

Université de Montréal

**Modularisation épistatique des loci à trait quantitatif  
associés à la pression artérielle et identification de  
gènes candidats pour l'hypertension**

par

**Kimberley CRESPO**

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté de médecine,  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en biologie moléculaire, option générale

Septembre, 2015

© Kimberley Crespo, 2015

# RÉSUMÉ

**Problématique:** L'hypertension artérielle essentielle, facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires, est un trait multigénique complexe dont les connaissances sur le déterminisme génétique nécessitent d'être approfondies. De nombreux loci à trait quantitatif (QTLs); soit des gènes responsables de faire varier la pression artérielle (PA), ont été identifiés chez l'humain et le modèle animal. Cependant, le mystère plane encore sur la façon dont ces gènes fonctionnent ensemble pour réguler la PA.

**Hypothèse et objectif:** Plutôt qu'une addition de QTLs ayant chacun une action infinitésimale sur la PA, une interaction épistatique entre les gènes serait responsable du phénotype hypertendu. Ainsi, l'étude de cette épistasie entre les gènes impliqués, directement ou indirectement, dans l'homéostasie de la PA nous permettrait d'explorer de nouvelles voies de régulation moléculaire en cause dans cette maladie.

**Méthodes:** Via la réalisation de souches congéniques de rats, où un segment chromosomique provenant d'une souche receveuse hypertendue (Dahl *Salt Sensitive*, SS/Jr) est remplacé par son homologue provenant d'une souche donneuse normotendue (Lewis, LEW), des QTLs peuvent être mis en évidence. Dans ce contexte, la combinaison de QTLs via la création de doubles ou multiples congéniques constitue la première démonstration fonctionnelle des interactions intergéniques.

**Résultats:** Vingt-sept combinaisons au total nous ont menés à l'appréciation d'une modularisation des QTLs. Ces derniers ont été catégorisés selon deux principaux modules épistatiques (EMs) où les QTLs appartenant à un même EM sont épistatiques entre eux et participent à une même voie régulatrice. Les EMs/cascades agissent alors en parallèle pour réguler la PA. Grâce à l'existence de QTLs ayant des effets opposés sur la PA, nous avons pu établir l'ordre hiérarchique entre trois paires de QTLs. Cependant, lorsque cette suite régulatrice ne peut être déterminée, d'autres approches sont nécessaires. Nos travaux nous ont

mené à l'identification d'un QTL situé sur le chromosome 16 du rat (C16QTL), appartenant au EM1 et qui révélerait une nouvelle voie de l'homéostasie de la PA. Le gène *retinoblastoma-associated protein 140 (Rap140)/family with sequence similarity 208 member A (Fam208a)*, présentant une mutation non synonyme entre SS/Jr et LEW est le gène candidat le plus plausible pour représenter C16QTL. Celui-ci code pour un facteur de transcription et semblerait influencer l'expression de *Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y<sup>+</sup> system) member 12 (Slc7a12)*, spécifiquement et significativement sous exprimé dans les reins de la souche congénique portant C16QTL par rapport à la souche SS/Jr. *Rap140/Fam208a* agirait comme un inhibiteur de la transcription de *Slc7a12* menant à une diminution de la pression chez Lewis.

**Conclusions:** L'architecture complexe de la régulation de la PA se dévoile mettant en scène de nouveaux acteurs, pour la plupart inconnus pour leur implication dans la PA. L'étude de la nouvelle voie de signalisation *Rap140/Fam208a - Slc7a12* nous permettra d'approfondir nos connaissances quant à l'homéostasie de la pression artérielle et de l'hypertension chez SS/Jr. À long terme, de nouveaux traitements anti-hypertenseurs, ciblant plus d'une voie de régulation à la fois, pourraient voir le jour.

**Mots-clés:** Hypertension, QTLs (Loci à trait quantitatif), Souches congéniques, Gènes candidats, Épistasie, Cascade, Hiérarchie génétique, *Rap140/Fam208a*, *Slc7a12*.

# ABSTRACT

**Introduction:** Essential hypertension, a major risk factor in the development of cardiovascular diseases, is a complex multigenic trait whose knowledge about genetic determinism require further study. Many quantitative trait loci (QTLs); genes responsible for varying blood pressure (BP), have been identified in humans and animal models. However, the mystery still lingers on how these genes work together to regulate the BP.

**Hypothesis and aim:** Rather than an addition of QTLs, each with an infinitesimal effect on the BP, an epistatic interaction between genes would be responsible for the hypertensive phenotype. Thus, the study of this epistasis among genes involved directly or indirectly in the homeostasis of the BP allow us to explore new molecular regulatory pathways involved in this disease.

**Methods:** Via the embodiment of rats congenic strains, where a chromosomal segment from a recipient hypertensive strain (Dahl Salt Sensitive, SS/Jr) is replaced by its homologue from a donor normotensive strain (Lewis, LEW); QTLs may be identified. In this context, the combination of QTLs by creating double or multiple congenics constitutes the first functional demonstration of intergenic interactions.

**Results:** Twenty-seven combinations in total have led us to the assessment of a modularization of QTLs. These have been categorized according to two main epistatic modules (EMs) where QTLs belonging to the same EM are epistatic with each other and participate in the same regulatory pathway. The EMs / pathway then act in parallel to control the BP. Thanks to the existence of QTLs with opposite effects on BP, we were able to establish hierarchical order between three pairs of QTLs. However, when this regulatory sequence cannot be determined, other approaches are needed. Our work led us to the identification of a QTL on rat chromosome 16 (C16QTL) belonging to the EM1 revealing a new way of BP homeostasis. The *retinoblastoma-associated protein gene 140 (Rap140)* / family with sequence similarity 208 member A (*Fam208a*) having a nonsynonymous mutation between SS/Jr and LEW is the

most plausible candidate gene to represent C16QTL. It encodes a transcription factor and appear to influence the expression of *Solute carrier family 7 (cationic amino acid transport, y + system) member 12 (Slc7a12)* specifically and significantly under expressed in the kidneys of the congenic strain carrying C16QTL compared to the strain SS/Jr. *Rap140 / Fam208a* acts as an inhibitor of *Slc7a12* transcription leading to a BP decrease in the congenic strain.

**Conclusions:** The complex architecture of the regulation of BP unveils featuring new players, mostly unknown to their involvement in the BP. The study of the new signaling pathway *Rap140 / Fam208a - Slc7a12* will deepen our knowledge about the homeostasis of blood pressure and hypertension in SS/Jr. In the long term, new antihypertensive treatments, targeting more than one regulatory cascade at a time may emerge.

**Key words:** Hypertension, QTLs, Congenic strains, Candidate genes, Epistasis, Molecular pathway, Genetic Hierarchy, *Rap140/Fam208a, Slc7a12*.

# Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xv
Liste des figures	xvi
Liste des sigles et des abréviations	xviii
Dédicaces	xxviii
Remerciements	xxix
But et plan de la thèse	xxxii
CHAPITRE I - INTRODUCTION	1
I-1 La Pression Artérielle	2
I-1.1 Définition	2
I-1.2 Techniques de mesures	3
I-1.3 Mécanismes de régulation physiologique	4
I-1.3.1 Régulation nerveuse (SNS)	4
I-1.3.2 Régulation hormonale	7
I-1.3.2.1 Système SRAA	7
I-1.3.2.2 Les facteurs endothéliaux	10
I-1.3.2.3 D'autres hormones	11
I-2 L'Hypertension artérielle	15
I-2.1 Définition	15
I-2.2 Deux types d'hypertension artérielle	16

I-2.2.1	Hypertension secondaire	16
I-2.2.1.1	Étiologie rénale	16
I-2.2.1.2	Étiologie surrénalienne	17
I-2.2.1.3	L'apnée du sommeil	17
I-2.2.1.4	L'hypertension gravidique	18
I-2.2.1.5	Étiologie toxique et autre	18
I-2.2.2	Hypertension primaire ou essentielle	19
I-2.2.2.1	Facteurs démographiques	19
I-2.2.2.2	Facteurs environnementaux	19
I-2.2.2.3	Facteurs métaboliques	21
I-2.3	Épidémiologie	22
I-2.4	Pathophysiologie de l'hypertension artérielle	23
I-2.4.1	Hémodynamique cardiovasculaire	23
I-2.4.1.1	Les variables de la pression artérielle	24
I-2.4.1.2	Dysfonction endothéliale	25
I-2.4.1.3	Remodelage vasculaire	26
I-2.4.1.4	Athérosclérose	26
I-2.4.2	Développement des maladies cardiovasculaires	27
I-2.4.2.1	Hypertrophie du ventricule gauche (HVG)	27
I-2.4.2.2	Coronaropathies	28
I-2.4.2.3	Insuffisance cardiaque congestive	28
I-2.4.2.4	Accidents vasculaires cérébraux (AVC)	28
I-2.4.2.5	Atteintes rénales	29
I-2.5	Traitements anti-hypertenseurs	29

I-3 Déterminisme génétique de l’hypertension artérielle	30
I-3.1 L’hypertension essentielle, un trait polygénique, complexe	30
I-3.1.1 Études de populations et de familles	31
I-3.1.1.1 Formes monogéniques d’hypertension	32
I-3.1.1.2 Études de liaisons et études de génomes entiers	36
I-3.1.1.3 Études d’association	38
I-3.1.1.3.1 Définition et méthode	39
I-3.1.1.3.2 Résultats	40
I-3.1.1.3.3 Avantages	42
I-3.1.1.3.4 Limites	43
I-3.1.1.4 Approche par gènes candidats	45
I-3.1.1.5 Séquençage de l’exome complet	46
I-3.2 Analyse de <i>loci</i> à trait quantitatif chez le modèle animal	47
I-3.2.1 La pression artérielle, un trait quantitatif	47
I-3.2.1.1 Définition d’un trait quantitatif	47
I-3.2.1.2 Définition d’un Locus à trait quantitatif (QTL)	48
I-3.2.2 Le rat comme modèle animal	49
I-3.2.2.1 Souches de rats	50
I-3.2.2.2 Le rat <i>Dahl Salt-Sensitive</i>	51
I-3.2.2.2.1 Création du modèle <i>Dahl</i>	51
I-3.2.2.2.2 Effets du phénotype sexuel	53
I-3.2.3 Notre stratégie génétique	55



I-4 Interactions génétiques	57
I-4.1 Interactions alléliques	58
I-4.2 Effet du fond génétique	59
I-4.2.1 Effet de position	59
I-4.2.2 Importance de la souche donneuse et spécificité des populations	59
I-4.2.3 L'apport des souches réciproques	62
I-4.3 Interactions géniques: additivité <i>versus</i> épistasie	64
I-4.4 Rôle fondamental de l'épistasie dans la régulation de la PA	65
CHAPITRE II - MÉTHODOLOGIE	67
II-1 Notre approche génétique	68
II-1.1 Les souches congéniques	68
II-1.1.1 Sous-souches congéniques	70
II-1.1.2 <i>Speed Congenics</i>	70
II-1.1.3 Doubles et multiples congéniques	70
II-1.2 Avantages de notre stratégie	71
II-1.3 Limites de notre stratégie	72
II-2 Mesures de Pression Artérielle	73
II-3 Protocole animalier	74
II-4 Analyse statistique	76
II-5 Cartographie de QTLs	77
II-5.1 Marqueurs génétiques	78
II-5.2 Génotypage	78
II-6 Analyses moléculaires et identification de gènes candidats	79
II-6.1 Séquençage	80

II-6.2 Analyse d'expression	81
CHAPITRE III - PROJET DE RECHERCHE	82
CHAPITRE IV - RÉSULTATS - PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	86
<i>IV-1 Modularization and epistatic hierarchy determine homeostatic actions of multiple blood pressure quantitative trait loci</i>	87
IV-1.1 Contribution des co-auteurs	88
IV-1.2 Abstract	89
IV-1.3 Introduction	89
IV-1.4 Results	91
IV-1.4.1 Study design in grouping QTLs	91
IV-1.4.2 Modularization of BP QTLs	96
IV-1.4.3 Biological significance of QTL modularization	99
IV-1.4.4 Implications of modularization for human QTLs	99
IV-1.5 Discussion	100
IV-1.5.1 Epistatic modularization, not quantitative accumulation, is the <i>modus operandi</i> in biological BP determination by QTLs	100
IV-1.5.2 Pathway of epistatic modules	105
IV-1.6 Conclusion	106
IV-1.7 Materials and Methods	107
IV-1.7.1 Animals	107
IV-1.7.2 Construction of new congenic strains or substrains	107
IV-1.7.3 Systematic assessment of QTL-QTL interactions by congenic combinations	107
IV-1.7.4 Animal protocols and BP measurements	108
IV-1.7.5 Statistical analysis	108

IV-1.8 References	109
IV-1.9 Supplemental data	113
IV-1.10 Supplemental data references	131
<i>IV-2 Retinoblastoma-associated protein 140 as a candidate for a novel etiological gene to hypertension</i>	133
IV-2.1 Contribution des co-auteurs	134
IV-2.2 Abstract	135
IV-2.3 Introduction	136
IV-2.4 Methods	137
IV-2.4.1 Animals	137
IV-2.4.2 Construction of congenic strains	137
IV-2.4.3 Experimental protocols and analyses	137
IV-2.4.4 Independent total genome sequencing of DSS and Lewis rats	138
IV-2.4.5 Mutation screenings	138
IV-2.4.6 Quantitative real time polymerase chain reactions (qPCR)	139
IV-2.5 Results	139
IV-2.5.1 <i>C16QTL</i> placement	139
IV-2.5.2 Molecular analyses identified retinoblastoma-associated protein 140 (Rap140)/ family with sequence similarity 208 member a (Fam208a) as the sole candidate gene for <i>C16QTL</i>	139
IV-2.5.3 <i>Rap140/Fam208a</i> may regulate expressions of genes downstream in a pathway	148
IV-2.6 Discussion	152
IV-2.6.1 Fine congenic resolution of <i>C16QTL</i>	153
IV-2.6.2 <i>Rap140/Fam208a</i> is the only gene supported as <i>C16QTL</i>	153

IV-2.6.3 <i>Slc7a12</i> is a potential transcription target for <i>Rap140/Fam208a</i>	154
IV-2.6.4 <i>C16QTL</i> acts « indirectly » on blood pressure	155
IV-2.6.5 Significance and caveats	156
IV-2.7 Perspective	157
IV-2.8 References	157
IV-2.9 Supplements	162
CHAPITRE V - DISCUSSION	182
V-1 Révélations majeures	183
V-2 L'héritabilité manquante	183
V-3 Des avancées dans l'architecture génétique régissant la régulation de la PA	186
V-3.1 Évidence épistatique <i>versus</i> théorie de l'additivité	186
V-3.2 Le concept d'épistasie	189
V-3.2.1 Définitions	189
V-3.2.2 Impact fonctionnel <i>versus</i> statistique des QTLs	190
V-3.2.3 Méthodes d'étude de l'épistasie	191
V-3.2.4 Interprétation de l'épistasie	191
V-4 La modularisation épistatique des QTLs	192
V-4.1 Interprétation de la modularisation des QTLs	194
V-4.2 L'aspect novateur de nos travaux	194
V-5 Hiérarchie génétique	196
V-5.1 Le pouvoir de nos données expérimentales	196
V-5.2 Signification de la hiérarchie génétique et facteurs limitants	199
V-6 Du modèle animal à l'humain	203
V-7 La spécificité des populations	205

V-8 Analyses moléculaires des QTLs	207
V-8.1 Gènes candidats	207
V-8.1.1 Dépistage de mutations	207
V-8.1.2 Profil d'expression génique	208
V-9 En découvrir plus sur les modules épistatiques: exemple du <i>C16QTL</i>	209
V-9.1 Localisation d'un QTL sur le chromosome 16	210
V-9.2 <i>Rap140/Fam208a</i> comme gène candidat pour le <i>C16QTL</i>	211
V-9.3 <i>Slc7a12</i> agirait en aval de la cascade EM1	213
V-9.4 La voie de régulation EM1 se dévoile un peu plus	215
V-10 Critiques de nos résultats	216
CHAPITRE VI - CONCLUSION	219
CHAPITRE VII - PERSPECTIVES	223
CHAPITRE VIII - ANNEXES	227
VIII-1 <i>Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes</i>	228
VIII-2 <i>Hypertension Suppression, Not a Cumulative Thrust of Quantitative Trait Loci, Predisposes Blood Pressure Homeostasis to Normotension</i>	260
VIII-3 Les transporteurs des acides aminés	272
BIBLIOGRAPHIE	273
CURRICULUM VITAE	xxxii

# Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Comparaison des PAS et du poids des rats Lewis et SR/Jr sous une diète riche en sel (8% NaCl)	<b>53</b>
<b>Tableau II:</b> Associations génétiques populations-dépendantes	<b>60</b>
<b>Tableau I (IV-1):</b> Assessment of QTL-QTL interactions by congenic combinations	<b>93</b>
<b>Tableau II (IV-1):</b> Modularization of BP QTLs by epistasis	<b>98</b>
<b>Tableau S-I (IV-1):</b> Summary of QTLs and their blood pressure effects defined by congenic strains	<b>113</b>
<b>Tableau S-II (IV-1):</b> Correspondance of human blood pressure quantitative trait loci (QTLs) and their rat homologues	<b>115</b>
<b>Tableau S-IIIa (IV-1):</b> Sequence alignment of Adrenomedulin (Adm) between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats	<b>118</b>
<b>Tableau S-IIIb (IV-1):</b> Sequence alignment of Endothelin 3 (Edn3) among Dahl salt-sensitive (DSS), Lewis and Dahl Salt-resistant (DSR) rats	<b>120</b>
<b>Tableau S-IIIc (IV-1):</b> Sequence alignment of Hemochromatosis (Hfe) between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats	<b>122</b>
<b>Tableau I (IV-2):</b> Mutation screening of genes in the C16QTL-containing interval	<b>140</b>
<b>Tableau II (IV-2):</b> Evaluation of gene expressions triggered by <i>Rap140/Fam208a</i> via quantitative reverse transcriptase polymerase chain reactions (qPCR) on kidney cDNA	<b>151</b>

# Liste des figures

<b>Figure 1: Schéma de la régulation neuronale à court terme: le baroréflexe</b>	<b>5</b>
<b>Figure 2: Schéma de la régulation hormonale à long terme via le SRAA</b>	<b>8</b>
<b>Figure 3: La natriurèse</b>	<b>9</b>
<b>Figure 4: Communication entre cellules vasculaires musculaires lisses et cellules endothéliales</b>	<b>13</b>
<b>Figure 5: Formes monogéniques de l'hypertension</b>	<b>35</b>
<b>Figure 6: Exemples d'étude de liaison pour les chromosomes 5, 8 et 10</b>	<b>56</b>
<b>Figure 7: Schéma représentant la réalisation de souches congéniques</b>	<b>69</b>
<b>Figure 8: Schéma du protocole animalier</b>	<b>75</b>
<b>Figure 9: Cartographie chromosomique des QTLs (carte de substitution)</b>	<b>77</b>
<b>Figure 1 (IV-1): Analysis of interactions among representative QTLs</b>	<b>95</b>
<b>Figure 2 (IV-1): BPs of single and multiple congenic strains producing 1-8 QTL combinations</b>	<b>103</b>
<b>Figure S1 (IV-1): Definition of QTLs for blood pressure by congenic strains</b>	<b>125</b>
<b>Figure 1 (IV-2): Fine congenic resolution of C16QTL</b>	<b>145</b>
<b>Figure 2 (IV-2): Detection of 3 bases deletions in <i>Rap140/Fam208a</i></b>	<b>147</b>
<b>Figure 3 (IV-2): Organ expression pattern of genes assayed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)</b>	<b>149</b>
<b>Figure S1 (IV-2): Total genome sequencing pipeline from Genome Québec</b>	<b>162</b>
<b>Figure S2 (IV-2): Selective global evaluation of genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) comparing DSS and Lewis rats</b>	<b>165</b>
<b>Figure S3 (IV-2): Coding sequence alignment of the <i>Retinoblastoma associated protein 140 (Rap140/Fam208a)</i> gene between Dahl salt-sensitive and Lewis rats</b>	<b>166</b>

<b>Figure S4 (IV-2): Coding sequence alignment of the <i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF)</i> gene between Dahl salt-sensitive and Lewis rats</b>	<b>172</b>
<b>Figure S5 (IV-2): Coding sequence alignment of coiled-coil domain containing 66 (<i>Ccdc66</i>) gene between Dahl salt-sensitive and Lewis rats</b>	<b>174</b>
<b>Figure S6 (IV-2): Survey of nucleotide variations in non-coding regions of the genes in genome block 1 in the C16QTL-residing interval</b>	<b>177</b>
<b>Figure S7 (IV-2): Detection of 3 bp deletion as length polymorphism in <i>Rap140/Fam208a</i></b>	<b>178</b>
<b>Figure S8 (IV-2): Nucleotide variations in 5'UTR and 3'UTR of genes in genome block 2</b>	<b>179</b>
<b>Figure S9 (IV-2): Comparisons of expressions for 3 genes in the C16QTL-lodging interval by qRT-PCR in kidney</b>	<b>181</b>
<b>Figure 10: Schéma représentant les effets parallèles des QTLs</b>	<b>187</b>
<b>Figure 11: Graphe montrant la corrélation non linéaire entre le nombre de QTLs et l'effet sur la PA</b>	<b>188</b>
<b>Figure 12: Modularisation des QTLs influençant la PA en blocs épistatiques</b>	<b>192</b>
<b>Figure 13: Schéma des effets pléiotropiques des C7QTL, C1QTL1 et C1QTL3</b>	<b>193</b>
<b>Figure 14: Ordre hiérarchique entre C8QTL2 et C10QTL2</b>	<b>197</b>
<b>Figure 15: Schéma global de l'architecture génétique complexe</b>	<b>202</b>
<b>Figure 16: Analyse de liaison pour le chromosome 16</b>	<b>210</b>



# Liste des sigles et des abréviations

AA: acide arachidonique

Abca8a: ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 8A

ACE: Angiotensin I converting enzyme

ACH : acétylcholine

ACTH : hormone adrénocorticotropique

Acsm3: (Sa) acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3

ADD1: alpha-adducin

ADH : hormone antidiurétique, vasopressine

ADM: adrenomedullin

ADN : acide désoxyribonucléique

ADRA2: gène alpha-2 adrenergic receptor

ADRB1: gène beta-1 adrenergic receptor

AGT: gène Angiotensinogen

Agtr1 : récepteur de l'angiotensine de type 1

ALDH2: gène aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)

ALPK2: Alpha kinase 2

ANOVA: Analysis of variance

ANG I : angiotensine I

ANG II : angiotensine II

ANP: peptide natriurétique auriculaire

App1: adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper  
containing 1

Arhgef3: Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASC2: anterior suture cataract 2

AT1: récepteur de l'angiotensine I  
AT2: récepteur de l'angiotensine II  
ATP : adénosine triphosphate  
ATP1A1: gène ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting alpha 1 polypeptide  
ATP2B1: gène ATPase Ca<sup>2+</sup> transporting plasma membrane 1  
ATXN2: gène ataxin 2  
AQP1: aquaporine  
AR: androgen receptor  
Asb14: ankyrin repeat and SOCS box-containing 14  
AVC: accident vasculo-cérébral  
AVPR1: récepteur 1 de la vasopressine (ADH)  
AVPR2: récepteur 2 de la vasopressine (ADH)  
BAT2: gène proline-rich coiled-coil 2B  
BAT5: gène ab hydrolase domain containing 16A  
BC: Backcross, croisement en retour  
BN : Brown Norway rat  
BNP: peptide natriurétique de type B  
BP: Blood pressure  
C5orf23: chromosome 5 open reading frame 23  
C10orf107: chromosome 10 open reading frame 107  
Ca<sup>2+</sup> : ion calcium  
CACNB2 : calcium channel voltage-dependant, beta 2 subunit  
Ca<sup>2+</sup>VOC-L: canaux calciques voltage-dépendant de type L  
CAPZA1: capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1  
CASZ1: castor zinc finger 1  
Ccdc66: coiled-coil domain containing 66  
Cdk: cyclin/cyclin-dependant kinases  
cGMP: cyclic guanosine monophosphate

