 strain*. Mamm Genome, 7:335-9, 1996.
125. Jeffs B., Negrin C. D., Graham D., Clark J. S., Anderson N. H., Gauguier D., Dominiczak A. F., *Applicability of a "speed" congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 2*. Hypertension, 35:179-87, 2000.
126. Garrett M. R., Rapp J. P., *Multiple blood pressure QTL on rat Chromosome 2 defined by congenic Dahl rats*. Mamm Genome, 13:41-4, 2002.
127. Meng H., Garrett M. R., Dene H., Rapp J. P., *Localization of a blood pressure QTL to a 2.4-cM interval on rat chromosome 9 using congenic strains*. Genomics, 81:210-20, 2003.
128. Montagutelli X., Abitbol M., *Utilisation des lignées congéniques chez la souris*. Med Sci, Paris, 20:887-93, 2004.
129. Mackay T. F., *Quantitative trait loci in Drosophila*. Nat Rev Genet, 2:11-20, 2001.
130. Korstanje R., Paigen B., *From QTL to gene: the harvest begins*. Nat Genet, 31:235-6, 2002.



131. McBride M. W., Carr F. J., Graham D., Anderson N. H., Clark J. S., Lee W. K., Charchar F. J., Brosnan M. J. et Dominiczak A. F., *Microarray analysis of rat chromosome 2 congenic strains*. Hypertension, 41:847-53, 2002.
132. Mullins L. J., Bailey M. A., Mullins J. J., *Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective*. Physiol Rev, 86:709-46, 2006.
133. Baltatu O., Bader M., *Brain renin-angiotensin system. Lessons from functional genomics*. Neuroendocrinology, 78:253-9, 2003.
134. Deng A. Y., Dene H., Pravenec M., Rapp J. P., *Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes*. J Clin Invest, 93:2701-9, 1994.
135. Yagil C., Sapojnikov M., Kreutz R., Katni G., Lindpaintner K., Ganten D., Yagil Y., *Salt susceptibility maps to chromosomes 1 and 17 with sex specificity in the Sabra rat model of hypertension*. Hypertension, 31:119-24, 1998.
136. Grondin M., Eliopoulos V., Lambert R., Deng Y., Ariyarajah A., Moujahidine M., Dutil J., Charron S., Deng Y. A., *Complete and overlapping congenics proving the existence of a quantitative trait locus for blood pressure on Dahl rat chromosome 17*. Physiol Genomics, 21:112-6, 2005.
137. Schork N. J., Krieger J. E., Trolliet M. R., Franchini K. G., Koike G., Krieger E. M., Lander E. S., Dzau V. J., Jacob H. J., *A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation*. Genome Res, 5:164-72, 1995.
138. Moujahidine M., Dutil J., Hamet P., Deng A. Y., *Congenic mapping of a blood pressure QTL on chromosome 16 of Dahl rats*. Mamm Genome, 13:153-6, 2002.
139. Moujahidine M., Lambert R., Dutil J., Palijan A., Sivo Z., Ariyarajah A., Deng A. Y., *Combining congenic coverage with gene profiling in search of candidates*

*for blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats.* Hypertens Res, 27:203-12, 2004.

140. Dutil J., Deng A. Y., *Further chromosomal mapping of a blood pressure QTL in Dahl rats on chromosome 2 using congenic strains.* Physiol Genomics, 6:3-9, 2001.
141. Braverman A. S., Tallarida R. J., Ruggieri M. R. Sr., *Interaction between muscarinic receptor subtype signal transduction pathways mediating bladder contraction.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 283:R663-8, 2002.
142. Matsui M., Motomura D., Fujikawa T., Jiang J., Takahashi S., Manabe T., Taketo M. M., *Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable.* J Neurosci, 22:10627-32, 2002.
143. Rubattu S., Struk B., Kreutz R., Volpe M., Lindpaintner K., *Animal models of genetic hypertension: what can we learn for human hypertension?* Clin Exp Pharmacol Physiol, 22:S386-93, 1995.
144. James J. F., Hewett T. E., Robbins J., *Cardiac physiology in transgenic mice,* Circ Res, 82:407-15, 1998.
145. Brockway B. P., Hassler C. R., *Application of radio-telemetry to cardiovascular measurements in pharmacology and toxicology. In New Technologies and Concepts for Reducing Drug Toxicity.* Boca Raton: CRC, pp 109–132, 1993.
146. Chau W. H., Lee W. H., Lau W. H., Kwan Y. W., Au A. L. et Raymond K., *Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in acetylcholine-mediated pulmonary artery contraction of spontaneously hypertensive rats.* Eur J Pharmacol, 464:177-87, 2003.
147. Laping N. J., Olson B. A., Zhu Y., *Identification of a novel nuclear guanosine triphosphate-binding protein differentially expressed in renal disease.* J Am Soc Nephrol, 12:883-90, 2001.