CHARGE: Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology  
CHIC2: cysteine-rich hydrophobic domain 2  
Chr. : chromosome  
CIPA : conseil institutionnel de protection des animaux  
Cl : ion chlorure  
cM : centiMorgan  
CML: cellules musculaires lisses  
CNNM2: cyclin M2  
CNP: peptide natriurétique de type C  
CNV: Copy number variation  
CLCN6: chloride channel, voltage-sensitive 6  
CO: Cross-over, recombinaison chromosomique  
CO2 : dioxyde de carbone  
Comtd1: catechol-O-methyltransferase domain containing 1  
COX: cyclooxygénase  
CRCHUM : Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
CSK: c-src tyrosine kinase  
CYP: cytochrome  
CYP1A2: cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2  
CYP11B1: 11 beta-hydroxylase  
CYP11B2: aldostérone synthase  
CYP11B3: cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 3  
CYP17A1: cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1  
d: diem, jour  
D14Abb1: Abbott 1 expressed  
DC: débit cardiaque  
E2F: E2F transcription factor  
EBF1: early B-cell factor 1

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine  
ECG: électrocardiogramme  
EDHF: endothelium-derived hyperpolarising factor  
EDN3: gène endothelin 3  
EET: Acide epoxyeicosatriénoïque  
EGB: Ensemble Genome Browser  
EM: module épistatique  
ENaC: canal sodique épithéliaux  
END: endothelin  
Endrb: endothelin receptor  
ENPEP: glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)  
ET: endothéline  
F1: première génération  
F2 : seconde génération  
FAM208A: Family with sequence similarity 208 member A  
FC: fréquence cardiaque  
FES: gène feline sarcoma oncogene  
FGF5: fibroblast growth factor 5  
Fig: figure  
FIGN: fidgetin  
FLJ32810: gène ARHGAPA42, Rho GTPase activating protein 42  
FMC: Fondation des Maladies du Coeur  
FSH: Follicle-stimulating hormone  
FURIN: paired basic amino acid cleaving enzyme  
h: heure  
H2O: eau  
Gb : gigabase  
GH : genetically hypertensive

Global Bpgen: Global Blood pressure genetics consortium

GMP : guanosine monophosphate

GNAS: gène guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating complex locus

GOSR2: gène golgi SNAP receptor complex member 2

Gm6300: murine solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y<sup>+</sup> system),  
member pseudogene

GRA: Glucocorticoid remediable aldosteronism

GRB14: growth factor receptor-bound protein 14

GUCY1A3: gène guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3

GUCY1B3: gène guanylate cyclase 1, soluble, beta 3

GWAS: Genome-Wide Association Studies

GWS: Genome Wide Scan

h : heure

H<sup>+</sup> : ion hydrogène

HDL: high density lipoprotein

HETE: acide hydroxyeicosatétraénoïque

Hesx1: HESX homeobox 1

HFE: hemochromatosis

HT: hypothalamus

HVG: hypertrophie ventriculaire gauche

ICBP: The International Consortium for Blood Pressure

ICD: insuffisance cardiaque diastolique

Igfbp4 : insulin-like growth factor binding protein 4

Il17rd: interleukine 17 receptor

ISIAH : inherited stress induced arterial hypertensive rat

JAG1: gène jagged 1

JNC: Joint National Committee on the prevention, detection, evaluation and treatment of  
high blood pressure

K<sup>+</sup> : ion potassium  
kb : kilobase  
kg : kilogramme  
KI: Knock in  
KO: Knock out  
LL: génotype homozygote de la souche de rat Lewis  
LEW : rat Lewis  
LD: Linkage disequilibrium  
LDL: Low density lipoprotein  
LH: Luteinizing hormone  
LH: Lyon hypertensive rat  
LN: Lyon normotensive rat  
Loc287569: similar to FLJ34922 protein  
LOD score: cumul des scores  
MAF: Minor allele frequency  
MAP: Mean arterial pressure  
MAP-4: microtubule-associated protein 4  
MAP-K : mitogen-activated protein kinase  
Mb : mégabase  
MCV: maladie cardiovasculaire  
MECOM: MDS1 and EVI1 complex locus  
mg : milligramme  
MHS: Milan hypertensive strain  
mm Hg : millimètre de mercure  
MNS : Milan normotensive rat  
mn: minute  
MOV10: Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)  
MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)

Mtmt4: myotubularin related protein 4  
n: taille de l'échantillon  
NA: noradrénaline  
Na<sup>+</sup> : ion sodium  
NCBI : National Center for Biotechnology Information  
NCC : co-transporteur Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>  
NaCl: chlorure de sodium  
NEDD4L: neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like  
Nf- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B  
NHE3: échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>  
NHLBI : National Heart, Lung, and Blood Institute  
NIH: National Institute of Health  
NKCC2: co-transporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>  
NO: monoxyde d'azote  
NOS : NO synthase  
NOS2: inducible nitric oxide synthase 2  
NOV: gène nephroblastoma overexpressed  
NPR: récepteur des peptides natriurétiques  
NT5C2: 5'-nucleotidase, cytosolic II  
NXP4: neurexophilin 4  
O<sub>2</sub> : oxygène  
OMS: Organisation mondiale de la santé  
OVE26: souche de souris diabétique  
p: probabilité  
PA: pression artérielle  
PAD : pression artérielle diastolique  
PAM : pression artérielle moyenne  
PAS: pression artérielle systolique

pb : paire de base  
PCK : protéine kinase C  
PCR: amplification en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)  
PD : pression différentielle PHR : «Prague hypertensive rat»  
PGE2: prostaglandine E2  
PGI2: Prostaglandine I2, prostacycline  
PHR: Prague hypertensive rat  
PIK3CG: phosphoinositide-3-kinase catalytic, gamma polypeptide  
PLA2: phospholipase A2  
PLCD3: phospholipase C, delta 3  
PLCE1: phospholipase C, epsilon 1  
PLEKHA7: pleckstrin homology domain containing, family A member 7  
PN: peptide natriurétique  
PNR : Prague normotensive rat  
PP: pression pulsée  
PRR11: Proline-rich 11  
PS : pression sanguine  
PTPN11: gène protein tyrosine phosphatase, non receptor type 11  
Q: débit cardiaque  
qRT-PCR: real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction  
QTL: locus à trait quantitatif  
RAP140: retinoblastoma-associated protein 140  
Rb: retinoblastoma tumor suppressor protein  
RCPG: récepteur couplé aux protéines G  
RDH2: retinol dehydrogenase 2  
RGD: Rat Genome Database  
RFLP: restriction fragment length polymorphism  
RI: résistance à l'insuline



ROS: reactive oxygen species, espèce dérivée de l'oxygène  
RPL6: ribosomal protein L6  
RPT: résistance périphérique totale  
SS: génotype homozygote de la souche de rat SS/Jr  
SS/Jr : Dahl salt sensitive rat, DSS  
SGK1: serum and glucocorticoid-regulated kinase 1  
SR/Jr : Dahl salt resistant rat, DSR  
SBH: Doca salt sensitive (Sabra hypertensive) rat  
SBN : «Doca salt resistant (Sabra normotensive) rat»  
sec : seconde  
SH2B3: SH2B adaptor protein 3  
SHR : spontaneously hypertensive rat  
SHRSP: spontaneously hypertensive rat-stroke-prone  
SKK: système kallikréine-kinine  
SLC4A7: solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter member 7  
SLC39A8: solute carrier family 39, (metal ion transporter) member 8  
SLC7A12: solute carrier family 7(cationic amino acid transporter, y+ system), member 12  
SNA : système nerveux autonome  
SNC : système nerveux central  
SNP: Single nucleotide polymorphism  
SNPS: système nerveux parasymphatique  
SNS: système nerveux sympathique  
Sod3: superoxide dismutase extracellular  
SQHA: Société Québécoise d'Hypertension Artérielle  
SRAA: système rénine-angiotensine-aldostérone  
SSR: simple sequence repeat  
STL7:serum triglyceride level QTL 7  
STR: Short tandem repeat

SWI/SNF: SWItch/Sucrose Non-Fermentable  
TAC2: tachykinin 2  
TBX3: T-box 3  
TBX5: T-box 5  
TFG: taux de filtration glomérulaire  
TMEM133: transmembrane protein 133  
TNF: tumor necrosis factor  
TSH: thyroïd stimulating hormone  
TxA2: thromboxane A2  
UCSC: University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics  
ULK3: unc-51-like kinase 3  
ULK4: unc-51-like kinase 4 (c.elegans)  
UTR: untranslated region  
V1A: récepteur 1A de la vasopressine  
V1B: récepteur 1B de la vasopressine  
V2: récepteur 2 de la vasopressine  
VES: volume d'éjection systolique  
WES: Whole Exome Sequencing  
WKY: Winstar Kyoto rat  
WNK4: WNK lysine deficient protein kinase  
WT: wild type  
X: moyenne  
ZNF652: gène zinc finger protein 652

À Perla, Prosper, Maria, Rafael, André et Pierre!

Vous m'avez transmis l'amour , le goût pour la science et la réussite.

Vous me manquez énormément!

# Remerciements

Dr Deng, vous m'avez permis de me développer en tant que chercheuse et d'apporter ma contribution à la science. Votre sens de la rigueur nous aura permis une production importante de résultats scientifiques. Quant à votre humanisme et votre considération pour autrui, ce sont des qualités que je ne pensais pas trouver envers mon mentor. Merci pour m'avoir permis de me réaliser en tant que scientifique au sein de votre laboratoire.

Annie et Julie, inutile de préciser que sans vous le labo ne serait pas ce qu'il est. Grâce à vous nos petits rats sont bien heureux et nous procurent des données d'une importance incontestable. Outre d'excellentes assistantes de recherche, vous êtes des femmes exemplaires. Auprès de vous j'ai appris énormément et ma formation en tant que chercheuse s'est déroulée sur une note plus qu'agréable. Merci pour toutes ces années, merci pour votre patience, votre aide, votre amitié.

Cristina, amiga mía! Contigo aprendi muchísimo al nivel profesional como personal. Eres una persona tan hermosa. Jamas hubiera pensado que hacer un doctorat podia ser tan agradable y eso te lo debo a ti! Gracias por todos esos momentos de alegría, gracias por atender mis emociones y ayudarme a través de la carrera y de mi vida.

Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leur disponibilité et leur suivi assidu!

Merci au programme de Biologie Moléculaire et à la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle pour leur soutien financier ainsi qu'au Fond Québécois de Recherche en Santé pour la bourse de formation doctorale octroyée pendant ces deux dernières années.

Carolina, gracias por ser parte de mi vida! Gracias por ser mi amiga, mi confidente. gracias por motivarme y hacer todo para que mi vida sea fácil!

Beatrice, Stephane, Estelle, Ethan et Erin, merci pour être ma famille d'adoption depuis mon arrivée au Canada! Merci Béa pour ton support et tes commentaires constructifs tout au long de mes études.

Audrey et les Lip, Johanna, merci pour votre entourage et vos encouragements, merci pour partager les meilleurs moments de ma vie!

Ma choupy, tu me connais tellement et notre complicité m'apporte énormément de réconfort, même à distance! Merci d'être mon roc! Mikado, je n'ai pas eu à réaliser d'excitantes trachéotomies de rats, cependant je suis tout de même fière du résultat finalement! Plus qu'une source d'inspiration pour moi, vous êtes mes frères et complices! Merci pour avoir partagé le début de cette nouvelle aventure dans la recherche avec moi! Régine et André, merci pour votre chaleureux accueil, merci de m'avoir soutenu et encouragé au cours de mes études!

Merci à la meilleure des belles familles! Esther, Joseph, Max, Asher, Esther, Nathaniel et Jérémy, merci pour votre soutien et votre aide inestimable!

Maman et Papa, Mike, Elvis et Shirley vous êtes mes piliers, la fondation sur laquelle j'ai pu me réaliser en tant que femme accomplie et professionnelle aussi. Vous êtes mon équilibre, ma force sans lesquels je ne pourrais me réaliser. Merci pour tout! On dit qu'on ne choisit pas sa famille, c'est bien vrai, mais dans mon cas, je ne vous changerais pour rien au monde. Alexia et Rodolphe, vous êtes les meilleurs bofs dont on peut rêver! Angelina, Dan et Aaron, mes neveux adorés, ma joie de vivre! Merci à vous tous!

Jonathan et Kaylee, mon Univers, mon souffle de vie! Merci d'être qui vous êtes et de me combler de bonheur! Jonathan, super papa et mari d'exception, ta patience et tes encouragements, outre la possibilité d'écrire, m'ont fournis la force et le support nécessaire pour exercer mon rôle de maman tout en rédigeant! Merci!

C'est grâce à vous tous que j'ai pu accomplir ce travail!

# But et Plan de la Thèse

À l'heure actuelle, les médicaments anti-hypertenseurs existants ne permettent pas de guérir l'hypertension artérielle mais de la maîtriser, voire de la prévenir, d'où leur utilisation à vie. Cette thèse vise l'approfondissement des connaissances sur la régulation génétique de l'hypertension artérielle essentielle. Le but ultime étant le développement de traitements anti-hypertenseurs ciblant efficacement, soit individuellement la cause de ce fléau mondial.

Jusqu'à présent le dogme de l'additivité, selon lequel un ensemble de gènes, ayant chacun un effet minime sur la variation de la pression artérielle s'accumulerait pour mener au phénotype hypertendu faisait préséance dans les esprits de la communauté scientifique. Or, nous avons démontré, que cette théorie, bien que non entièrement réfutable, n'est pas la seule à régir la régulation des gènes impliqués dans l'hypertension. En effet, l'épistasie, correspondant aux interactions inter-géniques, est à l'origine de l'organisation de ces gènes en voies régulatrices, le tout créant une organisation architecturale génétique complexe. Si le concept épistatique n'est pas nouveau; il a plus de 100 ans, c'est la première fois que des travaux fournissent la preuve fonctionnelle de telles interactions chez le mammifère, au sujet de l'hypertension.

Cette thèse est présentée en huit chapitres. Le premier chapitre définit et fait état des connaissances actuelles sur la pression artérielle et l'hypertension ainsi que du rôle de la génétique dans ce trait multigénique complexe. Le deuxième chapitre dévoile les stratégies génétiques utilisées dans le domaine et décrit également les méthodes utilisées pour répondre à la problématique. Le troisième résume le projet de recherche et le quatrième présente les résultats de nos travaux sous forme de deux publications scientifiques. Le chapitre V est une discussion générale des deux articles précédents. Ce dernier est suivi d'une conclusion générale et de perspectives. Deux annexes principales correspondant à deux autres publications scientifiques pour lesquelles je suis première et co-première auteure ont été ajoutées.

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

# I-1 La Pression Artérielle

## I-1.1 Définition

La « force du sang », fut mesurée pour la première fois par le physiologiste anglais Stephen Hales en 1733 (Lewis O., 1994). Cette force exercée par le sang sur la paroi des vaisseaux, dite pression sanguine, résulte de la contraction régulière du cœur, éjectant le sang dans les artères, alimentant les organes en oxygène et nutriments (Sherwood L., 2015). Nommée plus communément pression artérielle (PA) ou encore tension artérielle, cette dernière résulte du produit entre le débit cardiaque (Q) et la résistance vasculaire périphérique totale (RPT) (Formule de Frank Sterling:  $PA = Q \times RPT$ ). Le débit cardiaque est lui même le produit de la fréquence cardiaque (FC); soit le nombre de contractions ventriculaires par minute, et du volume d'éjection systolique (VES); soit le volume de sang éjecté par le ventricule gauche dans l'aorte lors de chaque contraction cardiaque ( $Q = FC \times VES$ ). Quant à la RPT, celle-ci dépend de la viscosité du sang, de la longueur et du diamètre de l'artère. Plus particulièrement, la résistance périphérique est déterminée au niveau des artérioles dont les parois sont constituées de cellules musculaires lisses permettant la vasoconstriction et vasorelaxation (Beevers G. *et al*, 2001).

La PA est évaluée via deux mesures exprimées en millimètres de mercure (mm Hg).

La première mesure est la pression artérielle systolique (PAS) ou maxima, correspondant à la pression maximale lors de la contraction du muscle cardiaque. La deuxième est la pression artérielle diastolique (PAD) ou minima, représentant la pression minimale lorsque le cœur se relâche et que les ventricules se remplissent. Environ 70 cycles systole/diastole, aussi appelés fréquence cardiaque, se produisent par minute chez un individu au repos (Sherwood L., 2015).

La différence entre PAS et PAD constitue un indicateur du risque d'infarctus, on la nomme pression pulsée (PP) (Benetos, A. *et al*, 1997). Quant à la moyenne entre la PAD et la PAS, aussi appelée pression artérielle moyenne (Mean Arterial Pressure, MAP), elle correspond à la



somme:  $MAP = 2/3(PAD) + 1/3(PAS)$  car la diastole représente les 2/3 du cycle cardiaque contrairement à la systole (1/3). Celle-ci reflète la pression à laquelle chaque vaisseaux sanguins est continuellement soumis (Sesso, H. D. *et al*, 2000). La PA fluctue normalement chez un même individu au cours de la journée, suivant ses activités et émotions. Il existe même un cycle circadien endogène selon lequel la PA diminue la nuit et augmente au cours des activités dans la journée, avec un pic vers 21h (Shea S., 2012). Une PA normale est comprise entre 105/60 mm Hg et 140/90 mm Hg, elle doit être inférieure à 130/80 mm Hg chez les individus diabétiques ou atteints de maladies rénales chroniques. On considère une pression optimale de 120/80 mm Hg. Une PA normale ininterrompue est nécessaire pour irriguer parfaitement tous les organes du corps (Sherwood L., 2015).

Pour cette raison, il est important de faire vérifier sa PA régulièrement avec des appareils de mesures précis.

## **I-1.2 Techniques de mesures**

La mesure de la PA se fait en clinique via un sphygmomanomètre. Ce dernier est constitué d'un brassard qui se gonfle à l'aide d'une poire et d'un manomètre mesurant la PA dans le brassard, en mm Hg. Le praticien gonfle le brassard jusqu'à que la pression dans ce dernier dépasse la PAS, bloquant ainsi la circulation dans l'artère brachiale du bras. Puis, via une valve laissant s'échapper l'air du brassard, la pression diminue jusqu'à permettre à nouveau au sang de circuler dans l'artère; cette valeur correspond à la PAS. La pression du brassard continue alors de diminuer jusqu'à qu'il n'y ait plus d'obstacle à la circulation brachiale même lorsque le coeur est au repos, donnant ainsi la PAD. Le médecin place son stéthoscope au niveau du coude où le pouls est palpable et identifie de cette façon les PAS et PAD. Des tensiomètres permettent aussi de mesurer la PA à domicile (Pickering, T. G. *et al*, 2005, Sherwood L., 2015). La prise de mesure doit suivre certaines directives afin d'être la plus exacte possible, telles qu'être au repos depuis au moins 5 mn, assis confortablement, le bras à hauteur du coeur et ne pas être en situation de stress physique ou émotionnel. Il est

important d'effectuer au moins deux mesures, matin et soir de préférence et sur plusieurs jours afin d'effectuer une moyenne. La mesure ambulatoire de la PA (MAPA) fournit une mesure fiable et précise puisqu'elle est prise sur 24h (Sherwood L., 2015) et permet d'éviter l'effet « blouse blanche » (Fouët X.A., 1999, Pickering, T. G. *et al*, 2005).

## **I-1.3 Mécanismes de régulation physiologique**

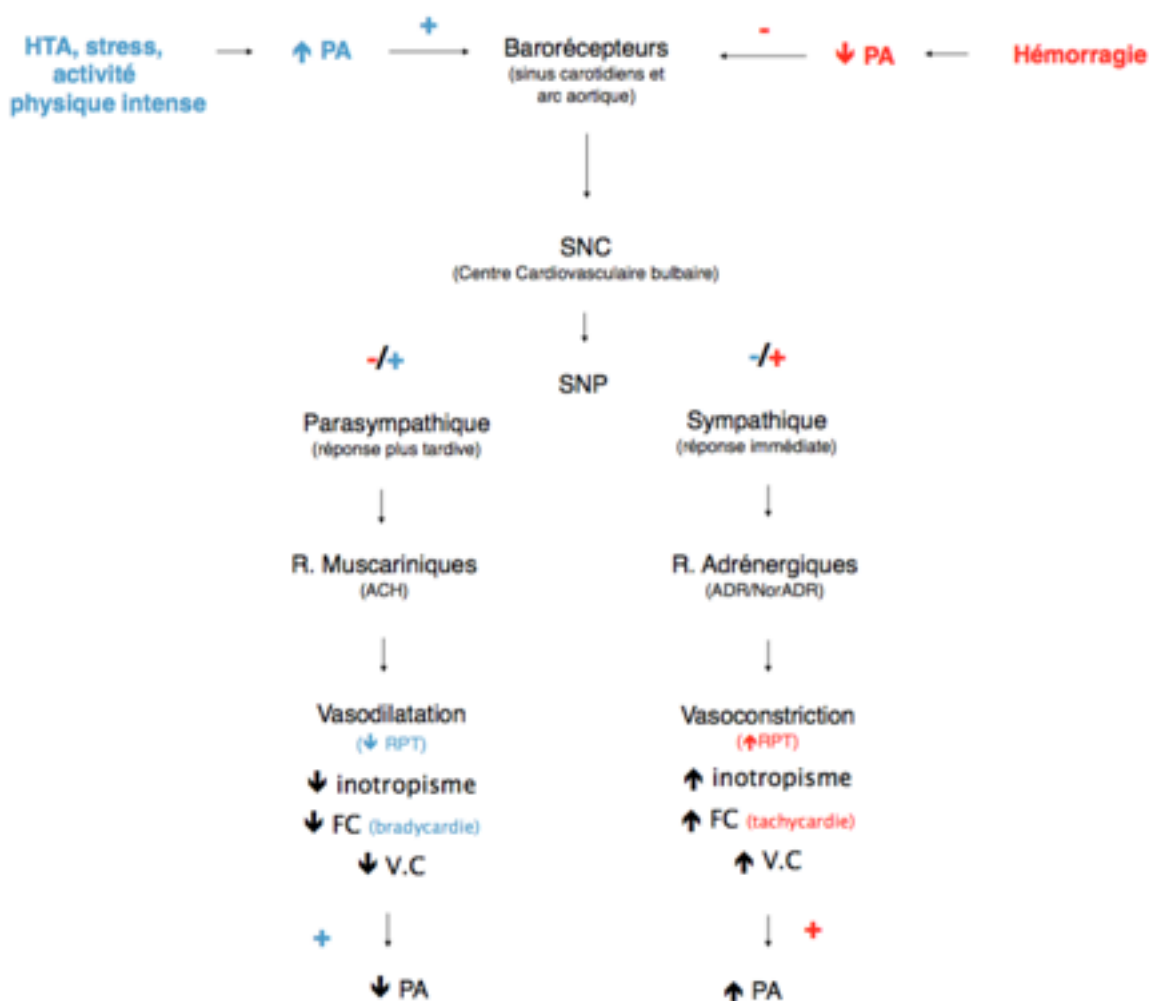
### **I-1.3.1 Régulation nerveuse (le système nerveux sympathique, SNS)**

Certaines situations entraînant une variation de la PA nécessitent une réponse rapide. Entre alors en jeu l'arc baroréflexe passant par le système nerveux autonome (SNA) (Fouët X.A., 1999). Celui-ci aura comme finalité de modifier la fréquence cardiaque (soit le débit), le tonus vasculaire (soit la RPT) et la volémie (volume sanguin). Ce système fait appel à des barorécepteurs situés dans les parois vasculaires de l'arc aortique et du sinus carotidien, qui sont chargés de réguler la PA systémique et cérébrale, respectivement. Il s'agit de senseurs mécaniques qui captent les variations de PA via l'étirement de la paroi (tensorécepteurs) (Guénard H., 2001, Navaneethan S.D., 2008). Les barorécepteurs transmettent le signal au système nerveux central (SNC) via les nerfs de Hering puis glossopharyngien pour ceux du sinus carotidien et via le nerf vague pour ceux venant de l'aorte (Navaneethan S.D., 2008). Le centre cardiovasculaire bulbaire émet alors un message via les nerfs parasympathiques et sympathiques régulant ainsi l'activité cardiaque et le tonus vasculaire artériolaire. Le système nerveux sympathique (SNS) via les récepteurs adrénergiques entraîne une vasoconstriction qui se traduit par une augmentation de la fréquence cardiaque, et de la contractilité myocardique (inotropisme). Il agit immédiatement face aux variations physiologiques (Guénard H., 2001, Navaneethan S.D., 2008).

Le système nerveux parasympathique (SNPS), agit quant à lui moins rapidement et ses actions, opposées à celles du SNS, passent via les récepteurs muscariniques. Plus spécifiquement, dans les conditions de PA optimale, le baroréflexe engendre une inhibition du

SNS, régulant ainsi la PA. En revanche, lorsque la PA diminue, en cas d'hémorragie par exemple (Guénard H., 2001), il y a alors diminution du nombre de barorécepteurs actifs, menant à une activation du SNS et une inhibition du SNPS.

Le SNS produit une tachycardie et stimule l'inotropisme faisant augmenter la fréquence cardiaque, qui, combinée avec l'augmentation de la RPT, via vasoconstriction, mène à l'élévation de la PA (Mullins L.J., 2006). Lors d'une augmentation de la PA, les barorécepteurs génèrent une bradycardie (diminution du rythme cardiaque) vagale. Ce réflexe est réalisé par le SNPS et via l'inhibition du SNS. La boucle de rétrocontrôle négatif est alors complétée (Guénard H., 2001, Navaneethan S.D., 2008) (**Figure 1**).



**Figure 1: Schéma de la régulation neuronale à court terme: le baroréflexe**

Des études ont montré que le SNS n'était pas uniquement responsable de la régulation de la PA à court terme, mais qu'il jouerait également un rôle dans la régulation à long terme, en agissant au niveau rénal (Navaneethan S.D., 2008, Chapleau M.W., 2001).

En effet, lorsque la PA diminue, l'information est transmise à l'hypothalamus qui répond par une augmentation de la synthèse en hormone antidiurétique (ADH), nommée aussi vasopressine. Celle-ci, via sa liaison à ses récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) AVPR1 sur les cellules musculaires lisses, entraîne la vasoconstriction des artères. Au niveau des reins, l'ADH se lie aux AVPR2, où elle exécute son rôle antidiurétique en augmentant la perméabilité du tube collecteur et ainsi la réabsorption du Na<sup>+</sup> et donc, par osmolarité, de l'eau. Sous l'action de l'ADH, la PA augmente en réponse à la vasoconstriction et l'augmentation de la volémie (Lifton R.P. *et al*, 2001) (**Figure 2**).

Suite à un stress ou une activité physique intense (Beevers G. *et al*, 2001), la PA s'élève. Afin de contrôler cette dernière, les neurones du SNS induisent la sécrétion de cathécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) par les neurones et la médullo-surrénale. La noradrénaline métabolisée en adrénaline, va se lier aux récepteurs adrénergiques qui, dépendant leur localisation pré ou post-synaptique, mèneront à la vasodilatation ou la vasoconstriction, respectivement.

D'autres récepteurs situés dans les oreillettes et ventricules, face à une diminution de la PA, entraînent une tachycardie (augmentation du rythme cardiaque) via l'inhibition du SNPS, stimulant la sécrétion du peptide natriurétique auriculaire (ANP) et inhibant la libération de vasopressine (Chopra S. *et al*, 2011). Tout ceci engendrant l'élévation de la PA.

La sur-stimulation du SNS augmente la PA, menant à une pression pulsée élevée, même au repos, caractéristique d'une hypertension artérielle (HTA). Chez certains patients hypertendus, on observe aussi un taux anormalement élevé de cathécholamines plasmatiques au repos (Mannelli M. *et al*, 1990).

## **I-1.3.2 Régulation hormonale**

### **I-1.3.2.1 Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)**

Les reins constituent les organes clés de l'homéostasie de la PA à long terme. En effet, des transplantations de reins normotendus chez des sujets atteints d'HTA sévère ont montré une diminution considérable de leur PA, avec exhibition d'un profil normotendu, similaire à celui du donneur et de sa famille, la situation réciproque existant aussi (Mullins L.J., 2006). De plus, toutes les formes monogéniques d'HTA essentielle touchent la réabsorption du sodium par les reins (Krzyszinski J-M. *et al*, 2012).

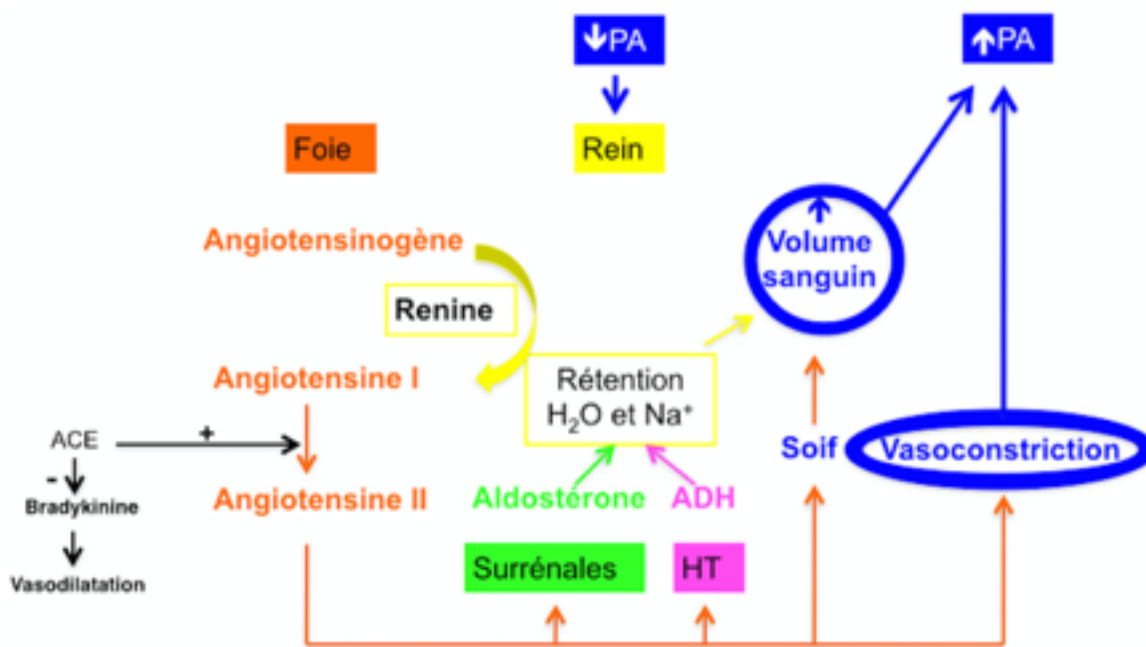
La rénine est une aspartyl protéase premièrement synthétisée sous forme d'un précurseur inactif: la prorénine, au niveau des cellules juxtaglomérulaires qui entourent les artérioles rénales. La rénine est sécrétée en réponse à une baisse de la natrémie (concentration sanguine en Na<sup>+</sup>) par exemple, via stimulation du SNS par des barorécepteurs et/ou des osmorécepteurs (capteurs des variations chimiques du sang) (Persson P.B., 2003, Lote, C., 2012). Celle-ci est responsable de transformer l'angiotensinogène (une grande protéine de 450 acides aminés localisée dans les alpha-2 globulines plasmatiques, synthétisée dans le foie) en un décapeptide: l'angiotensine I (ANG I) (Chopra S. *et al*, 2011, Lote, C., 2012).

L'ANG I a des propriétés vasoconstrictrices mais qui restent modestes face à celles de l'angiotensine II (ANG II), produite sous l'action de l'enzyme qui convertit l'angiotensine (ECA). L'ECA est une dipeptidylcarboxypeptidase située dans les cellules endothéliales, qui en plus de sa fonction de transformer l'ANG I en ANG II via retraitement du complexe histidyl-leucine, est aussi responsable d'inactiver la bradykinine qui est un puissant vasodilatateur (Beavers G. *et al*, 2001). La conversion de l'ANG se fait principalement dans les poumons mais aussi dans d'autres organes tels que les reins et le coeur (ECA somatique) et dans les testicules (ECA germinale). Il existe également une autre enzyme qui exerce la même fonction que l'ECA: la chymase. Cette dernière jouerait un rôle primordial chez les hypertendus diabétiques (Lorenz J.L., 2010).

L'ANG II exerce son action vasoconstrictrice artériolaire et ainsi augmente la PA via son interaction avec les récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG): AT1 (dans

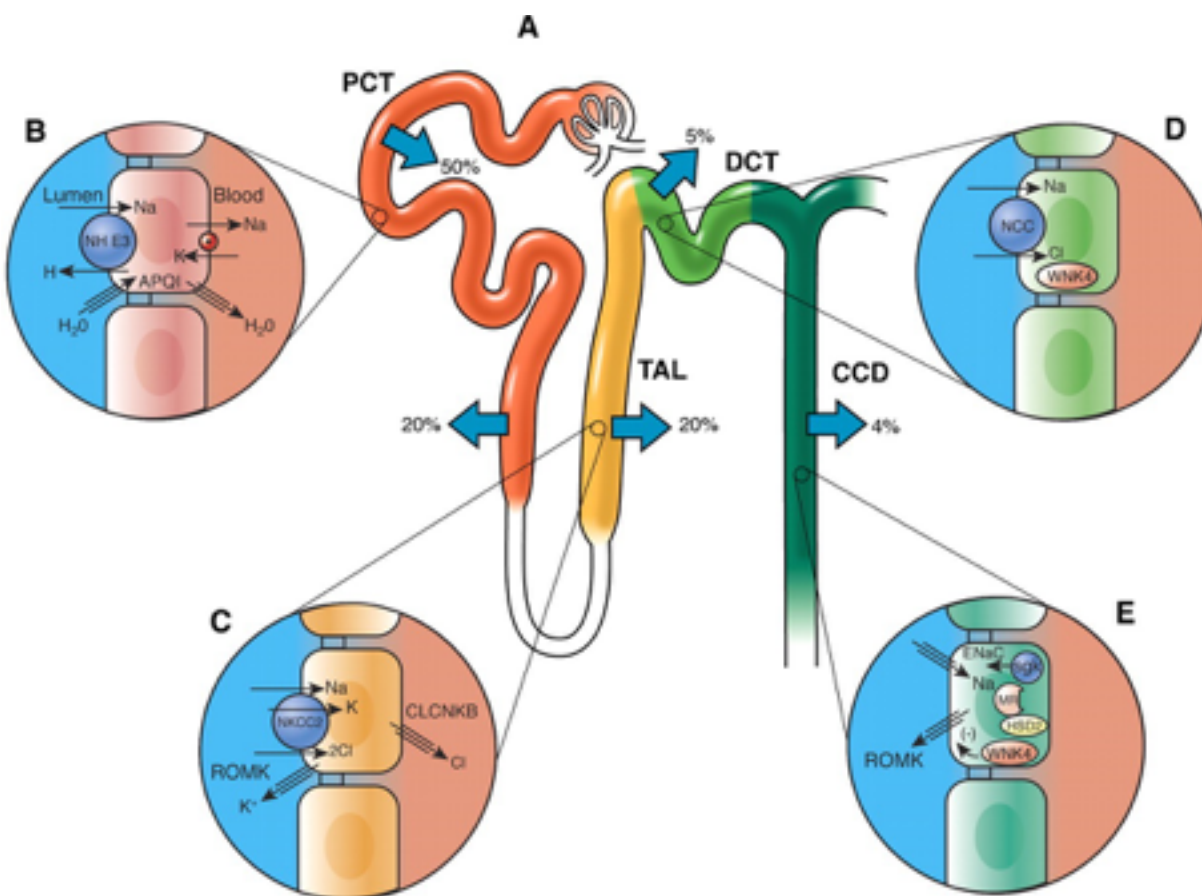
les artérioles) et AT2 (dans le cortex surrénalien) (Beever G. *et al*, 2001, Chopra S. *et al*, 2011). AT1 stimule la vasoconstriction, la croissance, la prolifération cellulaire et inhibe la natriurèse et la diurèse alors que AT2 exerce des effets inverses (Beever G. *et al*, 2001).

L'aldostérone, quant à elle, est une hormone stéroïde produite principalement dans le cortex surrénalien sous stimulation par l'ANG II (Beever G. *et al*, 2001). Celle-ci est responsable de la réabsorption d'eau et de sodium (Na<sup>+</sup>) et de l'excrétion du potassium (K<sup>+</sup>) par les reins, plus particulièrement au niveau du tubule contourné proximal mais aussi de l'hanse de Henlé et du tube collecteur (**Figure 3**). Il s'agit d'une hormone lipophile qui traverse les cellules épithéliales tubulaires pour aller se fixer sur un récepteur lui permettant de passer la membrane nucléaire et ainsi agir sur la transcription de différents ARNm codant pour des protéines nécessaires au transport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> à travers les cellules (Carey R.M. *et al*, 2003, Chopra S. *et al*, 2011). L'ANG II stimule également la sécrétion de l'ADH par l'hypothalamus (HT). Combinées avec l'ANG II, l'aldostérone et l'ADH accentuent l'augmentation de la PA (Beever G. *et al*, 2001, Lote, C., 2012). L'HTA due aux maladies rénales et au vieillissement est souvent issue de mécanismes rénine et volo-dépendants (Lote, C., 2012) (**Figure 2**).



**Figure 2: Schéma de la régulation hormonale à long terme via le SRAA**

Via le SNA et le SRAA, la natrémie (et donc la natriurèse) est régulée. Afin de permettre le passage des ions  $\text{Na}^+$  et ainsi d'eau à travers la membrane épithéliale rénale, des pompes ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE3), des co-transporteurs  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (NCC),  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (NKCC2) et des canaux ioniques (ENaC, ROMK) et aquaporines (APQ1) entrent en jeu (Mullins L.J. *et al*, 2006) (**Figure 3**).



**Figure 3: La natriurèse** (extrait de Mullins L.J. *et al*, 2006)

A: pourcentage de la reabsorption de sodium le long du néphron. Les principaux mécanismes de réabsorption sodique sont montrés dans le tubule proximal (B), la branche ascendante épaisse de la hanse de Henlé (C), le tubule contourné distal (D), et le tube collecteur (E).

Lorsque l'équilibre natriurétique est altéré, le défaut de l'élimination sodique qui en résulte entraîne une augmentation du volume sanguin et ainsi une augmentation de la PA (Benetos, A. *et al*, 1997, Fouët X.A., 1999).

Ce déséquilibre provient d'une inhibition des pompes sodium-potassium  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases ou d'une augmentation de la perméabilité au sodium. En conséquence, le taux de  $\text{Na}^+$  intracellulaire augmente s'accompagnant d'une augmentation du taux de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLs) engendrant l'hypertonie vasculaire. Cette vasoconstriction menant à l'augmentation de la RPT et ainsi à l'HTA (Fouët X.A., 1999).

### **I-1.3.2.2 Les facteurs endothéliaux**

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène produite suite à la contrainte de cisaillement induite par le flux sanguin au niveau des cellules endothéliales de la paroi vasculaire. Celui-ci est synthétisé via l'action des NO synthases (dont les eNOS vasculaires) sur la L-arginine. Plusieurs agonistes du NO permettent d'activer la eNOS. Parmi ceux-ci, la bradykinine (BK), l'acétylcholine (ACH), l'adénosine di et tri-phosphate (ADP, ATP), la substance P et la thrombine. L'activation de la eNOS va entraîner la diminution de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les CMLs via la voie de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) (Sandoo A. *et al*, 2010, Deanfield J.E. *et al*, 2007). Le NO induit ainsi la vasodilatation des CMLs, il exerce également des actions anti-proliférative et anti-thrombotique, inhibe l'adhésion leucocytaire et agit sur la contraction cardiaque (Beever G. *et al*, 2001, Chopra S. *et al*, 2011) (**Figure 4**).

Les cellules endothéliales produisent également de l'endothéline (ET), un puissant agent vasoconstricteur, responsable d'une hausse de la PA sodium-dépendante. On dénombre trois différentes ETs: ET-1, ET-2 et ET-3, dont seule ET-1 est produite au niveau endothélial, ainsi que deux types de récepteurs aux ETs: ETa et ETb (ETb1 sur les cellules endothéliales et ETb2 sur les CMLs). La production d'ET-1 est stimulée par l'ANG II, les catécholamines, les facteurs de croissance, l'hypoxie, l'insuline, les LDLs, HDLs, la contrainte de cisaillement, la



thrombine, les interleukines et le TNF-alpha. En revanche, le NO, l'ANP, les prostaglandines E2 et I2 (PGE2, PGI2) inhibent sa sécrétion (Beevers G. *et al*, 2001).

L'activation de ETb1 est responsable de la diminution de l'activité du SNS et de la vasorelaxation via la libération de NO et de PGI2, menant à une baisse de la PA. Au contraire, ETa et ETb2 stimulent le SNS, la sécrétion des catécholamines engendrant une hausse de la rétention sodique et la vasoconstriction donc la hausse de la PA. Cette régulation du tonus vasculaire se fait également de façon Ca<sup>2+</sup>-dépendante (Chopra S. *et al*, 2011, Sandoo A. *et al*, 2010) (**Figure 4**).

L'EDHF (Endothelium-derived hyperpolarising factor) est un vasodilatateur qui n'a pas encore été bien identifié. Son action passe par l'hyperpolarisation de la membrane plasmique des CMLs de façon NO-indépendante. Il serait activé par la bradykinine et l'acétylcholine. L'EDHF viendrait compléter le travail du NO et de la PGI2 (Sandoo S. *et al*, 2010, Deanfield J. E. *et al*, 2007) (**Figure 4**).

#### **I-1.3.2.3 D'autres hormones**

Les peptides natriurétiques (PNs) sont quant à eux produits en réponse à une augmentation du volume sanguin (Beevers G. *et al*, 2001). Parmi ceux-ci: ANP synthétisé principalement dans les oreillettes cardiaques, BNP dans les ventricules et CNP sécrété par l'endothélium vasculaire. Ils ont pour rôle d'induire un effet diurétique en stimulant l'excrétion d'eau et de Na<sup>+</sup> par les reins. En se liant à leurs récepteurs; NPR-A (pour ANP et BNP) et NPR-B (pour CNP), ils inhibent le SRAA et le SNS générant la bradycardie et la baisse de la PA. Ils jouent un rôle dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. L'ANP induit également une vasodilatation endothélium-indépendante dans les artères. Les PNs ont des effets anti-inflammatoires et anti-fibrotiques (Beevers G. *et al*, 2001, Chopra S. *et al*, 2011).

La guanyline et l'uroguanyline sont aussi des hormones natriurétiques venant compléter les effets des PNs (Chopra S. *et al*, 2011).

La vasopressine, ou hormone anti-diurétique (ADH): synthétisée par l'hypothalamus interagit avec ses RCPG: V1A, V1B et V2 pour augmenter la rétention d'eau par les reins. Sa sécrétion est stimulée par la hausse de la pression osmotique plasmatique, la baisse du volume extra-cellulaire, la douleur, l'émotion, la nausée, les vomissements et inhibée par la baisse de la pression osmotique, la hausse du volume extra-cellulaire et l'alcool (Chopra S. *et al*, 2011).

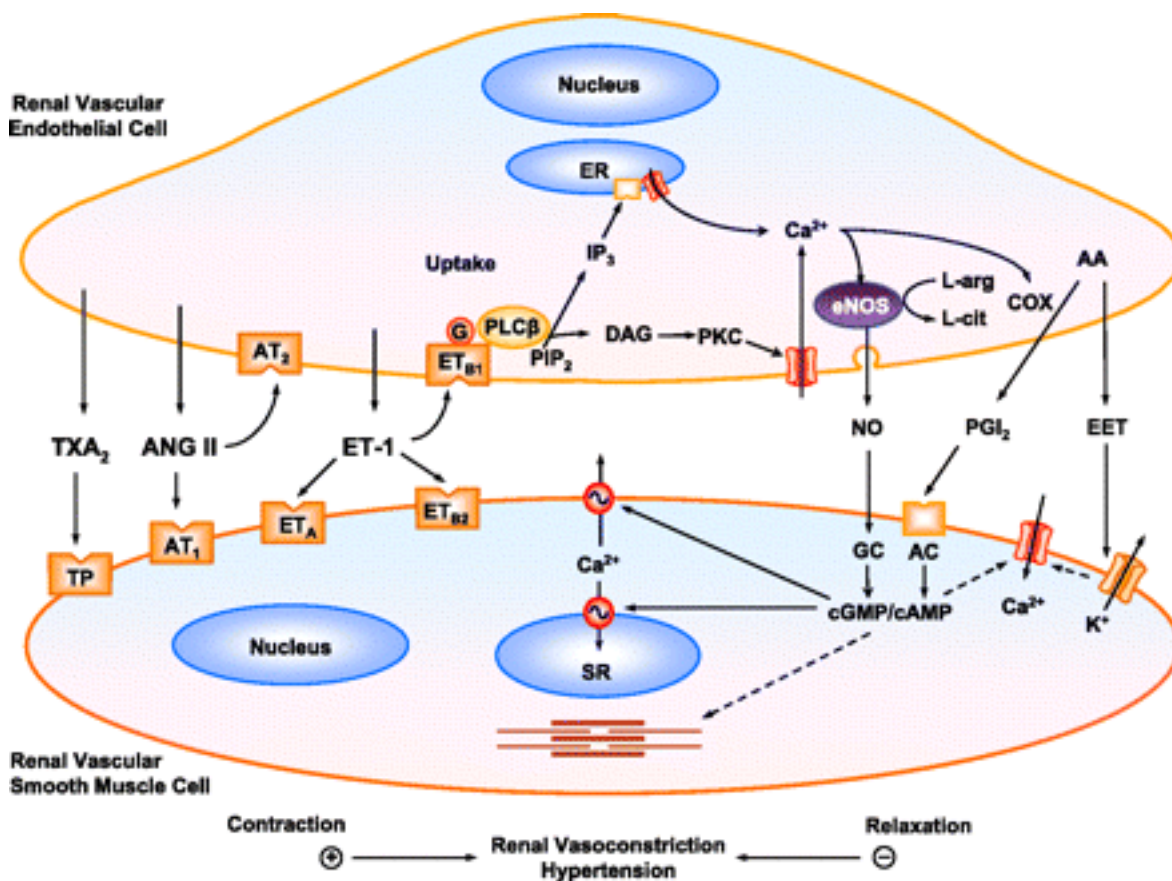
Via le système Kallikréine-Kinine (SKK), le peptide vasoactif: la kinine, permet la contraction des muscles lisses viscéraux et la relaxation des muscles lisses vasculaires par l'intermédiaire du NO, menant à une diminution de la PA. La bradykinine est un vasodilatateur puissant pouvant être inhibé par les ECAs (Chopra S. *et al*, 2011).

La dopamine est un neurotransmetteur qui agit au niveau des reins en régulant le transport sodique et ainsi le volume extra-cellulaire et la PA. Celle-ci agit via des RCPGs au niveau des tubules proximaux en inhibant les canaux sodiques NHE3 et la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase induisant ainsi la natriurèse (Mullins L.J *et al*, 2006, Jose P.A. *et al*, 2003).

Le métabolisme de l'acide arachidonique (AA) par les cytochromes P450 (CYP) permet de réguler entre autre le tonus vasculaire (Flemming I., 2002). L'endothéline-1 et l'ANG II stimulent la libération de la phospholipase A2 (PLA2) qui libère l'AA de la membrane plasmique. C'est alors que trois groupes d'enzymes entrent en jeu. Parmi celles-ci, les enzymes CYP, dont les époxygénases qui métabolisent l'AA en époxydes (EETs) qui seront transformés en métabolites vasodilatateurs (PGI2) et vasoconstricteurs (TxA2) sous l'action des enzymes cyclooxygénases (COX-2 et 1, respectivement), au niveau de l'endothélium vasculaire. PGI2 (Prostaglandine I2) vient compléter la vasorelaxation des artères cérébrales, rénales et coronaires, induite par le NO. Elle a une action cardioprotectrice dans les cardiomyocytes lors de l'ischémie cardiaque et régule le tonus vasculaire via l'activité des canaux calciques voltage-dépendant (Ca<sup>2+</sup> VOC-L) et potassiques menant à

l'hyperpolarisation membranaire et donc à la vasorelaxation. TxA<sub>2</sub> (Thromboxane A<sub>2</sub>) est responsable de l'agrégation plaquettaire et de la vasoconstriction. L'équilibre entre PGI<sub>2</sub> et TxA<sub>2</sub> permet de maintenir un tonus vasculaire optimal (Elbekai R.H., 2006).

En contrepartie, sous l'action des CYP oméga-hydroxylases, l'acide vasoconstricteur 20-hydroxyeicosatetraénoïque (20-HETE) est produit dans les cellules musculaires lisses. Ce dernier joue un rôle dans l'augmentation de la PA via dépolarisation de la membrane plasmique Ca<sup>2+</sup> VOC-L-dépendante (Flemming I., 2002, Elbekai R.H. *et al*, 2006, Xiao Y.F. *et al*, 1998, Sandoo S., *et al*, 2010) (**Figure 4**).



**Figure 4:** La communication entre cellules endothéliales et cellules vasculaires musculaires lisses (extraite de Ponnuchamy, B. *et al*, 2009).