148. Wang Y., Liu X., Biederer T., Sudhof T. C., *A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones.* Proc Natl Acad Sci U S A, 99:14464-9, 2002.
149. Ohtsuka T., Takao-Rikitsu E., Inoue E., Inoue M., Takeuchi M., Matsubara K., Deguchi-Tawarada M., Satoh K., Morimoto K., Nakanishi H., Takai Y., *Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1.* J Cell Biol, 158:577-90, 2002.
150. Deng A. Y., *Is the nitric oxide system involved in genetic hypertension in Dahl rats?* Kidney Int, 53:1501-11, 1998.
151. Duong C., Charron S., Dutil J., Deng Y., Xiao C. J., Ménard A., Roy J., Deng A. Y., *Functional roles and genetic bases unveiled by heterozygotes of quantitative trait loci for blood pressure isolated using congenic strains.* Montréal, Université de Montréal, pp. 1-21, 2005. (Article refusé)
152. Jeffs B., Negrin C. D., Graham D. et al. *Applicability of a speed congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 2.* Hypertension, 35:179-187, 2000.
153. Alemayehu A., Breen L., Krenova D. et al. *Reciprocal rat chromosome 2 congenic strains reveal contrasting blood pressure and heart rate QTL.* Physiol Genomics, 10:199-210, 2002.
154. Yagil C., Hubner N., Kreutz R. et al. *Congenic strains confirm the presence of salt-sensitivity QTLs on chromosome 1 in Sabra rat model of hypertension.* Physiol Genomics, 93:2170-2177, 2003.
155. Duong C., Charron S., Deng Y., Xiao C., Menard A., Roy J., Deng A. Y., *Individual QTLs controlling quantitative variation in blood pressure inherited in a Mendelian mode.* Heredity, 98:165-71, 2007.
156. Deng A. Y., *Genetic bases of polygenic hypertension.* Montréal, Université de Montréal, pp 1-40, 2006. (Article refusé)

157. Dominiczak A. F., Lindpaintner K., *Genetics of hypertension: a current appraisal*. *News Physiol Sci*, 9:246–251, 1994.
158. Moreno C., Dumas P., Kaldunski M. L., Tonellato P. J., Greene A. S., Roman R. J., Cheng Q., Wang Z., Jacob H. J., Cowley A. W. Jr. *Genomic map of cardiovascular phenotypes of hypertension in female Dahl S rats*. *Physiol Genomics*, 15:243-57, 2003.
159. Lever A. F., Harrap S. B., *Essential hypertension: a disorder of growth with origins in childhood?* *J Hypertens*, 10:101-20, 1992.
160. Schork N. J., Nath S. P., Lindpaintner K., Jacob H. J., *Extensions to quantitative trait locus mapping in experimental organisms*. *Hypertension*, 28:1104-11, 1996.
161. Wallen W. J., Belanger M. P., Wittnich C., *Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats*. *J Nutr*, 132:2246-50, 2002.
162. Lambert R., *Localisation d'un locus pour trait quantitatif pour l'hypertension sur le chromosome 18 du rat Dahl*. Montréal, Université de Montréal, p. 81, 2005.
163. Charron S., Lambert R., Eliopoulos V., Duong C., Menard A., Roy J., Deng A. Y., *A loss of genome buffering capacity of Dahl salt-sensitive model to modulate blood pressure as a cause of hypertension*. *Hum Mol Genet*, 14:3877-84, 2005.
164. Wilson C., Bellen H. J., Gehring W. J., *Position effects on eukaryotic gene expression*. *Annu Rev Cell Biol*, 6:679-714, 1990.
165. Ohno Y., Tanase H., Nabika T., Otsuka K., Sasaki T., Suzawa T., Morii T., Yamori Y., Saruta T., *Selective genotyping with epistasis can be utilized for a*

- major quantitative trait locus mapping in hypertension in rats. Genetics, 155:785-92, 2000.*
166. Rapp J. P., Garrett M. R., Deng A. Y., *Construction of a double congenic strain to prove an epistatic interaction on blood pressure between rat chromosomes 2 and 10. J Clin Invest, 101:1591-5, 1998.*
  167. Charron S., Duong C., Menard A., Roy J., Eliopoulos V., Lambert R., Deng A. Y., *Epistasis, not numbers, regulates functions of clustered Dahl rat quantitative trait loci applicable to human hypertension. Hypertension, 46:1300-8, 2005.*
  168. Dutil J., Eliopoulos V., Tremblay J., Hamet P., Charron S., Deng A. Y., *Multiple quantitative trait loci for blood pressure interacting epistatically and additively on Dahl rat chromosome 2. Hypertension, 45:557-64, 2005.*
  169. Palijan A., Dutil J., Deng A. Y., *Quantitative trait loci with opposing blood pressure effects demonstrating epistasis on Dahl rat chromosome 3. Physiol Genomics, 15:1-8, 2003.*
  170. Cicila G. T., Choi C., Dene H., Lee S. J., Rapp J. P., *Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on chromosome 3 in Dahl rats. Mamm Genome, 10:112-6, 1999.*
  171. Julier C., Delepine M., Keavney B., Terwilliger J., Davis S., Weeks D. E., Bui T., Jeunemaitre X., Velho G., Froguel P., Ratcliffe P., Corvol P., Soubrier F., Lathrop G. M., *Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. Hum Mol Genet, 6:2077-85, 1997.*
  172. Deng A. Y., Rapp J. P., *Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. Nat Genet, 1:267-72, 1992.*

173. Zee R. Y., Lou Y. K., Griffiths L. R., Morris B. J., *Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. Biochem Biophys Res Commun*, 184:9-15, 1992.
174. Schmidt S., van Hooft I. M., Grobbee D. E., Ganten D., Ritz E., *Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. J Hypertens*, 11:345-8, 1993.
175. Stoll M., Kwitek-Black A. E., Cowley A. W. Jr, Harris E. L., Harrap S. B., Krieger J. E., Printz M. P., Provoost A. P., Sassard J., Jacob H. J., *New target regions for human hypertension via comparative genomics. Genome Res*, 10:473-82, 2000.