La **figure 4** montre que dans les cellules endothéliales vasculaires rénales, le  $\text{Ca}^{2+}$  est libéré par le réticulum endoplasmique (ER) entraînant ainsi l'augmentation de l'activité de la NO synthase (eNOS) et donc la production de NO qui va se diffuser dans les cellules musculaires lisses vasculaires rénales (VSMC) où il va activer la guanylate cyclase (GC) et augmenter le taux de cGMP. cGMP cause la relaxation des VSMCs via inhibition de l'influx calcique et en stimulant l'excrétion du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'activation des cyclooxygénases (COX) augmente la production de PGI<sub>2</sub> qui active l'adénylate cyclase (AC) et augmente le taux de cAMP dans les VSMC menant à la relaxation. La libération d'EDHF et d'EETs par les cellules endothéliales active les canaux  $\text{K}^+$  et mène à l'hyperpolarisation des VSMCs et inhibe l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'endothélium libère aussi l'ET-1, l'ANG-II et la TxA<sub>2</sub>, agissant sur leurs récepteurs spécifiques situés au niveau des VSMCs régulant le tonus vasculaire. PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, DAG: Diacylglycérol, TP: thromboxane-prostanoïde, SR: réticulum sarcoplasmique PLCb: Phospholipase C

L'adrénomedulline (dans les glandes surrénales), la substance P (intestin, SNC et périphérique) et le peptide lié au gène de la calcitonine (système nerveux et cardiovasculaire) sont tous trois des peptides vasodilatateurs dont les taux sont augmentés chez les patients hypertendus (Chopra S. *et al*, 2011).

La phosducine jouerait un rôle dans l'hypertension stress-dépendante.

Les adipokines sécrétées par le tissu adipeux peuvent être vasodilatatrices (leptine, adiponectine, omentine, visfatin) et vasoconstrictives (TNF-alpha) (Chopra S. *et al*, 2011).

La leptine hormone clé de l'obésité, est par conséquent aussi reliée aux maladies cardiovasculaires. Elle jouerait un rôle dans l'homéostasie de la PA (Chopra S. *et al*, 2011).

## I-2 L'Hypertension Artérielle

### I-2.1 Définition

Lorsque la PA demeure élevée en tout temps, soit lorsqu'elle est supérieure à 140/90 mm Hg ou supérieure à 130/80 mm Hg chez les patients diabétiques ou atteints d'une maladie rénale chronique, on parle alors d'hypertension artérielle (HTA). Une pression trop haute, à long terme, mènera à des dommages vasculaires entraînant le développement de maladies cardiovasculaires fatales (Lifton R. *et al*, 2001). En effet, une pression sanguine élevée forcera le muscle cardiaque à pomper plus de sang. Ainsi, un infarctus du myocarde peut se déclarer, de même qu'une augmentation du volume cardiaque menant à une insuffisance cardiaque. L'apparition d'accidents vasculaires cérébraux (AVC): des anévrismes, des caillots sanguins ainsi que des hémorragies cérébrales peuvent s'observer. De même, une insuffisance rénale, une cécité, un dysfonctionnement cognitif peuvent survenir suite à l'HTA (OMS, 2013). De nombreux facteurs participent au développement de l'HTA et ses complications. Parmi ceux-ci, les premiers à prendre en considération sont les facteurs sociaux-économiques responsables de faire apparaître des facteurs de risques comportementaux. Ces derniers, ajoutés aux facteurs génétiques peuvent générer des facteurs de risques métaboliques menant aux maladies cardiovasculaires (OMS, 2013). L'HTA est une maladie qui ne s'accompagne pas forcément de symptômes, d'où sa dénomination de « tueur silencieux » (*Hypertension Canada*, 2015, OMS, 2013). Cependant, des maux de tête, des nausées et vomissements, de la fatigue, un essoufflement peuvent représenter des indices d'HTA (OMS, 2013). Une élévation de la pression de 20/10 mm Hg à partir d'une tension de 115/75 mm Hg double l'incidence de morbidité par maladie cardiovasculaire. De même, lorsque la PAD augmente de 5 mm Hg, le risque d'AVC et d'accident coronarien est augmenté de 40% et 25% respectivement (Rousseau G, 2008) . C'est pour cela qu'il est essentiel de faire vérifier sa PA régulièrement.

Le diagnostic d'HTA se fait via la mesure de la PA par sphygmomanomètre mais aussi via l'historique familial et social du patient. Un examen physique complet et des tests sanguins

(créatinine, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, glycémie à jeûn, profile lipidique, TSH (hormone thyroïdienne)), urinaires (ratio albumine/créatinine) et échocardiographiques (ECG) permettent de tracer une étiologie possible et des complications cardiovasculaires associées (Lote C., 2012).

Le *Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (JNC) distingue trois catégories d'HTA: La pré-hypertension ( 120<PAS<139 et 80 <PAD<89 mm Hg), l'HTA de stade I (140<PAS<159 et 90 <PAD<99 mm Hg) et l'HTA de stade II (PAS ≥ 160 et PAD ≥ 100 mm Hg) (Sandberg K., 2012).

On distingue deux types d'HTA: l'hypertension secondaire qui représente 5% des patients atteints et l'hypertension essentielle ou primaire correspondant à 95% des cas d'hypertendus.

## **I-2.2 Deux types d'hypertension artérielle**

### **I-2.2.1 Hypertension secondaire**

L'hypertension, dans certains cas plutôt rares, peut être secondaire à certaines maladies. Il peut s'agir de maladies rénales, surrénaliennes, ou encore d'origine toxique (Fouët X.A., 1999).

#### **I-2.2.1.1 Étiologie rénale**

Au niveau rénal, un déficit de l'élimination du Na<sup>+</sup> par les reins ou encore une hyperactivité du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone mènent à l'HTA. Ces mécanismes sont à l'origine des atteintes du parenchyme rénal (Fouët X.A., 1999). Celles-ci sont variées et mènent souvent à l'insuffisance rénale: glomérulonéphrite (atteinte souvent inflammatoire du glomérule) ou pyélonéphrite chronique (infection et inflammation bactérienne), maladie rénale polycystique, désordres du tissu conjonctif, uropathie obstructive, hyperaldostéronisme secondaire responsable de la vasoconstriction (Fondation canadienne du rein, 2004, Benetos,

A. *et al*, 1997). Certaines néphropathies peuvent être unilatérales dont l'atrophie rénale, l'hydronéphrose (hypertrophie des calices et du bassinet), l'hématome périrénal.

L'HTA rénovasculaire passe quant à elle par une sténose de l'artère rénale menant à l'activation du SRAA. La sténose peut découler d'une athérosclérose de l'artère rénale ou encore d'anomalies fibro-musculaire (Fouët X.A., 1999).

#### **I-2.2.1.2 Étiologie surrénalienne**

L'hyperaldostéronisme primaire se présente sous plusieurs formes parmi lesquelles l'adénome de Conn, au niveau corticosurrénal, curable, s'accompagnant d'hypokaliémie. On citera également l'hyperplasie surrénalienne congénitale pouvant s'accompagner d'adénomes, non curable. Le syndrome de Cushing souvent caractérisé par un carcinome surrénalien ou une sécrétion ectopique de l'hormone adrénocorticotrophine (ACTH).

Les traitements aux corticostéroïdes ou des défauts de la stéroïdogénèse et la consommation excessive de réglisse sont également en cause dans l'hyperaldostéronisme primaire et ainsi dans l'HTA (Fouët X.A., 1999).

Le phéochromocytome est une tumeur médullo-surrénalienne assez rare, sécrétant des catécholamines (adrénaline, noradrénaline), (Fouët X.A., 1999).

#### **I-2.2.1.3 L'apnée du sommeil**

Il s'agit d'une interruption intermittente de la respiration pendant le sommeil qui peut s'accompagner d'une obstruction des voies respiratoires supérieures. Une hypersensibilité des chémorécepteurs mène à une suractivation du système nerveux sympathique engendrant une vasoconstriction, qui combinée avec une surproduction de l'ion superoxyde et de ses effets inflammatoires sur la RPT peut mener à l'HTA (Dempsey J.A., 2010).

#### **I-2.2.1.4 L'hypertension gravidique**

La grossesse est une condition pouvant développer de l'HTA chez les femmes normotendues. On la qualifie d'HTA gravidique ou alors de pré-éclampsie lorsqu'elle s'accompagne de protéinurie, avec, dans ce cas, un risque important de complications foetales (Fouët X.A., 1999).

#### **I-2.2.1.5 Étiologie toxique et autre**

Certains médicaments peuvent induire l'hypertension. C'est le cas des sympathomimétiques, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des corticostéroïdes. On citera également l'érythropoïétine (patients hémodialysés) et la cyclosporine (patients transplantés) (Fouët X.A., 1999). L'utilisation de contraceptifs oraux (oestroprogestatifs) et de vasoconstricteurs nasaux sont aussi des sources d'HTA. Une consommation excessive d'alcool est aussi en cause dans cette maladie. La cocaïne et la réglisse (effet anti-diurétique) font également augmenter la PA (Backris G, 2014, Xavier André-Fouët, 1999).

D'autres situations telles que la coarctation de l'aorte (sténose de l'isthme aortique) (Sohn, V. *et al*, 2007), l'hyperthyroïdie (Grzegorzewski Y., 2000), le myxoedème (oedème du visage et des membres dû à une hypothyroïdie) (Berris B. *et al*, 1965), et l'athérosclérose (Sherwood L., 2006) peuvent constituer des sources d'HTA.

Une autre condition, rare, est celle de l'HTA maligne qui peut s'avérer fatale. Cette dernière s'observe dans les cas de transplantation rénale, de prise inadéquate d'oestroprogestatifs contraceptifs ou en cas d'absence de traitement de l'HTA et est associée à un fond de l'oeil (FO) de stade III ou IV. Il est important de rechercher des causes secondaires suite à ce type d'HTA puisqu'elle est souvent associée à des atteintes viscérales (Modelliar S. *et al*, 2003).



### **I-2.2.2 Hypertension primaire ou essentielle**

L'HTA dite primaire, ou essentielle représente la majorité (95%) des cas d'hypertension. D'origine inconnue, on l'attribue à des facteurs génétiques et environnementaux. Certains facteurs tels qu'une diète riche en sel, l'obésité, le stress ne sont liés à l'HTA chez les jeunes sujets que lorsqu'ils possèdent un terrain génétique propice au développement de la maladie (Backris G, 2014).

#### **I-2.2.2.1 Facteurs démographiques**

L'âge et le sexe, sont des facteurs déterminant dans cette maladie sur lesquels on ne peut malheureusement pas agir. En effet, chez les moins de 50-65 ans, la prévalence de l'HTA est plus importante chez les hommes que les femmes, et ceci indifféremment de l'origine ethnique. Cependant, cette tendance s'inverse après 65 ans chez les individus d'origine caucasienne et après 50 ans chez les afro-américains. Cette différence ethnique pourrait être corrélée avec la longévité qui est de 6,4 ans plus courte chez les afro-américains, ou encore avec la prévalence de l'obésité qui est beaucoup plus élevée chez cette population (Fouët X-A., 1999, Sandberg K, 2012).

#### **I-2.2.2.2 Facteurs environnementaux**

Certains facteurs de risque de l'HTA peuvent être réversibles ou du moins contrôlés, comme une mauvaise alimentation, l'obésité, une consommation excessive de sel, l'abus d'alcool, le tabagisme, la sédentarité, le stress, le diabète, les maladies rénales (Krzyszinski J-M. *et al*, 2012).

Selon le programme éducatif canadien sur l'hypertension (PECH), il est recommandé de pratiquer un exercice physique d'intensité modéré (marcher, courir, faire du vélo, nager, *etc.*) pendant au moins 30 à 60 mn quatre à sept jours par semaine. L'activité physique a pour

conséquence de réduire la RPT permettant ainsi au sang de circuler de façon plus fluide et plus rapidement. La production de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales ainsi stimulées s'accroît permettant la vasorelaxation et donc la diminution de la PA. L'exercice régulier permet le stockage de NO sous forme de nitrites, dans le coeur et les vaisseaux sanguins pouvant rapidement être re-transformé en NO, conférant la cardioprotection de ces organes. Un arrêt de pratique physique de un mois va entraîner l'épuisement de cette réserve protectrice et ainsi la hausse de la PA (Bondonno C.P, 2012, Higashi, Y, 1999). L'activité physique s'accompagne aussi naturellement d'une perte de poids et de la masse grasse, d'une diminution du taux de cholestérol LDL et de la résistance à l'insuline. Il a été démontré par des méta-analyses que même une activité d'intensité légère peut rejoindre les effets d'une monothérapie antihypertensive et faire diminuer la PA de 2,5/1,5 mm Hg chez les normotendus versus 7 à 5 mm Hg chez les patients hypertendus (Krzyszinski J-M. *et al*, 2012).

La gestion du stress via des techniques de relaxation, de restructuration cognitive, et d'amélioration de la communication, pour certaines personnes s'avère importante pour maintenir une PA normale. Une situation de stress entraîne la production d'adrénaline et de cortisol menant à la vasoconstriction et l'augmentation de la fréquence cardiaque et ainsi de la PA (Bacon L.S. *et al*, 2014, Hypertension Canada, 2010).

La plupart des individus ont une PA sensible au Na<sup>+</sup>. Il est à noter que dépendamment de l'origine ethnique, cette sensibilité varie. En effet, 72% des afro-américains ont une HTA sodium-dépendante contre 56% des descendants de caucasiens (Sandberg K., 2012)

Chez les individus hypertendus sensibles au Na<sup>+</sup>, une diminution de l'apport en sel contribue à rétablir le cycle circadien de la PA (Damasceno A., 2000).

L'OMS recommande de limiter sa consommation en sel à 5 g/jour, soit 2 000 mg de sodium (attention aux aliments transformés) et de consommer du potassium, contenu dans les fruits et

légumes verts, contribuant à faire diminuer la PA (OMS, 2013). Les légumes verts et le chocolat représentent aussi des sources de NO (Bondonno C.P., 2012, Higashi Y., 1999).

Chez la femme enceinte, une diète hyperprotéinée ou un défaut de l'hémodynamique placentaire peuvent mener à l'hypotrophie du nouveau-né. Ce faible poids à la naissance est à associer avec un nombre réduit de glomérules et donc le développement de l'hypertrophie rénale compensatrice et de la glomérulosclérose, la sensibilité au  $\text{Na}^+$  et ainsi le développement de l'HTA (Mullins L.J. *et al*, 2006, Krzesinski J-M. *et al*, 2012).

### **I-2.2.2.3 Facteurs métaboliques**

L'HTA est aussi associée à une glycémie élevée. D'où il serait logique que celle-ci soit en cause dans le diabète, notamment de type II (Sandberg K., 2012).

En effets les 2/3 des patients diabétiques de type II présentent aussi de l'HTA, et ainsi un risque accru de développer des MCVs. Chez ces individus, l'évolution de la PA suit le même schéma que celle de l'hyperglycémie. Le sexe, l'historique familial, l'âge, et l'indice de masse corporelle sont des facteurs de risques pour l'HTA d'autant plus chez les diabétiques. Le diabète de type II se caractérise par une résistance à l'insuline (RI). Or, dans les conditions optimales, l'insuline, via stimulation de la NO synthase (NOS) dans les cellules endothéliales, mène à une production de NO et stimule la synthèse d'acétylcholine, générant la vasodilatation. Ainsi, la RI et la déficience endothéliale sont des facteurs communs au diabète de type II et à l'HTA (Ferrannini E., 2012).

La RI s'accompagne par conséquent d'une hyperinsulinémie qui exerce une action anti-natriurétique au niveau du tubule distal du rein, via réabsorption du  $\text{Na}^+$  et de l'eau. Ainsi les patients diabétiques de type II voient leur volume sanguin augmenter et donc leur PA. De plus, l'hyperinsulinémie stimule le SNS via sécrétion de Noradrénaline (NA) menant à une vasoconstriction (Ferrannini E., 2012).

L'obésité est liée à la fois au diabète et à l'HTA. L'accumulation de graisse surtout au niveau de la taille est associée avec l'augmentation de la PA. Cette pathologie s'accompagne d'une augmentation du débit et de la fréquence cardiaque et donc de la PA. L'obésité est associée à un dysfonctionnement du tissu adipeux où des mécanismes impliquant le stress oxydatif et l'inflammation, l'activation du SRAA et du SNS sont en cause dans la dysfonction endothéliale, un défaut de natriurèse et l'hypertrophie vasculaire, respectivement (Dorresteijn J. A., 2012).

Le syndrome métabolique regroupe au moins trois des symptômes suivants chez une même personne: l'HTA, le surpoids (obésité abdominale), la RI, l'hyperinsulinémie, l'hypercholestérolémie et un faible taux de HDL (NIH, 2015, Grundy, S. M. *et al*, 2004).

### **I-2.3 Épidémiologie**

L'hypertension est un fléau mondial touchant environ un milliard de la population du globe. Cette maladie mène au développement de complications cardiovasculaires très graves qui seraient responsables de 9,4 millions de décès par an dans le monde selon les chercheurs et l'OMS (45 % par maladies cardiaques et 51% par AVC) (OMS, 2013).

Une méta-analyse incluant un million d'adultes, l'étude sur le coeur « Framingham » a montré qu'une PA élevée normale ( $130 < \text{PAS} < 139$  mm Hg et  $85 < \text{PAD} < 89$  mm Hg) s'accompagne de l'augmentation du risque cardiovasculaire (Arora P. *et al*, 2010).

En 2015, un canadien sur cinq souffre d'HTA. De plus, l'âge est un facteur déterminant dans le risque de développer cette maladie: chez les personnes âgées de 55 à 65 ans qui ne sont pas hypertendues, 9/10 le deviendront passé les 85 ans. Bien qu'il soit très facile de mesurer la PA aujourd'hui, une personne sur six est ignorante de son état hypertendu.

Au Québec, environ 20% de la population générale souffre d'HTA. Ce chiffre monte à 50% chez les personnes âgées de plus de 60 ans. L'obésité, la sédentarité, le tabagisme, l'alcoolisme

ou encore l'hypercholestérolémie et le diabète sont autant de facteurs de risques contribuant également au développement des maladies cardiovasculaires. Quand on pense que 80% des québécois âgés de 20 à 60 ans possèdent au moins un de ces facteurs, que 30% en ont deux et 10% trois ou plus (SQHA, 2015), il semble impératif de contrôler la PA chez ces personnes afin d'éviter le pire.

Parmi les maladies cardiovasculaires qu'entraîne l'HTA; on citera les accidents vasculaires cérébraux et les hémorragies cérébrales et rétiniennes, les infarctus du myocarde, les angines de poitrine, l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'anévrisme aortique, l'insuffisance cardiaque, la revascularisation coronarienne, les néphropathies et insuffisances rénales, ou encore les claudications (*Hypertension Canada*, 2015). Celles-ci sont responsables de 30% des décès et 17% des hospitalisations au Canada.

L'HTA fait également partie du panel de facteurs de risques décrivant la maladie métabolique (Grundy, S. M. *et al*, 2004).

Le gouvernement canadien débourse plus de vingt milliards de dollars par an pour les soins liés aux maladies cardiovasculaires, et ceci en dépit des efforts de prévention réalisés ces dernières années (SQHA, 2015). Selon l'agence de santé publique du Canada, les coûts liés directement à l'hypertension, en 2003, s'élevait à 2,3 milliards de dollars (ASPC, 2009).

## **I-2.4 Pathophysiologie de l'hypertension artérielle**

### **I-2.4.1 Hémodynamique cardiovasculaire**

Dans un premier temps, lorsque l'HTA se développe, aucune modification pathologique n'est observée. Une HTA prolongée, due à des facteurs nerveux, hormonaux, structuraux et/ou génétiques, entraînera en revanche des dommages aux organes, dont le système cardiovasculaire, le cerveau et les reins. Ainsi le risque de développement de maladie cardiovasculaire et par conséquent de mort prématurée s'intensifie (Mullins L.J *et al*, 2006).

### **I-2.4.1.1 Les variables de la pression artérielle**

Comme vu précédemment, la PA est proportionnelle au débit cardiaque (Q) et à la résistance vasculaire périphérique totale (RPT). Des modifications du débit cardiaque, du volume sanguin total et de la compliance vasculaire entraînent des variations de la PAS alors que des modifications de la résistance vasculaire périphérique font varier la PAD (Backris G., 2014).

Chez la plupart des hypertendus, le débit cardiaque est normal ou très légèrement augmenté et c'est la RPT qui augmente. Il s'agit d'un tableau symptomatique typique de l'hypertension essentielle et d'HTA secondaire avec hyperaldostéronisme primaire, phéochromocytome, maladie rénovasculaire et rénale (Backris G, 2014). D'autres individus hypertendus présentent dans un premier temps un débit cardiaque élevé, dû à la veinoconstriction, et une RPT normale, ce tableau clinique s'inverse cependant avec l'évolution de la maladie.

Chez les personnes âgées, diabétiques ou encore souffrant d'athéromes, un défaut de la compliance, soit de l'élasticité des gros vaisseaux tel que l'aorte, est responsable d'une hypertension systolique isolée (Backris G, 2014). Chez ces patients, on observe une élévation du débit cardiaque, de même que dans les cas de thyrotoxicose, de fistule artério-veineuse et de régurgitation aortique. Au contraire, les patients présentant une PAD élevée montrent souvent une diminution du débit cardiaque (Backris, 2014).

Ce durcissement des artères mène aussi à des altérations microvasculaires telles qu'à la raréfaction microvasculaire. Il s'agit d'une diminution du nombre d'artéioles et veinules terminales et des capillaires sous l'action de facteurs angiogéniques locaux. Cette raréfaction participe à l'augmentation de la RPT et obligatoirement à une diminution de la perfusion des organes (Penna G.L. *et al*, 2008, Murphy W.L. *et al*, 2008).

Quant au volume sanguin, celui-ci diminue normalement sous régulation physiologique lorsque la PA augmente. Cependant, lors d'HTA accompagnant de l'aldostéronisme ou des

maladies rénales, ce dernier s'élève et il diminue lorsque l'HTA accompagne un phéochromocytome. En cas de sclérose des artères rénales, la PAD augmente et le flux sanguin diminue dans les reins. Le taux de filtration glomérulaire (TFG) ne commence à s'élever qu'à un certain stade de la maladie. Quant au débit sanguin cérébral, musculaire et coronaire, celui-ci est maintenu sauf en cas d'athérosclérose (Backris, 2014).

La pression pulsée (PP) correspond à la différence entre la PAS et la PAD. Lorsqu'elle augmente, soit lorsque la PAS augmente et/ou la PAD diminue, on observe une élévation de la postcharge (soit de la résistance au flux sanguin lorsque le sang est éjecté des ventricules) et ainsi du risque d'hypertrophie ventriculaire gauche et/ou la baisse du débit coronaire, respectivement (Jeunemaitre X., 2015, Chung M.K., 1990).

#### **I-2.4.1.2 Dysfonction endothéliale**

L'endothélium est le régulateur principal de l'homéostasie vasculaire via lequel s'opèrent des modifications de la paroi vasculaire. Ce dernier est responsable du tonus vasculaire qui permet de fournir une quantité en oxygène optimale aux tissus. Il est également impliqué dans le remodelage vasculaire et la perfusion des organes à long terme (Sandoo A. *et al*, 2010).

Un dysfonctionnement endothélial mènera au remodelage pathologique des vaisseaux et au développement de plaques athérosclérotiques et de leurs complications. Ce phénomène passe par l'activation de molécules de l'inflammation (chemokines, cytokines, molécules d'adhésion aux leucocytes et plaquettes, *etc*) (Sandoo A. *et al*, 2010). De plus, un déséquilibre du tonus vasculaire lui sera aussi associé. La dysfonction endothéliale observée dans l'HTA s'accompagne d'un défaut de la voie du NO laissant le champ libre aux vasoconstricteurs tels que l'ET-1. Le stress oxydatif (via les ROS), stimulé par l'ANG II, jouerait un rôle dans l'inactivation du NO (Sandoo A. *et al*, 2010, Backris *et al*, 2014, Deanfield, J. E *et al*, 2007).

### **I-2.4.1.3 Remodelage vasculaire**

Afin de répondre aux forces élevées de pression qui s'exercent dans les vaisseaux lors du développement de l'HTA, les parois artérielles s'épaississent suite à une hypertrophie des CMLs. Cette hypertrophie s'accompagne d'un remodelage de la matrice vasculaire menant à l'altération de la fonction artérielle. Ce remodelage passe par une accumulation de dépôt en collagène qui, associé à un épuisement en élastine est responsable de la rigidification des artères, notamment chez les individus plus âgés ou présentant un anévrisme. Cette rigidité artérielle est caractérisée par une pression pulsée accélérée, indice de morbidité chez les patients présentant une HTA sévère, une insuffisance rénale terminale, du diabète et chez les personnes âgées. En revanche, chez les jeunes sujets atteints d'HTA légère à modérée, ce dépôt en collagène est associé avec une baisse de la rigidité vasculaire (Lehoux S *et al*, 2006). Ce phénomène s'expliquerait par la présence de métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP-9) qui seraient responsables de distendre l'artère qui pourrait alors s'accommoder aux nouvelles forces de pression qu'elle subit (Mullins L.J *et al*, 2006). Ainsi, il existerait un recrutement progressif des fibres de collagène qui s'opèrerait au fur et à mesure que la PA augmente. La rigidification des artères sera d'autant plus importante qu'il y aura présence d'athéromes (Lehoux S *et al*, 2006, Mullins L.J *et al*, 2006).

### **I-2.4.1.4 Athérosclérose**

Le développement de l'athérosclérose est à relié à plusieurs phénomènes dont la dysfonction endothéliale (défaut de disponibilité du NO), le stress oxydatif, l'inflammation, la résistance à l'insuline. L'HTA associée à l'hyperlipidémie va généralement déclencher le processus athérogénique (Koh K.K *et al*, 2010). En effet, lorsque la PA est élevée, via l'épaississement et la perte d'élasticité des parois vasculaires, se développe la formation de plaques athérosclérotiques via accumulation de lipides et recrutement de monocytes et plaquettes généralement au niveau de bifurcations vasculaires. Les plaquettes libèrent des facteurs de croissance qui induisent le recrutement de CMLs au niveau de la lésion. À un stade plus avancé, il peut aussi se produire une calcification de la plaque d'athérome.



L'athérosclérose se développe progressivement, parfois depuis l'enfance, et en prenant de l'ampleur, celle-ci peut se détacher de la paroi vasculaire et aller créer une thrombose dans un organe (Alexander, R. W. *et al*, 1995).

Outre une hausse du taux de molécules d'adhésion intracellulaire observée chez les sujets hypertendus, l'étirement de la paroi serait associée à la production de radicaux oxygénés (ROS) et par conséquent de l'activation de gènes pro-inflammatoires, associés à la formation de l'athérome. Ce phénomène impliquerait le facteur de transcription nucléaire NF-KB et les molécules de signalisation MAP kinases (Mitogen-activated protein) qui, en promouvant la survie des CMLs, contribueraient à la stabilité de la plaque athérosclérotique (Lehoux S *et al*, 2006).

## **I-2.4.2 Développement des maladies cardiovasculaires**

### **I-2.4.2.1 Hypertrophie du ventricule gauche (HVG)**

La diminution de l'élasticité des artères pousse le coeur à travailler plus intensément. Des études ont montré que la rigidité aortique est associée avec des atteintes des artères coronaires (Mullins L.J *et al*, 2006, Lemarié C *et al*, 2010). En effet, le durcissement artériel est responsable d'une augmentation de la PAS qui augmente les besoins en oxygène du coeur, diminue le volume d'éjection systolique (VES) et augmente la postcharge ventriculaire menant à l'hypertrophie ventriculaire gauche. Cette dernière s'accompagne d'une dysfonction diastolique (soit un défaut de remplissage du ventricule gauche) et une dilatation des oreillettes. L'hypertrophie est souvent cause d'arythmie et insuffisance cardiaque, souvent empirée avec une coronaropathie artériosclérotique (Mullins L.J *et al*, 2006, Jeunemaitre X *et al*, 2015).

#### **I-2.4.2.2 Coronaropathies**

Celles-ci naissent de la combinaison entre la formation d'athéromes dans les artères coronaires et l'augmentation des besoins en oxygène du coeur due à l'HVG (Mullins L.J *et al*, 2006). Il en résulte une douleur ressentie dans la poitrine que l'on nomme communément angine de poitrine. Suite à la rupture de la plaque athéromateuse coronarienne, la vascularisation du coeur peut être interrompue voir mener à l'ischémie et ainsi à l'infarctus du myocarde (Alexander, R. W. *et al*, 1995)

#### **I-2.4.2.3 Insuffisance cardiaque congestive**

Suite à un infarctus par exemple, le coeur a subi des dommages et n'est plus capable de pomper correctement le sang, notamment en période de stress et d'exercice physique. L'insuffisance peut s'accompagner d'oedèmes pulmonaires et des membres inférieurs dus à une imperfection du retour veineux suite à un défaut de distensibilité cardiaque (FMC, 2014). L'insuffisance cardiaque diastolique (ICD) correspond à environ 30% des insuffisances cardiaques et est causée par le dysfonctionnement diastolique, la fonction systolique étant préservée. L'ICD est souvent associée avec l'HTA, l'HVG et les maladies ischémiques cardiaques (Brutsaert, D. L. *et al*, 2006, Crespo K. *et al*, 2013 (b), Crespo K. *et al*, 2013 (c)).

#### **I-2.4.2.4 Accidents vasculaires cérébraux (AVC)**

L'HTA et l'athérosclérose peuvent également mener au développement d'AVC ischémiques thrombotiques ou emboliques lorsque le caillot sanguin atteint un organe plus lointain via la circulation. Les AVC hémorragiques (subarachnoïdes ou intracérébraux), quant à eux, se produisent en présence d'anévrisme, soit une dilatation de la paroi vasculaire, ou de malformation vasculaire cérébrale, souvent congénitales (FMC, 2014). L'apparition de lacunes cérébrales, ou micro-infarctus cérébraux sont caractéristiques de l'HTA (Backris G, 2014).

#### **I-2.4.2.5 Atteintes rénales**

Au niveau rénal, la rigidité vasculaire est associée à une diminution du taux de filtration glomérulaire (TFG) et par conséquent à un défaut de la natriurèse et de la diurèse aggravant l'HTA existante (Mullins L.J *et al*, 2006, Lemarié C *et al*, 2010).

Les néphroangioscléroses, telles que les gloméruloscléroses, peuvent se développer engendrant une destruction du glomérule et ainsi l'insuffisance rénale terminale (Backris G, 2014, Fouët X-A., 1999).

La sténose de l'artère rénale peut aussi avoir lieu suite à la présence d'athérome dans l'artère rénale. Celle-ci devenant alors cause d'HTA secondaire (Krier, J. D. *et al*, 2013).

### **I-2.5 Traitements anti-hypertenseurs**

Les traitements anti-hypertenseurs ne permettent pas à ce jour de guérir l'HTA mais de la maîtriser ou même de la prévenir, d'où leur utilisation à long terme voire à vie (*Hypertension Canada*, 2015).

Les traitements les plus simples et accessibles passent par une modification des habitudes de vie qui permettrait de prévenir le développement de l'HTA. Parmi celles-ci on citera une alimentation saine menant au maintien d'un poids optimal, évitant les acides gras saturés et le cholestérol, limitant la consommation d'alcool à 14 verres/semaine/homme et 9/semaine/femme et celle en sel à moins de 5g/d (ou 2 000 mg /d de Na<sup>+</sup>) et augmenter sa consommation en K<sup>+</sup>. Pratiquer une activité physique régulièrement et ne pas fumer (OMS, 2013).

Outre de bonnes habitudes de vie, il est souvent indispensable de prescrire des traitements médicamenteux aux patients hypertendus. Pour une efficacité optimale, la combinaison de plusieurs anti-hypertenseurs s'avère généralement nécessaire.

Parmi ces médicaments on distingue les diurétiques dont l'usage est destiné à l'élimination de l'excédent sodique dans l'organisme, les bêta-bloqueurs ralentissant le rythme cardiaque et inhibant le SRAA, les bloqueurs des canaux calciques vasodilatateurs, les inhibiteurs des enzymes de conversion de l'angiotensine (ECA), les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II pour leurs actions vasodilatatrices, les bloqueurs des récepteurs alpha adrénergiques inhibant la vasoconstriction et les vasodilatateurs directs (OMS, 2013).

L'objectif du traitement est de ramener une PA inférieure à 140/90 mm Hg pour les moins de 60 ans (incluant les patients diabétiques et souffrant de maladies rénales) et inférieure à 150/90 mm Hg pour les plus de 60 ans (OMS, 2013).

D'après la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle (SQHA), les traitements anti-hypertenseurs permettraient de réduire le risque d'AVC de 40%, l'infarctus de 15%, l'insuffisance cardiaque de 50% et entraîneraient également une diminution des risques d'insuffisance rénale terminale, de fibrillation auriculaire, d'hypertrophie ventriculaire gauche et de mort prématurée (SQHA, 2015).

## **I-3. Déterminisme génétique de l'hypertension artérielle**

### **I-3.1 L'hypertension essentielle, un trait polygénique, complexe**

L'HTA peut se présenter sous une forme purement environnementale et se développer en fonction de la diète et du mode de vie, elle peut aussi reposer sur une composante uniquement génétique et ainsi se déclarer comme un trait monogénique à pénétrance variable ou totale ou encore, comme dans la plupart des cas, correspondre à un trait complexe, à composante environnementale et polygénique (Backris G. *et al*, 2014).

En effet, bien que certains gènes spécifiques soient en cause dans l'HTA chez un nombre réduit d'individus (formes monogéniques d'HTA familiale), l'accumulation de plusieurs mutations situées sur différents gènes ayant chacun une action infinitésimale sur la PA participerait au développement de cette pathologie. On parle alors d'hérédité quantitative.

Sachant que trait complexe est synonyme de trait multifactoriel, il existe une interaction entre le génome et l'environnement qui fait que certains individus ne deviendront hypertendus sous contraintes environnementales que s'ils possèdent un terrain génétique favorable au développement de l'HTA (Backris G. *et al*, 2014, Plomin, R. *et al*, 2009). De plus, d'autres facteurs sont aussi à prendre en considération dans cette maladie tels que le sexe de l'individu et les interactions entre les gènes.

### **I-3.1.1 Études de populations et de familles**

Les premiers indices en faveur d'un déterminisme génétique de l'HTA sont basés sur des études épidémiologiques.

Les études génétiques de familles permettent de rechercher la cause génétique responsable de la prévalence élevée de la maladie dans une famille donnée (Plomin, R. *et al*, 2009). En effet, la part de l'héritabilité dans les études de familles va de 31% à 68% dépendamment si on s'intéresse à des mesures de PA prises de façon ponctuelle ou sur le long terme, respectivement (Mansour-Chemaly M. *et al*, 2002).

L'agrégation familiale permet d'identifier des gènes candidats et d'établir l'impact des facteurs environnementaux communs à la famille dans le développement génétique de l'HTA (Mansour-Chemaly M. *et al*, 2002, Ehret G.B., 2010).

Des travaux sur la PA entre les membres d'une même famille ont établis que 25% des variations de la PA dépend des facteurs génétiques, contre 65% chez les jumeaux monozygotes (Krzyszinski J-M. *et al*, 2012, Lifton R. *et al*, 2001). Il a été démontré que l'HTA est deux fois plus sujette à s'établir chez les individus dont au moins l'un des deux parents biologiques est hypertendu (Arora P. *et al*, 2010).

Les études de familles ont alors démontré la contribution significative de la part génétique dans les variations interindividuelles de PA, notamment dans les formes rares mendéliennes d'HTA, permettant de lever le jour sur les voies de régulation de la PA (Ehret, G. B., 2010).

Il existe également des différences ethniques dans l'homéostasie de la PA: les afro-américains sont touchés plus tôt et davantage par l'HTA que les populations d'origine caucasienne (Beavers G. *et al*, 2001). Les études épidémiologiques ont montré que la génétique compte pour environ 30% des variations de PA dans la population mondiale (Lifton R. *et al*, 2001).

Le criblage du génome via l'analyse de liaison ou d'association est une méthode permettant de cibler des régions génomiques impliquées dans le développement de l'HTA, et ceci sans *a priori* vis à vis de la voie de régulation de la PA. Ces régions pourront par la suite être analysées plus en profondeur (Krzyszinski J-M. *et al*, 2012).

#### **I-3.1.1.1 Formes monogéniques d'hypertension artérielle**

Des mutations monogéniques rares à l'origine d'HTA familiale ont été identifiées par le groupe de Lifton. Ces mutations mendéliennes se caractérisent par une fréquence allélique faible et un effet phénotypique important et affectent toutes la réabsorption du Na<sup>+</sup> par les reins. L'ensemble des formes monogéniques connues responsables de causer l'HTA sont décrites ci-dessous. D'autres mutations causant l'hypotension ont également été découvertes mais ne seront pas énumérées ici (**Figure 5**).

Parmi celles-ci, certaines sont autosomiques dominantes, c'est-à-dire que l'allèle muté sera transmis d'un parent malade à son enfant dans 50% des cas. C'est le cas du GRA (*Glucocorticoid Remediable Aldosteronism*) ou aldostéronisme corrigé par les glucocorticoïdes qui est dû à une mutation à l'origine d'un cross-over (CO) inégale entre le gène CYP11B1 codant la 11 beta-hydroxylase qui sous stimulation de l'ACTH induit

normalement la sécrétion de cortisol, et CYP11B2 codant l'aldostérone synthase via stimulation de l'ANG II. Le gène chimérique issu de ce CO contient la région régulatrice de CYP11B1 et la séquence codante de CYP11B2. Il en résulte un aldostéronisme qui s'accompagne d'une alcalose métabolique et d'une hypokaliémie et une inhibition de l'activité de la rénine plasmatique qui n'a cependant aucun effet sur la sécrétion d'aldostérone ici. L'excès d'aldostérone mène à une augmentation de la réabsorption de Na<sup>+</sup> et d'eau au niveau du tube collecteur rénal. Quant à la déficience en 11 beta-hydroxylase et donc en cortisol, celle-ci engendre une augmentation du taux de déoxycorticostéroïdes et ainsi l'HTA. Ce phénotype peut être corrigé via administration de glucocorticoïdes, le dexaméthasone qui agit comme le cortisol et va alors inhiber les taux d'ACTH inhibant la synthèse d'aldostérone (Mullins L.J. *et al*, 2006, Lifton R.P. *et al*, 2001, Krzesinski J-M. *et al*, 2012). Une déficience en 17 alpha hydroxylase (CYP17) à transmission autosomique récessive peut aussi être corrigée par les glucocorticoïdes (Kater, C. E. *et al*, 1994) (**Figure 5**).

Une mutation antisens également autosomique dominante située dans le domaine de liaison au ligand du récepteur aux minéralocorticoïdes est responsable d'HTA exacerbée pendant la grossesse. En effet, les récepteurs peuvent alors être stimulés par la progestérone dont les taux sont multipliés par 100 pendant la grossesse. Ce phénotype peut aller jusqu'à la mort maternelle et foetale (Mullins L.J. *et al*, 2006, Lifton R.P. *et al*, 2001, Krzesinski J-M. *et al*, 2012) (**Figure 5**).

Le syndrome de Gordon (arthrogrypose distale) est dû à une mutation rare autosomique dominante du co-transporteur Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (NCC) au niveau du tubule contourné distal. Cette mutation mène à un pseudohyperaldostéronisme de type II avec développement d'HTA accompagnée d'hypokaliémie et acidose métabolique ainsi qu'une réduction des taux de rénine et aldostérone plasmatiques (Mullins L.J. *et al*, 2006, Lifton R.P. *et al*, 2001, Krzesinski J-M. *et al*, 2012).

Enfin, le syndrome de Liddle provient d'une mutation autosomique dominante des sous-unités beta ou gamma des canaux sodique épithéliaux ENaC du tube collecteur. Le canal muté présente un codon stop prématuré et ne peut plus être dégradé par ubiquitination, augmentant la demi-vie et ainsi l'activité du canal. Il en résulte alors une augmentation importante de la réabsorption du Na<sup>+</sup> entraînant une HTA sévère car les ENaC jouent un rôle primordial dans l'homéostasie de la PA. Celle-ci s'accompagne d'hypokaliémie, d'alcalose métabolique et d'une diminution des taux de rénine et aldostérone plasmatique (Mullins L.J. *et al*, 2006, Lifton R.P. *et al*, 2001, Krzesinski J-M. *et al*, 2012) (**Figure 5**).

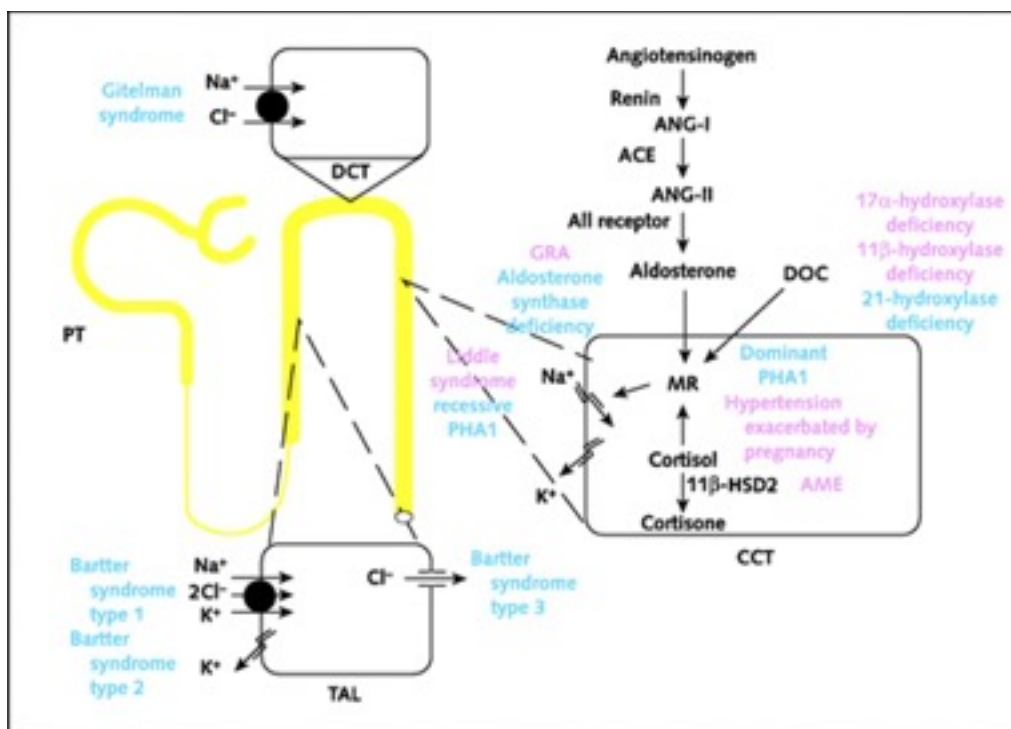
Des mutations autosomiques dominantes du *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARG)* entraînent une perte de fonction résultant d'une résistance à l'insuline, de diabète et d'hypertension (Barroso I. *et al.*, 1999, Cowley, A.W., 2006).

Une autre forme d'HTA autosomique dominante âge-dépendante s'accompagnant de brachydactylie a été découverte dans trois familles dont les individus atteints présentaient également une anomalie de l'artère cérébelleuse postéro-inférieure, au niveau de la médusa ventrolatérale. Ce syndrome serait dû à une mutation hétérozygote du gène PDE3A situé sur le chromosome 12 humain (Lee W. K. *et al.*, 2000, Maass P. G. *et al.*, 2015).

Le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes (AME) provient quant à lui d'une mutation autosomique récessive, qui concerne 25% des descendants dont les deux parents sains sont porteurs de l'allèle muté. Cette mutation induit la déficience en enzyme HSD11B2 qui normalement métabolise le cortisol. Il se produit alors une suractivité du cortisol qui possédant une affinité similaire à celle de l'aldostérone pour les récepteurs minéralocorticoïdes au niveau du tubule distal mène à la rétention de Na<sup>+</sup> et d'eau, accompagnée d'une hypokaliémie et d'une alcalose métabolique (Mullins L.J. *et al*, 2006, Lifton R.P. *et al*, 2001, Krzesinski J-M. *et al*, 2012) (**Figure 5**).



Enfin le syndrome d'hypertension, d'hypercholestérolémie et d'hypomagnésémie, à transmission mitochondriale provient d'une mutation causant la substitution d'une cytidine dans le tRNA mitochondriale (Wilson, F. H. *et al.*, 2004, Cowley, A.W., 2006).



**Figure 5: Formes monogéniques affectant la pression artérielle chez l'humain via altération de la réabsorption du sodium par les reins** (extraite de Lifton R.P. *et al.*, 2001).

Cette figure représente un néphron (en jaune), unité fonctionnelle du rein. ANG-I ou ANG-II: angiotensine I ou II, ACE: enzyme de conversion de l'ANG, MR: récepteurs des minéralocorticoïdes, GRA: aldostérisme rémissible via les glucocorticoïdes, PHA1: pseudohypoaldostérisme de type 1, AME: excès apparent de minéralocorticoïdes, 11bHSD2: 11 beta-hydroxystéroïde dehydrogénase-2, DOC: déoxycorticostérone, PT: tubule proximal, TAL: anse ascendante de Henlé, DCT: tubule contourné distal, CCT: tubule collecteur cortical. Quelques unes des maladies monogéniques responsables de causer l'HTA sont en rose, celles causant l'hypotension sont en bleu.

### I-3.1.1.2 Études de liaisons et études de génomes entiers

Les études de liaison génétique sont des outils de diagnostic efficaces ayant permis d'associer plusieurs variants génétiques à l'HTA via leurs localisations chromosomiques. Ces analyses ont été particulièrement efficaces pour identifier les variants rares de l'hypertension familiale. En effet, des études de liaison génomique dans des familles présentant de rares formes mendéliennes d'HTA ont identifié avec succès des mutations monogéniques altérant la voie de réabsorption sodique par les reins décrites précédemment (Pulst, S. M., 1999).

La liaison génétique est définie par le phénomène selon lequel deux allèles de deux gènes différents dont les loci résident physiquement près les uns des autres sur un même chromosome restent liés, c'est-à-dire qu'ils sont transmis ensemble pendant la méiose, et ceci plus fréquemment que le hasard ne le prédit (Pulst, S. M., 1999). En d'autres termes, les allèles dont les loci se trouvent à proximité ont moins de chance d'être séparés sur différentes chromatides lors des recombinaisons chromosomiques et seront hérités ensemble par la génération suivante qui présentera alors le même phénotype que le phénotype parental (Ott J. *et al*, 2015).

La recombinaison résulte de la réalisation de *crossovers* (CO), soit l'échange d'une région chromosomique issu de la cassure puis réunion des brins se produisant entre deux loci entre chromosomes homologues lors de la métaphase I de méiose (Griffiths A. J., 2000).

La liaison génétique combinée à l'utilisation de nombreux marqueurs permet de réaliser des cartes génétiques. Contrairement aux cartes physiques qui mesurent les distances en paires de base (pb) et aux cartes caryotypiques qui assignent des marqueurs aux bandes chromosomiques, les cartes génétiques donnent les distances en unité de recombinaison; le centiMorgan (cM). En moyenne, 1 cM équivaut à 1 million de pb et correspond à 1% de descendants au génotype recombiné, il se produit donc environ 1 CO sur 100 méioses (Creighton, H.B. *et al*, 1931).

Les taux de recombinaisons varient entre les sexes et en fonction des fragments chromosomiques. Effectivement, certaines régions présentent un taux de recombinaison élevé, celles-ci sont qualifiées de « *recombination hot spots* » (Pulst, S.M., 1999). La distance entre les deux loci séparant les allèles liées est généralement inférieur à 50 cM, réduisant le taux de recombinaison à moins de 0,5 (Ott J. *et al*, 2015).

On qualifie d'haplotype un groupe d'allèles liés, sur le même chromosome (Allaby M., 2015).

Une mesure du degré ou de la probabilité de liaison génétique est le logarithme des probabilités (*logarithm of odds*) dit aussi LOD score ou Z, avec  $Z(x) = \log_{10}[L(x)/L(\infty)]$  qui correspond au logarithme du ratio entre la probabilité que des loci soient liés ( $L(x)$ ) par la probabilité qu'ils ne le soient pas (indépendants,  $L(\infty)$ ) lors de l'observation d'une famille. Via ce logarithme il est possible d'additionner plusieurs probabilités observées dans différents pédigrées (Pulst, S.M., 1999). Un LOD score supérieur ou égale à 3,3 est considéré significatif et correspond au fait que la liaison des loci est mille fois plus probable que leur indépendance. Une valeur de LOD score inférieure à -2 exclue la probabilité de liaison. Due à un nombre déterminé de chromosomes, il existe une probabilité raisonnable (5% chez l'humain avec 23 paires de chromosomes) que deux loci soient liés lorsqu'ils sont situés à proximité (Ott J. *et al*, 2015).

L'analyse de liaison est l'approche statistique de cartographie génétique qui a été la plus utilisée dans la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle. Puis, cette dernière s'est vu suppléer face à l'essor des analyses d'association de traits complexes, plus performantes pour l'analyse des variants communs à effet modeste. C'est alors que les études d'association à large échelle du génome (Genome-wide association studies, GWAS) utilisant les marqueurs polymorphiques mononucléotidiques (SNPs) sont devenues très prisées. Cependant, suite à ces études d'associations, il a été mis en évidence que les variants plus rares, qui ne sont pas analysés par les GWAS, constitueraient des indicateurs non négligeables des maladies complexes. Grâce à l'émergence de nouvelles bases de données de séquençage du génome entier (*Genome Wide Scan*, GWS) dans de nombreuses familles et populations, les analyses de liaison sont revenues

en force sur le devant de la scène afin d'analyser ces variants génétiques plus rares. Ainsi, pour chaque membre d'une famille ou d'une population, le génotype peut être généré via l'utilisation de puces de marqueurs génétiques puis analysé via études de liaison. Cette méthode, contrairement à l'approche par gène candidat est sans *a priori* (Suarez B. K. *et al*, 1978, Ott J. *et al*, 2015).

Ainsi, combinée avec l'approche du génome entier, l'analyse de liaison redevient une méthode de choix dans l'analyse génomique, notamment pour l'identification de variants génétiques rares associés à un trait complexe avec une pénétrance élevée, soit la probabilité qu'un phénotype donné corresponde à un génotype donné. Il s'agit d'une technique ayant de nombreux avantages face aux approches qui filtrent le nombre de gènes devant être analysés via le ciblage de variants déjà connus et prenant en compte les phénotopies (dues à l'environnement) et la faible pénétrance (Ott J. *et al*, 2015).

Cette méthode permet de fournir une preuve statistique de l'implication d'un variant génétique dans l'origine d'une maladie et peut être réalisée directement via le génotypage de familles entières, générant toutefois des faux-positifs (Ott J. *et al*, 2015). De plus, la grande taille des régions identifiées par liaison génétique et donc du nombre de gènes à étudier constituent des limites à cette approche. Cela dit, afin de délimiter le nombre de gènes à analyser, il est possible d'utiliser la stratégie de gène candidat « positionnelle » comme complément (Suarez B. K. *et al*, 1978).

### **I-3.1.1.3 Études d'association**

Si les mutations monogéniques énumérées plus haut peuvent expliquer l'origine de l'HTA chez un nombre réduit de familles, qu'en est-il du reste de la population hypertendue? (Arora P. *et al*, 2010). L'HTA étant un trait polygénique complexe, le pouvoir de l'analyse de liaison est rapidement limité puisque selon le dogme de l'additivité, l'HTA peut résulter de l'addition de plusieurs variants génétiques qui individuellement contribuent chacun à de petites augmentations non significatives de la PA (Mullin L.J *et al*, 2006).

### I-3.1.1.3.1 Définition et méthode

Avec la finalisation du *Human Genome Project* en 2003 et du *International HapMap Project* en 2005, les chercheurs ont désormais des outils leur permettant de déterminer un peu plus le déterminisme génétique dans les maladies complexes, chez l'humain et à l'échelle des populations. Parmi ces outils, les bases de données informatisées contenant la séquence du génome humain de référence, une cartographie des variants génétiques humains identifiés et distribués en fonction des populations et un ensemble de nouvelles technologies pouvant rapidement et précisément cribler des échantillons de génomes complets pour associer un génotype à un phénotype (NIH, 2015). Le développement des techniques de génotypage à haut débit via l'utilisation de « puces à ADN », nommées aussi *microarrays* a rendu possible le criblage rapide d'un grand nombre de variants génétiques (317 000 à presque 2 000 000 en fonction des puces à ADN) à travers le génome sur une quantité d'échantillons considérable, ouvrant la voie aux études d'association à large échelle du génome complet (*Genome-Wide Association Study*, GWAS) (Norgard K., 2008).

Les polymorphismes mononucléotidiques (SNPs) étant les variants génétiques couvrant la plus grande partie du génome (il y en a environ 10 millions dans le génome), sont les marqueurs génétiques utilisés pour ces études (Norgard K., 2008).

Contrairement au GWS qui s'appuie sur la liaison génétique entre marqueurs microsatellites et loci en cause dans le phénotype, les GWAS repose sur l'association entre les allèles spécifiques de SNPs et le phénotype qui les accompagne, soit sur le déséquilibre de liaison entre ces allèles et le phénotype hypertendu (Shifman S. *et al*, 2003, Evans D. M. *et al*, 2005). La combinaison non aléatoire d'allèles situées sur deux ou plusieurs loci différents sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents, qui se produit à une fréquence plus élevée que le hasard ne le prévoit est appelée déséquilibre de liaison (*linkage disequilibrium*, LD). Ce dernier résulterait de la sélection naturelle ou du hasard et de la migration des populations et est influencé par le taux de recombinaison. Le LD est un outil précieux pour la

cartographie génétique mais également pour approfondir nos connaissances sur l'histoire de l'évolution (Pulst, S. M., 1999, Slatkin M., 2008).

Il est important de distinguer association et liaison génétique. La liaison désigne la relation entre des variants génétiques et des loci (liés) à proximité des gènes en cause dans l'HTA. L'association désigne la relation entre des allèles de SNPs et le phénotype de la population observée, qui se retrouvent à une fréquence plus élevée que le hasard ne le prédit dans cette population. Contrairement aux études de liaison utilisées pour détecter les variants rares ayant un effet significatif dans les formes monogéniques d'HTA familiale, les études d'association sont plus appropriées pour la détection des variants communs dont l'impact génétique est modeste à l'échelle des populations (Arora P. *et al*, 2010).

Pour mener ces études, deux groupes de personnes sont nécessaires, l'un regroupant les individus hypertendus et l'autre composé de personnes normotendues, les témoins. À partir d'un prélèvement cellulaire simple, l'ADN de chaque sujets est inspecté à la recherche de variants. Ainsi, si des mutations se retrouvent dans la population atteinte d'HTA plus fréquemment que dans le groupe normotendu, alors ces variants sont associés à l'HTA (Pulst, S. M., 1999, NIH, 2015).

#### **I-3.1.1.3.2 Résultats**

Depuis 2009, de nombreuses GWAS sur la PA et l'HTA ont été publiées. Plusieurs ethnies ont été analysées mais la plupart des individus sont d'origine européenne due à la disponibilité des échantillons mais aussi parce que les génomes des sujets d'origine africaine ont subi un plus grand nombre de recombinaisons que les génomes d'ascendance européenne (Ehret, G.B., 2010). Parmi ces études, deux groupes ont identifié des associations significatives et reproductibles. Il s'agit du *Global Blood Pressure Genetics* (Global BpGen) consortium qui a réalisé son étude sur 100 000 personnes d'origine européenne et asiatique et a permis d'associer 8 loci avec la PAS et/ou la PAD (Newton-Cheh C. *et al*, 2009) et le *Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology* (CHARGE) qui a criblé le

génomique de 30 000 individus d'origine européenne et a identifié 11 SNPs associés à la PA et à l'HTA (Levy D. *et al*, 2009). Ces deux études sont des méta-analyses de plusieurs GWAS individuelles. En tout, 14 loci significatifs ont été associés à la PA dont trois sont en LD et seraient donc susceptibles d'agir ensemble sur les variations de la PA, via accumulation de leurs effets selon la théorie de l'additivité sur laquelle sont basées ces études d'association. Cependant, si ces résultats permettent d'associer des loci à la PA, ils ne permettent pas de renseigner précisément sur les gènes en cause dans l'HTA. Seules des hypothèses basées sur les loci identifiés et les gènes situés à proximité sont proposées quant à l'implication de ces gènes comme candidats potentiels pour la PA. Le mécanisme fonctionnel sous-jacent doit être démêlé avant de pouvoir aboutir à une conclusion. En prenant cette réflexion en considération, ces 14 loci sont situés dans ou à côté de gènes codant six enzymes (kinases et cytochromes) (*CYP17A1*, *ULK4*, *CSK-ULK3*, *MTHFR-CLCN6*, *PLCD3*, *SH2B3-ATXN2*) deux canaux membranaires (*ATP2B1*, *CACNB2*), deux facteurs de transcription (*TBX3-TBX5*, *ZNF652*), un facteur de croissance (*FGF5*), une protéine de signalisation cellulaire (*PLEKHA7*), une protéine de structure (*NPPA-NPPB*) et un gène hypothétique (*C10orf107*).

Sur ces 14 gènes, seulement deux: *cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 (CYP17A1)* et *5,10-méthylentetrahydrofolate reductase (MTHFR)* ont auparavant été identifiés comme gènes candidats pour la PA. Les douze autres n'ont jamais été associés avec la PA précédemment (Ehret, G.B., 2010).

Puis en 2011, *The International Consortium for blood pressure (ICBP)* issu de l'association du *Global BP Gen Consortium* et du CHARGE a ajouté une étude réalisée sur 70 000 nouveaux individus, identifiant 29 SNPs situés dans 28 loci, associés avec la PAS, la PAD, la PAM ou la PP. Sur ces 29 SNPs, 17 correspondent à de nouvelles découvertes: *MOV10*, *SLC4A7*, *MECOM*, *SLC39A8*, *GUCY1A3-GUCY1B3*, *NPR3-C5orf23*, *EBF1*, *HFE*, *BAT2-BAT5*, *CACNB2*, *PLCE1*, *ADM*, *FLJ32810-TMEM133*, *FURIN-FES*, *GOSR2*, *JAG1*, *GNAS-EDN3* (Ehret G.B. *et al*, 2011, Kato N. *et al*, 2011, Wain L.V. *et al*, 2011).

Plus récemment, en 2014, Simino *et al* ont réalisé une méta-analyse rassemblant les cohortes du *Global BP Gen Consortium*, du CHARGE et du ICBP à la recherche d'associations entre SNPs et PAS, PAD, PAM, PP en fonction de l'âge. Sur les 99 241 individus d'origine européenne analysés, 20 loci significatifs ( $p \leq 5 \times 10^{-8}$ ) ont été identifiés, certains montrant une interaction âge-dépendante plus prononcée que d'autres, ce qui pourrait renseigner sur la régulation temporelle de la PA (Simino J. *et al*, 2014). Une autre méta-analyse de 87 736 individus d'origine européenne ont aussi découvert 11 nouveaux loci (Tragante V., 2014) et on pourrait en citer beaucoup d'autres la plupart se basant sur les trois cohortes citées ci-dessus.

### I-3.1.1.3.3 Avantages

L'impact des GWAS sur l'avancée de la médecine pourrait être considérable. En effet, la découverte de nouvelles associations génétiques permet le développement de nouvelles stratégies afin de diagnostiquer, traiter et prévenir la maladie complexe, menant à la médecine personnalisée (NIH, 2015).

Alors que les études de liaison et de gènes candidats ont permis des avancées dans la découverte des formes monogéniques d'HTA, les GWAS trouvent leur utilité avec l'hypothèse que les traits polygéniques seraient dus au cumul de nombreux variants de fréquence allélique élevée mais d'impact phénotypique modeste. Ainsi, les GWAS sont devenues de plus en plus populaires, ces dernières années, dans la recherche sur les traits complexes, polygéniques. Celles-ci ont permis l'identification de nombreux nouveaux variants génétiques susceptibles d'être en cause dans plusieurs traits complexes dont l'HTA. Ces dernières ont également confirmé l'implication de SNPs qui avaient déjà été trouvés lors d'études antérieures (Miles C. *et al*, 2008).

La force des GWAS repose sur le fait qu'elles s'intéressent au génome entier, elles ne nécessitent donc pas de connaissances préalables sur le phénotype d'intérêt contrairement à



l'approche par gène candidat et permettent d'identifier de nouveaux SNPs susceptibles d'être impliqués dans l'HTA ou du moins permettant de localiser des loci en cause (Ehret, G. B., 2010).

#### **I-3.1.1.3.4 Limites**

Les études d'associations détectent des SNPs la plupart du temps situés dans des régions introniques ou intergéniques, et n'identifient pas directement le gène en cause dans le phénotype. Dans ces GWAS, il est important de noter que chaque variant génétique identifié a un impact minime sur le phénotype et n'expliquerait que 1% de la variabilité de PA après corrections en fonction du sexe, de l'âge et de l'indice de masse corporelle (Franceschini N. *et al*, 2014). En effet, chaque copie d'un allèle dit à risque est associée avec une augmentation de la PAS et de la PAD de 1 et 0,5 mm Hg respectivement. Ce sont de petits effets qui additionnés mèneraient au phénotype hypertendu chez un individu, selon l'hypothèse de l'additivité (Ehret G.B., 2010). L'ensemble des SNPs identifiés jusqu'à présent n'expliquerait que moins de 3% de l'héritabilité génétique de l'HTA (Krzyszinski J-M *et al*, 2012).

Afin d'être significatives, les GWAS nécessitent d'être réalisées sur des échantillons de très grandes tailles. En effet, l'appréciation du nombre de variants génétiques testés pour leur association avec le phénotype peut être difficile étant donné que des milliers voire des millions de SNPs sont analysés. De plus, dans le but de respecter le risque statistique de 5%, soit qu'il y ait que 5% de risque pour que l'association corresponde à un faux-positif, les GWAS ne doivent considérer qu'une association très significative entre SNP et phénotype. Ainsi, seuls les effets génétiques importants, soit les SNPs dont la fréquence de l'allèle mineure est de 5% dans la population observée, ne pourront être détectés par les GWAS.

Pour chaque SNP, un test d'association générant une valeur p et une analyse de régression de l'estimation de l'impact du SNP sont réalisées. Vu la quantité de tests produits, les valeurs p nécessitent d'être corrigées pour tests multiples (Bonferroni) afin d'éviter les faux-positifs et le seuil significatif peut être déterminé par test de permutation. La plupart des études utilisent

une approximation: les associations significatives ont un  $p < 5 \times 10^{-8}$ , en considérant que seulement un million de tests indépendants sont réalisés, et ceci même si un plus grand nombre de variants génétiques est testé. Le seuil significatif de  $5 \times 10^{-8}$  est atteint en divisant le risque significatif de 0,05 par un million. D'où la nécessité d'inclure beaucoup d'individus dans les études (Ehret, G.B., 2010).

Parmi les GWAS, certaines réalisées dans diverses populations de taille modérée n'atteignent pas de seuil d'association significatif ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ). On citera par exemple *The Welcome Trust Case Control Consortium* qui a analysé 2000 patients hypertendus *versus* 3000 témoins (Arora P. *et al*, 2010).

Un autre inconvénient de la technique est que le LD étant spécifique en fonction des populations, les GWAS doivent en tenir compte et regrouper des individus homogènes dans leurs études. Ainsi, la stratification des populations doit être ajustée rigoureusement en fonction de l'origine ancestrale des individus afin d'éviter les fausses associations. Des efforts pour réaliser des GWAS sur des populations autres que d'origine européenne sont en cours. On citera le *Japanese Millennium Genome Project*, le *Korea Association Resource consortium*, le *Asian Genetic Epidemiology Network*, *NHLBI Candidate-Gene Association Resource* (afro-américains), le *COGENT-BP* (Africains and Afro-américains), *et le Genomics of Blood Pressure for Hispanics Consortium* (GHBP, mexicains) (Franceschini N. *et al*, 2014).

De plus cette technique peut faire l'impasse sur des variants qui ne sont pas en LD avec le SNP génotypé et sur les variants génétiques rares puisque les puces à ADN n'inclut que des SNPs dont la fréquence allélique est importante (*Minor Allele Frequency*,  $MAF > 5\%$ ) (Franceschini N. *et al*, 2014). Les études d'associations sont également connues pour leur faible reproductibilité (Miles C. *et al*, 2008).

À l'heure de la médecine personnalisée, alors que le génotypage et séquençage du génome d'un individu peut se faire pour une somme modique, il est important de comprendre

que les GWAS ne peuvent pas prédire de façon absolue une maladie donnée. Ceci en raison notamment du rôle que les facteurs environnementaux jouent dans les maladies complexes mais aussi du fait de la taille encore trop faible des échantillons. Ainsi et surtout du fait que la valeur de la mesure de PA au sein de la population peut être incertaine car elle fluctue beaucoup pour un même individu et peut être influencée par les traitements anti-hypertenseurs suivis par les individus participant à l'étude (Krzyszinski J-M *et al*, 2012).

Ainsi, les études d'association, ajoutées aux analyses de liaison basées sur les familles, l'approche par gène candidat et l'identification de QTLs via création de souches congéniques chez le modèle animal viendrait se compléter afin de découvrir les gènes en cause dans la maladie complexe qu'est l'HTA et se rapprocher indubitablement de la médecine individualisée (Norrngard K., 2008).

#### **I-3.1.1.4 Approche par gènes candidats**

Les maladies complexes présentent des variations dans la sévérité des symptômes et l'âge de leur apparition, ce qui se traduit par des difficultés à définir un phénotype approprié et à sélectionner la population à étudier. Deuxièmement, leurs mécanismes étiologiques peuvent varier et impliquer diverses voies biologiques. Enfin, les maladies complexes sont plus susceptibles d'être causés par de nombreux gènes, chacun ayant une contribution individuelle infinitésimale, toujours selon le dogme de l'additivité. Ainsi, afin d'identifier les variants génétiques impliqués dans les formes multigéniques complexes de l'HTA, l'approche par gène candidat a été développée (Tabor H.K., *et al*, 2002). Cette méthode repose sur la recherche de variants situés dans des gènes connus pour leur implication dans l'homéostasie de la PA. Ces variants seraient à l'origine d'un changement de la protéine ou de son expression, ou encore, seraient en LD avec d'autres variants impliqués dans l'HTA. Cette approche sélectionne des gènes en fonction des connaissances déjà établies sur leur implication probable dans la régulation de la PA et est conduite selon une étude cas-témoins. Le séquençage de l'ADN des

patients hypertendus *versus* individus normotendus permet d'identifier les variants génétiques dans les gènes d'intérêt. Il faudra par la suite déterminer le mécanisme sous-jacent qui mène (ou non) au développement de la maladie. Ces études épidémiogénétiques doivent être conduites sur un nombre important d'individus. Si un variant apparaît plus fréquemment dans le groupe de patients, alors on peut en conclure qu'il joue un rôle dans la maladie ou bien qu'il est en LD avec un élément génétique en cause dans la maladie. Avant toute étude fonctionnelle sur le gène en question, cette approche nous donne une association statistique significative (risque 5%) entre le génotype et le phénotype. Il s'agit d'analyses d'association qui peuvent aussi se réaliser dans des familles via des tests de déséquilibre de transmission (Tabor H.K. *et al*, 2002, Cheyssac, C. *et al*, 2006).

Cette approche ne permet pas d'étendre nos connaissances puisqu'elle ne cible que des éléments déjà suspectés pour leur implication dans la régulation de la PA (Aurora P. *et al*, 2010). De plus, le manque de réplication des résultats obtenus au cours d'études d'association et les prédictions sur les mécanismes d'action de certains traits complexes encore mal connus constituent des points critiques. Pour cette raison l'approche par gène candidat est aujourd'hui délaissée face à d'autres approches telles que les GWAS (Tabor H.K. *et al*, 2002).

Cette méthode pourrait cependant toujours être utile notamment pour l'analyse des variants de faible fréquence allélique. De plus, l'approche par gènes candidats positionnels est utilisée pour compléter certaines études de liaisons combinées au WGS (Wilkening S. *et al*, 2009, Cheyssac, C. *et al*, 2006).

### **I-3.1.1.5 Séquençage de l'exome complet**

Il est possible aujourd'hui de séquencer l'ensemble des séquences codantes du génome, nommé exome. Ce dernier ne représente pas la majorité du génome (5%) mais il contiendrait 85% des mutations susceptibles de produire un phénotype pathologique. Ainsi, le *Whole Exome Sequencing* (WES) permet d'identifier les mutations en cause dans l'HTA même

lorsqu'il s'agit de variants génétiques rares qui n'étaient pas pris en compte par les GWAS (Choi M. *et al*, 2009, Franceschini N. *et al*, 2014).

### **I-3.2 Analyse de Loci à trait quantitatif chez le modèle animal**

Parmi les raisons à l'origine de la difficulté à identifier des gènes candidats pour la PA et l'HTA, on citera la faiblesse des études de liaisons pour les variants à effets modestes, les limites de l'approche par gènes candidat qui nécessite une connaissance préalable sur l'homéostasie de la PA et les GWAS qui nécessitent le recrutement d'un nombre considérable de personnes, génèrent beaucoup de faux-positifs et n'identifient pas de gènes candidats. Face à ces facteurs limitants, l'incorporation des études de loci à trait quantitatif s'avère nécessaire afin de venir compléter le panel de stratégies destinées à démêler l'origine génétique de l'HTA.

L'identification de gènes candidats pour la PA permettrait non seulement de décoder la nature de l'HTA essentielle, mais mènerait également à démystifier l'architecture génétique des traits complexes en général (Ehret, G. B., 2010).

#### **I-3.2.1 La Pression artérielle, un trait quantitatif**

##### **I-3.2.1.1 Définition d'un trait quantitatif**

Comme Fisher l'a démontré en 1918 dans son manuscrit intitulé «*The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance*», un trait quantitatif est sous l'effet de plusieurs gènes qui répondent chacun aux lois mendéliennes sur l'hérédité. Ce papier a marqué les débuts de la génétique quantitative (Fisher R.A., 1918).

Un trait quantitatif est un phénotype mesurable qui dépend de l'action cumulative de plusieurs gènes et de l'environnement. Ces facteurs peuvent varier en fonction des individus créant ainsi plusieurs phénotypes pour un seul trait se distribuant de façon continue ou normale (courbe en forme de cloche) au sein de la population. Les traits quantitatifs s'opposent aux caractères

qualitatifs qui sont généralement monogéniques et discontinus, existants sous deux (dichotomie) ou plusieurs formes. Le poids, la taille ou encore la PA sont des traits quantitatifs (Plomin, R. *et al*, 2009, Read, A. *et al*, 2008, Nature education, 2015, Koike G. *et al*, 1998, Grisel, J. E., 2000).

### **I-3.2.1.2 Définition d'un *locus* à trait quantitatif (QTL)**

Un locus se définit comme « l'emplacement précis d'un gène sur le chromosome qui le porte » (NIH, 2015). Les formes monogéniques rares d'HTA sont chacune déterminée par des loci individuels, chacun représenté généralement par un seul gène. Or, sachant qu'un trait quantitatif est polygénique, un *locus* à trait quantitatif (*Quantitative Trait Locus*, QTL) a été défini comme une région chromosomique abritant plusieurs gènes responsables du phénotype d'intérêt (Grisel, J. E., 2000). Ainsi, il existe un conflit sémantique quant à la définition d'un QTL: s'agit-il d'un gène ou d'un ensemble de gènes impliqués dans le phénotype? Les études sur l'HTA essentielle ont montré que plusieurs QTLs de PA peuvent se situer les uns à côté des autres et chacun ayant un effet sur la variation de la PA, contrairement aux formes monogéniques (Deng A.Y., 2007).

Ainsi, nous considérerons dans cette thèse qu'un QTL, contenu dans une région chromosomique, correspond à un locus abritant un gène potentiellement candidat pour la PA (Deng A.Y., 2007).

L'étude des QTLs relève d'une méthode statistique qui relie d'une part des données phénotypiques, soit des mesures du trait en question, et d'autre part des données génotypiques, soit des marqueurs moléculaires. Ainsi, des gènes situés dans des régions chromosomiques précises pourront être identifiés, et éventuellement leur mode d'action et leur interaction.

Afin de procéder à l'analyse de QTLs, les chercheurs nécessitent deux éléments. Premièrement, deux ou plusieurs souches d'un modèle animal, contrastantes génétiquement par rapport au trait étudié. Dans le cadre de cette thèse, les souches de rats hypertendus Dahl *salt-sensitive* et normotendus Lewis ont été utilisées. Deuxièmement, des marqueurs

génétiq ues moléculaires qui se distinguent entre ces deux souches (polymorphiques) et qui ne risquent pas d'affecter le phénotype. Parmi ces marqueurs, les polymorphismes mononucléotidiques (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), des répétitions de séquences simples (simple sequence repeats, SSRs) appelées aussi microsatellites, des polymorphismes de longueur des fragments de restriction (*restriction fragment length polymorphism*, RFLPs) et les positions des éléments transposables du génome, dits aussi transposons (Deng A.Y., 2007).

### **I-3.2.2 Le rat comme modèle animal**

Dans le but de déterminer l'étiologie génétique des traits complexes, des études sur les modèles animaux, notamment sur les rongeurs fournissent des avantages par rapport aux études réalisées sur l'humain. Outre le fait que cette méthode ne nécessite aucun a priori sur l'étiologie de l'HTA, il est beaucoup plus évident de contrôler la variance environnementale des animaux en laboratoire et donc d'isoler la variance génétique. De plus, la reproduction contrôlée de ces animaux nous permet de travailler sur un génome homogène et sur un grand nombre d'individus vu la taille des portées et ceci dans un laps de temps raisonnable puisque la gestation chez ces animaux n'est que de 21 jours.

Le rat est le modèle de choix pour l'étude de l'HTA. En effet, l'HTA spontanée ne se produit pratiquement pas chez la souris et le rat étant plus gros que la souris favorise les analyses physiologiques sur la PA. Cependant, la technologie *Knock-out* étant plus réalisable chez la souris, des études incluent de plus en plus cette dernière dans leurs expériences (Pinto Y., 1998).

Le génome du rat (2,75 Gb), constitué de 22 paires de chromosomes, est légèrement plus petit que celui de l'Homme (2,9 Gb) mais plus grand que celui de la souris (2,5 Gb). Ces trois génomes codent pour le même nombre de gènes et la plupart des gènes impliqués dans des pathologies chez l'humain retrouvent leurs orthologues chez le rat (Gibbs, R. A., 2004).

Ainsi, il existe une grande homologie génétique entre l'humain et le rongeur, indiquant qu'une grande partie du génome a été conservée entre ces espèces durant l'évolution; 90% du génome du rat est similaire à celui de l'Homme. Ainsi la localisation d'un QTL dans le génome murin est susceptible de trouver son homologue chez l'humain (Grisel, J. E., 2000).

#### **I-3.2.2.1 Souches de rats**

Plusieurs souches de rats consanguines ont été développées pour l'étude de l'hypertension. Celles-ci sont bien caractérisées d'un point de vue génétique. En effet, les génomes de nombreuses souches ont été génotypés et séquencés et sont accessibles via des bases de données informatiques: *Rat Genome Database* (RGD), *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics* (UCSC), *Ensemble Genome Browser* (EGB) etc...

Parmi les souches de rats hypertendues utilisées, on distingue les souches spontanément hypertendues: *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR), *Spontaneously hypertensive rats-stroke prone* (SHRSP), *Lyon Hypertensive* (LH), *Milan Hypertensive Strain* (MHS), *Prague hypertensive rat* (PHR) et les souches chez lesquelles le phénotype hypertendu est provoqué sous contraintes environnementales: *DOCA salt-sensitive rats* (SBH), *Dahl Salt-Sensitive Rats* (DSS), *Inherited stress-induced arterial hypertension rats* (ISIAH). D'autres souches hypertendues ont été créées en combinaison avec d'autres pathologies métaboliques telles que le diabète et l'obésité (*Cohen-Rosenthal diabetic-hypertensive rats*, *Zucker rats*, *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats*, *James C Russell corpulent rats* etc...). Quant aux souches normotendues, nous citerons *Lyon Normotensive* (LN), *Milan Normotensive Strain* (MNS), *Wistar Kyoto Strain* (WKS), *Prague normotensive rat* (PNR) *DOCA salt-resistant rats* (SBN), *Dahl Salt-Resistant* (DSR ou SR/Jr) et *Lewis* (LEW) (Doggrell, S., 1998, Rapp JP., 2000).



### I-3.2.2.2 Le rat *Dahl salt-sensitive*

#### I-3.2.2.2.1 Création du modèle Dahl

La compréhension de l'HTA sel-dépendante chez l'humain a été facilitée à l'aide de la réalisation de souches consanguines de rats, notamment les rats Dahl/John Rapp *salt-sensitive* (DSS ou SS/Jr) et *salt-resistant* (DSR ou SR/Jr) développées à partir de la colonie hétérogène originelle Sprague-Dawley (Deng A.Y., 1998, Garrett M.R., *et al*, 1998).

Dans les années 60, Lewis K. Dahl et ses collaborateurs ont découvert que lorsque les rats ayant subi une greffe de rein étaient sous une diète faible en Na<sup>+</sup> (0,3% NaCl), la PA était déterminée par le génotype du rein donneur, mais pas lorsqu'ils étaient sous une diète riche en Na<sup>+</sup> (8% NaCl), suggérant que des facteurs extra-rénaux influencent la PA. C'est ainsi que le rat *Dahl Salt-Sensitive* a été développé comme modèle d'HTA sel-dépendante (Deng A.Y., 1998, Garrett M.R., *et al*, 1998).

L'apparition de l'HTA et de l'insuffisance cardiaque chez les rats SS/Jr peut être contrôlée par dosage de la quantité de sel dans leur alimentation (Doggrell S., 1998, Garrett M.R. *et al*, 1998). En effet, l'addition de NaCl à 8% dans la diète des rats SS/Jr âgés de 6 semaines mène au développement de l'HTA NO-dépendante sévère, contrairement aux rats résistants au sel sous une même diète. Cependant un tel régime mène à une PAM supérieure à 240 mm Hg (parfois jusqu'à 300 mmHg) et donc au décès des animaux (généralement par AVC). Même sous un régime à teneur en sel normale (1% NaCl) l'HTA va s'établir progressivement chez ces rats, via l'augmentation de la RPT (Garrett M.R., *et al*, 1998, Rapp JP. *et al*, 1998). Les caractéristiques et symptômes observés chez ce modèle sont très similaires à ceux observés dans la population humaine. On observe chez SS/Jr une élévation de l'expression des ARNm des sous-unités des canaux ENaC rénaux et de la kinase SGK1 activatrices des ENaC de même qu'une augmentation de l'activité des cotransporteurs NKCC2 et une diminution de celle des pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases. Les rats mâles développent de l'HTA plus rapidement et de façon plus importante que les femelles (Rapp JP. *et al*, 1982, Zicha, J.*et*

al, 2012). Il est intéressant de noter que ces rats, en plus de développer une insuffisance rénale, déclarent également une dysfonction diastolique qui s'empire avec l'âge et qui se traduit par une HVG à partir de 11 semaines d'âge comme nous l'avons montré dans les articles intitulés « *Combining distinctive and novel loci doubles BP reduction, reverses diastolic dysfunction and mitigates LV hypertrophy* » (Crespo K. et al, 2013 (b)) et « *Unique Quantitative Trait Loci in Synergy Permanently Improve Diastolic Dysfunction* » (Chauvet, C., Crespo, K. et al, 2013 (c)).

La PA chez ce modèle répondant à une inhibition du SRAA, les diurétiques, les vasodilatateurs et les antagonistes des récepteurs de l'endothéline exercent une action efficace ici, contrairement aux inhibiteurs des canaux calciques et aux bêtabloquants dont l'effet est moindre (Pinto Y. *et al*, 1998).

Comme tout modèle d'HTA, les rats SS/Jr présentent naturellement une hypertrophie cardiaque pouvant être appréciée par le poids du coeur. De même, le poids du cerveau reflète l'oedème cérébral chez les rats ayant subi un AVC. Des dommages rénaux peuvent également être observés chez ces modèles hypertendus (Rapp JP., 2000).

Le contrôle normotendu correspondant à ce modèle est SR/Jr (ou DSR), cependant SS/Jr et SR/Jr présentent des variations physiologiques qui n'affectent pas seulement la PA ne permettant pas de créer un lien direct entre génotype et phénotype. D'où l'utilisation du modèle Lewis (Lew), dérivée de la colonie Wistar, comme souche contrastante. La souche SS/Jr possède d'ailleurs plus de marqueurs microsatellites polymorphiques avec Lew (45%) qu'avec SR/Jr (18%) et Lew est plus résistante à une diète riche en sel que SR/Jr (**Tableau I**) (Garrett M.R., *et al*. 1998, Deng A.Y., 1998). De plus, les individus issus du croisement entre SS/Jr et Lew présentent plus de QTLs associés à la PA dont certains ont déjà été mis en évidence chez l'humain, que lorsque DSS est comparée à SR/Jr (Deng A.Y., 1998).

**Tableau I: Comparaison des PAS et du poids des rats Lewis et SR/Jr sous une diète riche en sel (8% de NaCl)**

(extrait de Garrett M.R., *et al*, 1998).

No. of weeks on diet	LEW (no.)		R (no.)		Two-way ANOVA		
	0.2% NaCl (8)	8% NaCl (8)	0.2% NaCl (10)	8% NaCl (10)	strain	diet	interaction
	<i>Blood pressure (mmHg)</i>						
4	141 ± 1.8	140 ± 4.4	143 ± 1.9	150 ± 3.5	0.051	0.26	0.24
8	141 ± 3.3	152 ± 4.5	142 ± 2.2	159 ± 2.0	0.17	<0.001	0.34
16	135 ± 5.1	142 ± 2.6	132 ± 3.1	150 ± 2.3	0.40	<0.001	0.12
24	131 ± 3.3	140 ± 2.5	141 ± 3.2	156 ± 4.0	0.001	0.001	0.43
	<i>Body weight (grams)</i>						
4	284 ± 6.2	286 ± 4.4	238 ± 4.7	243 ± 5.5	<0.001	0.48	0.79
8	375 ± 7.1	352 ± 4.6	313 ± 4.8	309 ± 6.3	<0.001	0.028	0.11
16	455 ± 9.1	409 ± 5.1	379 ± 5.7	365 ± 6.4	<0.001	<0.001	0.029
24	506 ± 12.4	452 ± 5.2	422 ± 5.4	407 ± 5.7	<0.001	<0.001	0.011

Means ± s.e. are given; (ANOVA) analysis of variance.

**I-3.2.2.2 Effets du phénotype sexuel**

Des études statistiques ont montré que ce n'est qu'à partir de l'adolescence (12 ans et plus) que la différence de PA s'observe entre les hommes et les femmes. Cette différence s'observe aussi chez les animaux et ce dans plusieurs espèces, des mammifères aux oiseaux (Sandberg K, 2012).

Les rats SS/Jr soumis à une diète normale ou à forte concentration en sel (1 à 8% de NaCl) développent de l'HTA proportionnellement au pourcentage de NaCl et la différence mâle/femelle s'amplifie plus la diète est riche en sel. De plus, certaines études ont également montré que même si la PA reste identique entre les mâles et les femelles, les conséquences

cardiovasculaires sont en revanche bien plus marquées chez les mâles. Les mâles SS/Jr ont une PA supérieure d'environ 30 mm Hg par rapport aux femelles (Sandberg K, 2012).

Dans le SRAA, plusieurs travaux chez le modèle animal semblent suggérer que la PA plus basse observée chez les femelles serait due à leur capacité de maintenir des taux en ANG II plasmatique et tissulaire plus bas, de même qu'un nombre de récepteurs membranaires AT1 inférieur à ceux des mâles. Quant aux mâles, ils présentent une expression diminuée des récepteurs de l'ANG II AT2, d'où une diminution de la PA AT2-dépendante amoindrie par rapport aux femelles. Des données sur des diètes riches en gras et/ou en fructose viennent aussi démontrer l'impact protecteur du sexe féminin. L'insuffisance placentaire ou une malnutrition pendant la gestation mène à la naissance de rats mâles hypertendus à 12 semaines d'âge alors que les femelles ont une PA normale. Des rats transgéniques ou K.O pour certains gènes ont également montré des différences inter-sexes. La femelle serait plus stimulée par la voie hypothalamo-hypophysaire-surrénalienne de régulation de la PA suite à un stress. D'où, dépendamment de la méthode utilisée pour mesurer la PA, si celle-ci entraîne un stress pour l'animal, les mesures pourraient être faussées (Sandberg K, 2012).

Ces données expérimentales coïncident avec les données cliniques récoltées chez l'humain puisque les femmes auraient des taux de rénine et prorénine inférieurs à ceux des hommes. Les femmes ménopausées ou souffrant d'insuffisance ovarienne présentent une PA plus élevée que celle préménopausées du même âge, qui s'accompagne d'une élévation des taux de LH et FSH. Chez les hommes, avec l'âge, le taux de testostérone baisse et la PA s'élève (Sandberg K, 2012).

Des études ont montré que certains QTLs de PA mis en évidence par des souches congéniques chez les mâles ne sont pas retrouvés chez les femelles et *vice versa*, venant renforcer l'existence d'une régulation de la PA sexe-dépendante (Deng AY. *et al*, 2008). Ainsi, dans le but de simplifier les analyses de QTLs, les mâles sont généralement utilisés dans ces études puisqu'ils développent plus rapidement l'HTA et sont plus gros que les femelles, permettant de faciliter les mesures de PA (Rapp JP., 2000).

### I-3.2.3 Notre stratégie génétique

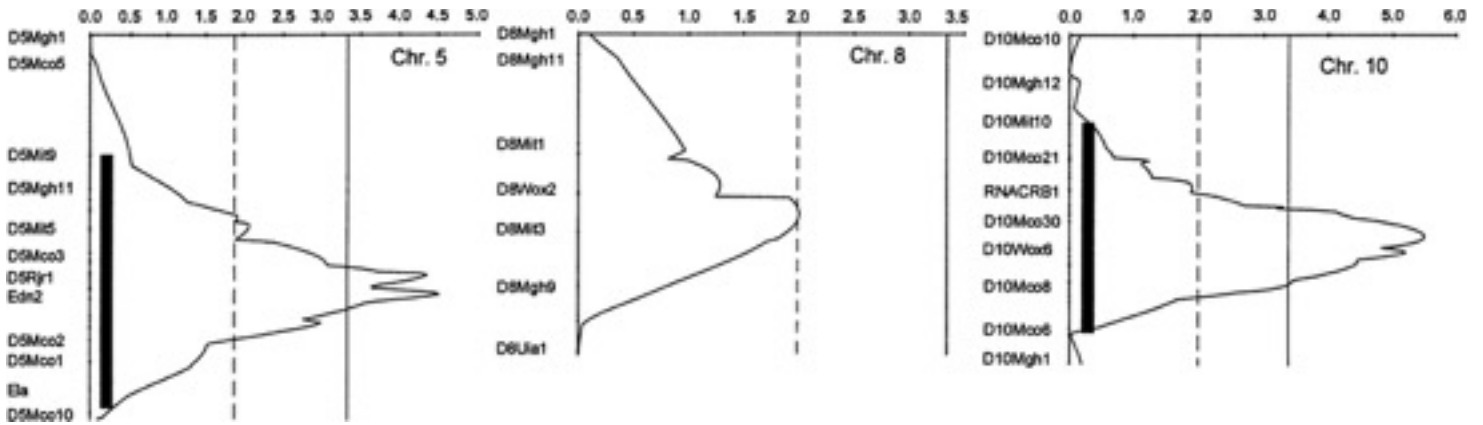
À partir de ces modèles de rats, des analyses de liaison génétiques ont été menées afin de déterminer les régions du génome contenant des QTLs à l'origine du phénotype hypertendu (**Figure 6**).

Cependant, ces études de liaison ne permettent qu'une corrélation entre une région chromosomique et la variation de PA sans établir de cause à effet direct. De plus, les régions identifiées font minimum 20 cM et cette technique ne permet pas de séparer deux QTLs proches et liés, d'où la difficulté à déterminer le nombre de QTLs compris dans ces grandes régions chromosomiques. Celle-ci donne beaucoup de faux positifs et faux négatifs et si elle détecte des régions arborant des QTLs, elle ne permet pas de mettre en évidence les interactions entre QTLs.

C'est dans ce contexte que la réalisation de souches congéniques où un segment chromosomique d'intérêt a été sélectivement remplacé chez une souche receveuse par le segment homologue d'une autre souche dite donneuse (voir Chapitre II - Méthodes), vient jouer un rôle indispensable afin de déjouer ces limitations. Les congéniques sont même devenus la méthode de choix dans la localisation des QTLs pour la PA et l'identification de gènes candidats pour l'HTA (Deng A.Y., 1998, Rapp J.P., 2000, Duong C. et al, 2007, Deng A.Y. *et al*, 2008).

Cette stratégie génétique passe par cinq étapes. La première est l'identification de larges régions chromosomiques contenant des QTLs pour la PA, par analyse de liaison. La deuxième consiste en la production de souches congéniques afin de réduire la région d'intérêt. Puis une cartographie génétique affinée est réalisée via la création de sous-souches congéniques dont le but est l'isolement individuel des QTLs. Le phénotype de ces dernières est analysé (variations biochimiques, physiologiques). Enfin, l'identification de gènes candidats potentiels pouvant jouer un rôle dans le développement de l'HTA est permise via

détection de mutations fonctionnelles ou de variations de leur niveau d'expression (Deng A.Y., 1998, Rapp JP., 2000, Duong C. et al, 2007, Deng AY. *et al*, 2008).



**Figure 6: Exemple d'études de liaison pour les chromosomes 5, 8 et 10**

réalisées par Garrett MR. *et al*, pour lesquelles des évidences statistiques de liaison, suggestive (ligne en pointillé,  $2 < \text{LOD score} < 3,3$ ) ou significative (ligne solide,  $\text{LOD score} > 3,3$ ) sont montrées. Les barres épaisses noires représentent les régions Lew qui ont été introduites chez SS/Jr via la réalisation de souches congéniques. Les marqueurs ciblant la région chromosomique d'intérêt sont indiqués sur l'axe des ordonnées et les LOD scores sur l'axe des abscisses.

(Figure extraite de Garrett MR. *et al*, 1998)

## I.4. Interactions génétiques

Selon la théorie polygénique de l'origine génétique de l'HTA essentielle, les QTLs auraient chacun un effet individuel minime sur le phénotype global et c'est l'accumulation de ces nombreux QTLs qui mènerait au phénotype hypertendu. Ce postulat implique l'existence d'un seuil phénotypique qui serait franchi en présence d'un nombre suffisant de QTLs générant l'HTA. Cette hypothèse permet alors d'expliquer pourquoi aucun QTL ayant un effet drastique sur la PA n'a été découvert chez l'humain dans les études réalisées à l'échelle des populations. L'existence d'un tel seuil écarterait les notions de dominance et récessivité des allèles (Ji W. *et al*, 2008, Deng AY., 2007).

Cependant, le modèle animal nous a permis d'identifier des QTLs dont certains exercent des effets modestes sur la variation de PA (<5% de la variance totale) et d'autres ayant des effets plus conséquents (>30% de la variance totale), suggérant donc que la présence d'un seul QTL est suffisante pour faire varier le phénotype. En effet, sur 10 QTLs trouvés sur le chromosome 10, le C10QTL1 est à lui seul responsable de 45% de la différence totale de PA entre SS/Jr et LEW. Chaque QTL individuellement suffit à faire varier la PA; aucune combinaison entre QTLs n'est nécessaire pour influencer le phénotype. Ces QTLs, indépendants les uns des autres, agissent alors selon un mode d'hérédité mendélienne. Ces derniers correspondent à des traits monogéniques pouvant en effet être de nature dominante, récessive ou partiellement dominante (Ji W. *et al*, 2008, Deng AY., 2007, Duong C. *et al*, 2007, Deng AY., 1998).

## I-4.1 Interactions alléliques

Un gène est constitué de deux allèles, l'une provenant de la mère et l'autre du père. Ces deux copies du gène interagissent ensemble pour déterminer un phénotype en particulier. Ces interactions alléliques peuvent être de nature dominante si le phénotype apparaît autant chez les individus homozygotes qu'hétérozygotes, récessive si seuls les individus homozygotes présentent le phénotype ou co-dominante si un phénotype intermédiaire, combiné existe chez les hétérozygotes (NIH, 2015).

Des travaux réalisés au sein de notre laboratoire par Duong C. *et al* sur des congéniques hétérozygotes dont le fond génétique (souche receveuse) est SS/Jr ont dévoilé que 8 QTLs sur 10 situés sur le chromosome 10 montraient une dominance du génome normotendu LEW puisque seule une allèle LEW est suffisante pour faire diminuer la PA au même niveau que les individus homozygotes « LL », l'allèle SS/Jr étant alors récessive. De la même façon, un QTL sur le chromosome 2 implique une dominance du génome SS/Jr puisque dans ce cas une seule allèle normotendue ne suffit pas pour faire baisser la PA (Duong C. *et al*, 2007).

Il est intéressant de prendre en considération que la dominance peut aussi être interprétée comme une haploinsuffisance, c'est-à-dire que lorsqu'un gène est hétérozygote pour une mutation, le phénotype mutant se développera car une seule copie (allèle) du gène normal (*Wild Type*, WT) ne permet pas de produire une quantité suffisante de protéine pour assurer sa fonction normale (Duong C. *et al*, 2007, NIH, 2015).

En se basant sur cette définition, la dominance impliquerait un gain ou une perte de fonction, ainsi, la recherche de QTLs présentant des mutations responsables de causer une hausse ou une baisse de PA doit être envisagée. Pour un QTL situé sur le chromosome 17, l'allèle LEW apparaît partiellement dominante. Dans ce cas, ce QTL montre une dominance incomplète vue que la variation de PA est proportionnelle au nombre d'allèles SS/Jr (Duong C. *et al*, 2007).



## I-4.2 Effet du fond génétique

### I-4.2.1 Effet de position

L'unicité génétique d'une souche de rat repose sur plusieurs facteurs, parmi lesquels l'effet de position qui peut affecter la fonction d'un gène. Ce phénomène comprend divers mécanismes qui surviennent lors des réarrangements chromosomiques pendant la méiose et plus occasionnellement pendant la mitose, tels que les duplications, les délétions, les insertions, les inversions, les translocations, les transpositions, les conversions géniques et les recombinaisons inégales. L'ensemble de ces événements, propres à un génome en particulier, peuvent influencer la présence de QTLs pour la PA dans les souches congéniques de rats (Deng AY., 1998).

Afin de contourner ce phénomène, il est donc nécessaire de produire de nombreuses souches congéniques qui possèdent toutes des régions chromosomiques substituées différentes, ne se chevauchant pas.

### I-4.2.2 Importance de la souche donneuse et spécificité des populations

Des souches congéniques réalisées à partir de différents croisements entre SS/Jr et diverses souches normotendues (SR/Jr, LEW, WKY, MNS) ne détectent pas tous les mêmes QTLs pour la PA. C'est le cas par exemple du gène *Atp1a1* (*ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide*) qui a été identifié comme un candidat pour la PA dans des croisements entre SS/Jr et MNS ou WKY mais pas avec LEW ou SR/Jr. Un autre exemple est celui du gène *Ace* (*Angiotensine I converting enzyme*), gène candidat pour la PA dans des populations F2 issues d'un croisement entre SS/Jr et MNS mais pas avec WKY. Cette spécificité des populations a également été mise en évidence chez l'humain, pour le même locus, certaines populations seulement montrent une association entre *ACE* et l'HTA essentielle. Ainsi, la co-ségrégation d'allèles d'un QTL spécifique avec la PA est dépendante de la population étudiée et donc du fond génétique (**Tableau II**) (Deng AY., 1998 et 2007 (c)).

## Tableau II: Associations génétiques populations-dépendantes

(extrait de Deng, AY, 2007(c))

Résultats issus de GWAS dans plusieurs populations. *ACE*, angiotensin-converting enzyme; *ADD1*, alpha-adducin; *ADRA2*, alpha-2 adrenergic receptor 2; *AGT*, angiotensinogen; *AGTRI*, angiotensin receptor 1; *CYP11B2*, aldosterone synthase; *END*, endothelin; *Endrb*, endothelin receptor; *Npr1*, natriuretic peptide receptor 1 et *NOS*, nitric oxide synthase.

Genes	Populations Showing Positive Association	Populations Showing Negative Association
<i>ACE</i>	Croatian population Mongolian male population Dutch population	Han Chinese population Kazakh population of Barkol Korean population African and Latino American populations Pakistani population Nigerians, Jamaicans and African American populations Han Chinese population Korean population
<i>ADD1</i>	Korean population Italian population	Slovenian population
<i>ADRA2</i>	Swedish population	Caucasian and African American populations Han Chinese population
<i>ADRB2</i>	Yi non-Han Chinese population Han Chinese population	Hani non-Han Chinese population Korean population
<i>AGT</i>	Korean population African and Caucasian American populations Malaysian population Tibetan female population Taiwan population	European population Tibetan male population
<i>AGTRI</i>	African American population	Croatian population Mongolian population Korean population Dutch population Latino American populations Han Chinese population Korean population Japanese population French population
<i>CYP11B2</i>	African American population Japanese population Yi and Hani non-Han Chinese	Latino American population Han Chinese population Korean population European population
<i>END, ENDR</i>		Japanese populations
<i>NOS</i>	Brazilian white and black population Flander population Women of American white and black populations African American population	Turkish population Northern Han Chinese population Serbian population European Caucasian population Japanese population
<i>RENIN</i>	Korean population Emirati population	

L'article « *Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes* », de **Crespo K., Chauvet C. et al**, que nous avons publié en **2011 (Annexe 1)**, démontre que la normotension n'est pas régulée par les mêmes QTLs en fonction des souches normotendues considérées. Pour cette étude, une congénique réciproque réalisée dans le fond génétique Lew chez qui des allèles SS ont été introduites au niveau du chromosome 7, nommée C7L.S, ne montrait pas d'effet sur la PA comparée à la souche parentale normotendue LEW, contrairement à la congénique C7S.L pour laquelle les allèles LEW introduites dans le fond SS/Jr entraînaient une diminution significative de la PA par rapport à SS/Jr. Ainsi, l'existence du QTL situé sur le chromosome 7, dit C7QTL, est dépendante du génome SS/Jr. De plus, parmi les gènes candidats potentiels pour ce QTL, trois gènes: *Tac2* (Tachykinin 2), *Nxph4* (Neurexophilin 4) et *Rdh2* (Retinol dehydrogenase 2) exhibent des mutations non synonymes entre SS/Jr et LEW mais leurs séquences sont similaires lorsque l'on compare SS/Jr et SR/Jr. En revanche, les gènes *Cyp11b1* (11-beta-hydroxylase), *Cyp11b2* (Aldosterone synthase) et *Cyp11b3* (Cytochrome P-450 11B3) sont identiques entre SS/Jr et LEW mais différents entre SS/Jr et SR/Jr (Cicila GT. et al, 1993, **Crespo K. et al, 2011 (Annexe 1)**). Ainsi, ces résultats démontrent que différents gènes contrôlent la normotension chez LEW et SR/Jr et démontrent l'importance du fond génétique sur la régulation de la PA. Ces données doivent être prises en compte dans l'approche par gènes candidats puisque ces derniers ne seront pas les mêmes en fonction de la population choisie, de même que dans les GWAS. Cette spécificité des populations peut être extrapolée chez l'homme et ainsi contribuer à la compréhension du développement de l'HTA dans différentes ethnies (**Crespo K. et al, 2011 (Annexe 1)**).

### I-4.2.3 L'apport des souches réciproques

Suite à ces travaux, la réalisation d'autres souches congéniques réciproques, soit ayant un fond génétique normotendu (LEW) et des allèles hypertendus (SS/Jr) pour un QTL en particulier nous a permis de déterminer le rôle que les QTLs jouent dans la normotension dans la souche LEW. En effet, les allèles SS/Jr introduites dans le génome LEW pour certains QTLs spécifiques situés sur les chromosomes 2, 7 et 18 n'ont pas montré d'effet sur la PA, non pas parce que ces QTLs n'ont pas d'effets puisque lorsque ces allèles sont LEW, dans un fond génétique SS/Jr ils entraînent une variation significative de la PA par rapport à la souche parentale. Le génome hypertendu SS/Jr semble alors avoir perdu sa capacité à faire diminuer la PA, contrairement à la souche normotendue LEW. Deux hypothèses permettraient d'expliquer ces résultats (Charron S. *et al*, 2006, **Crespo K. *et al*, 2011 (Annexe 1)**).

La première repose sur le nombre de QTLs diminuant la PA qui serait supérieur à celui des QTLs qui l'augmente dans la souche normotendue LEW. Cependant, si cela était le cas, on s'attendrait à voir une diminution de la PA d'autant plus importante lorsque des QTLs diminuant la PA sont ajoutés au génome LEW. Or, aucun effet n'a été observé dans ces conditions, cette hypothèse a donc été écartée (Charron S. *et al*, 2006). De plus, le génome normotendu semble inhiber l'élévation de la PA, autant en réponse aux QTLs qui diminuent la PA qu'à ceux qui l'augmentent puisque lorsque l'on remplace un QTL dont les allèles font augmenter la PA chez LEW par des allèles qui font aussi augmenter la PA mais provenant de SS/Jr, on observe aucun effet (Charron S. *et al*, 2006, **Crespo K. *et al*, 2011 (Annexe 1)**).

Ainsi, une explication logique face à ces résultats serait que les allèles SS/Jr qui augmentent la PA se trouvent inhibées lorsqu'elles se retrouvent dans un fond génétique LEW. Nous avons ainsi déduit que les QTLs ne peuvent pas maintenir individuellement la normotension chez LEW mais qu'il doit exister des « supprimeurs » de l'HTA chez cette souche normotendue qui interagiraient avec les QTLs influençant la PA.

En contrepartie, l'HTA serait donc causée par des QTLs individuels ainsi que par un manque d'inhibition de ces QTLs dans la souche SS/Jr.

Nous avons également observé que la génération F1 hétérozygote issue d'un croisement entre SS/Jr et LEW présente une PA semblable à celle de LEW, suggérant une dominance du génome Lewis (Charron S. *et al*, 2006, **Crespo K. et al, 2011 (Annexe 1)**).

Ces données viennent renforcer l'existence de suppresseurs ou inhibiteurs de l'HTA chez les individus normotendus, par opposition à celle de stimulateurs de l'HTA chez les hypertendus, ce que nous avons mis en évidence dans l'article intitulé «*Hypertension Suppression, Not a Cumulative Thrust of Quantitative Trait Loci, Predisposes Blood Pressure Homeostasis to Normotension*» de **Crespo K. et al**, publié cette année (**Annexe 2**).

Alors que la plupart de la recherche fondamentale et clinique se concentre sur les causes de l'HTA, nous nous sommes intéressés, dans cet article, à l'origine de la normotension, qui, après tout, est plus fréquente dans la population générale. Ainsi, via une démarche originale (création de multiples congéniques), en augmentant systématiquement le nombre de QTLs associés à l'HTA chez la souche normotendue, résistante à l'augmentation de la PA (Lewis), nous n'avons pas observé une hausse de la PA proportionnelle avec le nombre de QTLs ajoutés. Puis en diminuant progressivement la part du génome normotendu via des croisements en retour entre des individus F1 et la souche parentale SS/Jr, cette fois non sélectionnés pour une région en particulier, nous avons localisé une région du chromosome 18 qui contiendrait un potentiel suppresseur de l'HTA à l'origine de la normotension chez LEW. Ces résultats viennent s'opposer à la théorie de l'additivité des QTLs. L'identification moléculaire d'un locus anti-hypertenseur résulterait en de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques dans la prévention ou la résistance à l'HTA (**Crespo K. et al, 2015 (Annexe 2)**).

### **I-4.3 Interactions géniques: additivité *versus* épistasie**

Les animaux hypertendus possèdent à la fois des QTLs responsables de faire augmenter la PA et des QTLs responsables de la diminuer et il en est de même pour les rats normotendus (Ariyarajah A. *et al*, 2004, Eliopoulos V. *et al*, 2005, Palijan A. *et al*, 2003, Ji W. *et al*, 2008). Par conséquent, la régulation de la PA doit être interprétée comme un équilibre entre les allèles qui diminuent la PA et celles qui l'augmentent (Deng AY., 2007(a)).

Dans ce contexte, comment est-ce que ces QTLs interagissent pour mener au phénotype hypertendu et/ou normotendu ?

Dans le but de répondre à cette question, une première hypothèse suggère qu'il existerait plus de QTLs responsables de faire baisser la PA dans le génome LEW que de QTLs qui l'augmentent et inversement pour le génome SS/Jr, se basant ici sur l'additivité des effets des QTLs. Dans ce cas chaque QTL agirait selon une voie/cascade de régulation différente, parallèle dont les effets s'additionneraient pour mener à l'HTA dans la souche hypertendue ou à la normotension chez les individus normotendus (Charron S. *et al*, 2006).

Or, comme nous l'avons vu plus tôt, la normotension chez Lewis est déterminée par une régulation plus complexe du génome.

De plus, en prenant ici l'exemple du chromosome 10, l'effet cumulatif des 10 QTLs présents dans la souche congénique ferait diminuer la PAM de plus de 400 mm Hg. Or, cette valeur excessive ne reflète pas la différence de PAM observée entre les deux souches parentales SS/Jr et LEW qui est d'environ 88 mm Hg. Comment peut-on alors expliquer la réalité physiologique observée via l'ensemble de ces QTLs (Palijan *et al.*, 2003, Charron S. *et al.*, 2005, Dutil J. *et al.*, 2005, Deng AY., 2007 (c))?

La deuxième théorie soutient alors l'existence d'une interaction entre les QTLs, connue sous le nom d'épistasie. Ce phénomène, décrit depuis de nombreuses années, correspond à l'effet, généralement une inhibition, qu'un QTL exerce sur un autre QTL. Autrement dit, selon

la définition de Bateson de 1909 (en génétique mendélienne), un gène est dit épistatique lorsque ses allèles masquent les effets phénotypiques d'un autre gène, alors qualifié d'hypostatique (Bateson W., 1909).

Il est possible d'étudier ce phénomène via la combinaison de double congéniques dont la technique est décrite dans le « Chapitre II - Méthodes ». Ainsi, la souche issue de la combinaison entre un QTL1 et un QTL2 montrant des effets similaires à ceux observés avec le QTL2 seul, suggère que ces deux QTLs agissent de façon épistatiques entre eux.

Les QTLs, correspondant à des traits monogéniques et suivant un modèle d'hérédité mendélienne, peuvent donc interagir entre eux de façon additive ou épistatique. Ce dernier type d'interaction permettrait cependant d'expliquer la redondance de l'effet des QTLs observée chez le modèle murin. L'épistasie renseignerait non seulement sur le mécanisme par lequel le génome normotendu LEW inhibe les gènes responsables d'augmenter la PA (« suppresseur » de l'HTA), mais serait également à l'origine du développement de l'HTA chez la souche SS/Jr. Avec ce concept une nouvelle dimension vient s'ajouter à la complexité du control polygénique de la PA (Charron S. *et al*, 2006, Crespo K. *et al*, 2011 (Annexe 1)).

#### **I-4.4 Rôle fondamentale de l'épistasie dans la régulation de la PA**

La détermination du sexe chez la drosophile et le nématode (Hodgkin J., 1990) de même que chez les mammifères (McLaren A.,1988), le control du cycle cellulaire chez la levure (Hereford L. M. *et al*, 1974), certains motifs embryonnaires chez la drosophile (Schüpbach T.,1987), le développement de la vulve (Ferguson, E. L. *et al*, 1987) et la mort cellulaire programmée chez *Caenorhabditis elegance* (Ellis, H. M. *et al*, 1986) sont autant de phénomènes dont la régulation est soumise aux interactions intergéniques (Avery L. *et al*, 1992).

Chez l'humain, Lynch *et al*, pour citer un exemple, ont démontré la présence d'une interaction épistatique entre les gènes *Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)* et *Angiotensinogen (AGT)*

dans le système SRAA et leur effet sur la masse ventriculaire gauche parmi des sujets hypertendus provenant de l'étude *Hypertension Genetic Epidemiology Network*. (Lynch, A. I. *et al*, 2012).

Avery et Wassermann ont montré en 1992 que l'épistasie permet de déterminer l'ordre d'action des gènes dans une hiérarchie régulatrice, en comparant le phénotype d'un double mutant avec celui de mutants simples. Ceci sans connaissance quant à la nature des mutations ou du mécanisme moléculaire de la voie de régulation en question (Avery L. *et al*, 1992).

Ainsi, l'étude des interactions intergéniques nous permettrait d'une part d'expliquer la normotension des rats Lewis comme nous l'avons vu précédemment. D'autre part, l'épistasie constituerait un outil à l'aide duquel il devient possible de déterminer quels QTLs fonctionnent ensemble pour mener à la régulation de la PA, ainsi que l'ordre hiérarchique selon lequel ces QTLs agissent dans une voie de régulation.

L'épistasie étant l'explication la plus logique à l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent sur la génétique de l'HTA autant chez le modèle expérimental que l'humain, nous avons voulu étudier les interactions intergéniques qui pourraient être à l'origine de l'HTA chez le rat SS/Jr et ceci de façon biologique, fonctionnelle par opposition à l'approche statistique utilisée dans les analyses de liaison et d'association. Nous avons donc utilisé la méthode des doubles et multiples souches congéniques afin de prouver fonctionnellement l'existence de relations épistatiques entre les QTLs pour la PA et ainsi essayer d'approfondir nos connaissances sur l'homéostasie de la PA et l'HTA.



## **CHAPITRE II**

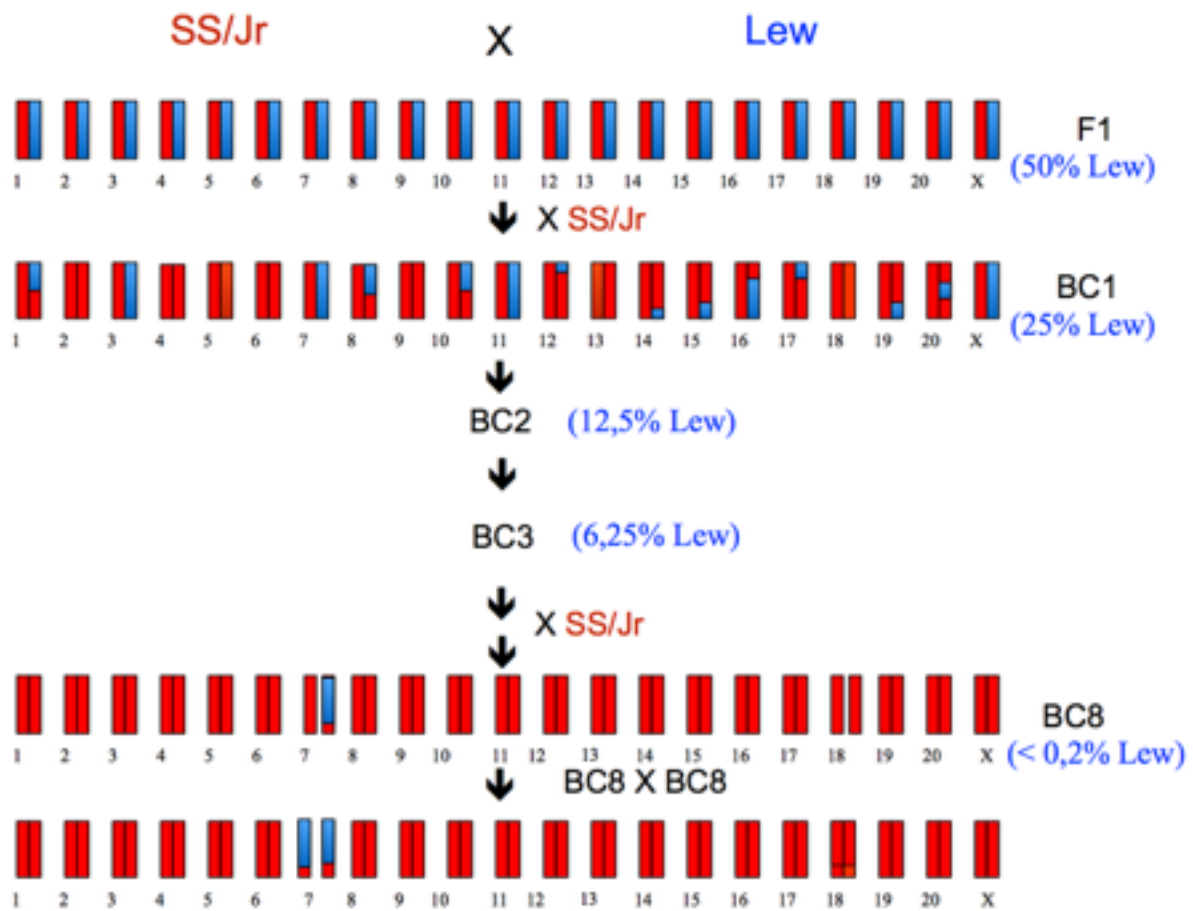
# **MÉTHODOLOGIE**

## II-1. Notre approche génétique

### II-1.1 Les souches congéniques

Une souche où un segment chromosomique d'intérêt a été sélectivement remplacé par le segment homologue d'une autre souche est dite congénique.

Le croisement entre une souche de rats hypertendus (SS/Jr) et une souche normotendue (LEW) donne naissance à une génération F1 d'individus qui seront tous hétérozygotes, c'est-à-dire que leur génome sera composé à 50% du génome SS/Jr et à 50% de celui LEW. Un croisement en retour (*Backcross*, BC) entre un individu F1 et un parent, SS/Jr par exemple, engendrera une population dite BC1 alors constituée à 25% du génome donneur, ici LEW, et donc à 75% du génome receveur SS/Jr. Le génotypage des rats BC1 à l'aide de marqueurs génétiques (microsatellites) permettra alors de cibler une région chromosomique d'intérêt et ainsi de sélectionner les individus qui seront à leur tour croisés en retour avec la souche parentale receveuse SS/Jr. La génération BC2 qui en découle connaîtra le même sort et ceci jusqu'à l'obtention d'une population BC8 pour laquelle le fond génétique sera homogène à plus de 99,9% pour le génome receveur SS/Jr et où seulement une région restreinte d'un chromosome en particulier sera LEW. Le croisement issu de deux BC8 donnera alors naissance à la génération F2 homozygote pour la région d'intérêt LEW (**Figure 7**). Suivant le même protocole, il est également possible de réaliser des souches congéniques réciproques où la lignée receveuse sera cette fois LEW et celle donneuse sera SS/Jr.



**Figure 7: Schéma représentant la réalisation de souches congéniques.**

Ici une région du chromosome 7 a été ciblée. SS/Jr représente ici la souche receveuse et Lew la souche donneuse. Le pourcentage du génome donneur est indiqué pour chaque génération.

### **II-1.1.1 Sous-souches congéniques**

À partir de ces souches congéniques, il est possible de réaliser des sous-souches congéniques et ainsi réduire la région d'intérêt. Ces dernières sont obtenues en croisant des individus congéniques avec la souche parentale receveuse. Les individus ainsi obtenus sont génotypés à la recherche d'évènements de recombinaison (Cross-Over, CO) qui pourraient se produire à proximité d'un QTL d'intérêt entre les souches congéniques et parentales. Les rats chez lesquels un CO s'est produit sont sélectionnés pour être croisés avec la souche receveuse puis l'homozygotie est établie via reproduction entre frères et soeurs. Cette technique permet de réduire la région de 20 à 1 cM (Rapp, J. P., 2000).

1 cM correspondant à 1% de recombinaisons génétiques, soit, en moyenne, une recombinaison se produisant toutes les 100 méioses, plus le nombre de rats utilisés pour réaliser les sous-souches congéniques sera grand, plus il sera possible d'observer des CO et ainsi réduire au minimum la région chromosomique, dans le but optimale d'isoler le QTL responsable de la variation significative du phénotype (Nabika T. et al, 2000).

### **II-1.1.2 *Speed Congenics***

La construction de telles souches congéniques prend 2 ans et demi à 3 ans, c'est pourquoi une stratégie dite de *speed congenics* a été développée. Cette méthode passe par le génotypage des individus BCs à l'aide de nombreux marqueurs répartis le long du génome entier. Ainsi, il est possible de sélectionner les individus qui ont hérité d'un plus grand nombre de loci du génome receveur au cours des BCs afin de les croiser en retour. Cinq générations de BCs sont alors suffisantes (au lieu de huit) pour établir l'homozygotie et les congéniques sont créées en 15 à 18 mois (Rapp JP., 2000, Nabika T. *et al*, 2000).

### **II-1.1.3 Doubles et multiples Congéniques**

Afin d'étudier l'effet de deux ou plusieurs QTLs ensemble, il est possible de combiner ces QTLs dans une même souche, on parle alors de doubles ou multiples congéniques. Les individus F1 issus du croisement entre les souches congéniques a et b sont croisés en retour

avec la souche congénique parentale a. Les rats BC1 ainsi obtenus sont génotypés et ceux étant homozygotes normotendus pour le QTL de la souche a et hétérozygotes pour le QTL de la souche b sont sélectionnés et croisés entre eux afin d'obtenir une double congénique homozygote normotendue pour les deux loci d'intérêt. Cette dernière est ensuite maintenue par croisement entre frères et soeurs pendant une génération (Rapp JP. *et al*, 1998). Toutefois, les individus F1 peuvent aussi être croisés entre frères et soeurs s'ils possèdent le génotype d'intérêt. Bien entendu la double congénique réciproque peut également être obtenue de la même façon.

## **II-1.2 Avantages de notre stratégie**

Notre approche génétique présente de nombreux avantages par rapport aux analyses de liaison et aux GWAS. C'est une technique permettant de réduire une région chromosomique contenant des QTLs et ainsi cibler un QTL en particulier (cartographie génétique). En effet, la réalisation de souches congéniques permet d'obtenir des rats (BC8) dont le génome est composé à presque 99,9% du génome receveur et 0,1% seulement du donneur permettant ainsi d'établir un lien de cause à effet direct entre la mesure de PA et le génotype. Chaque souche congénique compte pour au moins 20% de la différence totale de PA entre les souches parentales SS/Jr et Lew qui est d'environ 80 mm Hg, suggérant un effet non négligeable d'un QTL sur le phénotype total. De plus chaque QTL exerce un effet individuel sur la PA.

Cette stratégie a permis la découverte de gènes candidats potentiels pour la PA, qui n'ont pas forcément été mis en évidence par les études de GWAS. De plus, les congéniques peuvent donner lieu à des transgéniques et permettre ainsi des études fonctionnelles sur les gènes candidats. Les sous-souches congéniques isolant un seul gène pourraient aussi servir de modèle « *Knock in* ». L'analyse des interactions épistatiques entre les gènes est également possible via la création de doubles congéniques. Enfin, il s'agit d'une méthode venant compléter les études de liaison et de GWAS dans la quête aux variants génétiques responsables de causer l'HTA dans la population générale (Duong C. *et al*, 2007, Miles C. *et al*, 2008).

## II-1.3 Limites de notre stratégie

Comme toutes les stratégies génétiques, l'approche par QTL présente aussi des limites. En effet, ces analyses requièrent un certain nombre d'individus et les croisements nécessaires pour les obtenir peuvent être longs, bien qu'avec la technique de *speed congenics* ce temps peut être considérablement réduit. Le degré de résolution de la technique est tributaire de la fréquence de recombinaison génétique. Enfin, la détection de QTLs dépend des souches choisies pour réaliser les congéniques. En effet, nous avons mis en évidence que le fond génétique de la souche receveuse détermine l'existence des QTLs (Crespo K., *et al*, 2011) et que l'effet d'un gène, outre ses propriétés intrinsèques dépend de son environnement génétique (effet de position, CO, épistasie) (Chauvet C\*, Crespo K\*. *et al*, 2013).

Cette stratégie a permis l'identification de nombreux gènes candidats potentiels pour la PA. Or, seulement 42 QTLs ont été trouvés par GWAS chez l'humain (Ehret *et al*, 2010). Il a été suggéré que cette différence pourrait s'expliquer par le fait que certains QTLs identifiés chez le rat peuvent être spécifiques au rongeur et ne correspondent pas à des cibles pour l'HTA chez l'humain. De plus, chez ce modèle animal, l'HTA est accélérée par une diète riche en sel pouvant être à l'origine de ces QTLs. Nos études sont principalement basées sur les mâles alors que dans la population humaine, les hommes et les femmes sont analysés, or il a déjà été mis en évidence qu'il existe une spécificité inter-sexes dans le déterminisme de la PA. Les souches congéniques fournissent un génome homogène alors que la population humaine est hétérogène (Deng A.Y, Rapp JP., 2000).

Cependant, ces études réalisées sur le rat permettent de faciliter la découverte de nouvelles voies de régulation de la PA qui peuvent être homologues et pertinentes chez l'humain et qui n'ont pas été mise en évidence par GWAS.

La variation des résultats obtenus entre laboratoires peut s'expliquer par l'utilisation de différents marqueurs, l'effet du phénotype sexuel, la diète, les lignées de rats utilisées, la méthode et le type de mesure choisie, l'âge des animaux au moment de la mesure de PA. La PA augmentant avec l'âge, les mesures sont généralement faites sur des individus adultes qui

sont censés exprimer le phénotype définitif. Toutefois, certaines équipes ont démontré que certains gènes impliqués dans l'HTA pouvaient agir au cours de la croissance et du développement des rats (Rapp JP., 2000).

## II-2 Mesures de PA

Parmi les méthodes les plus courantes permettant de mesurer la PA chez les rats nous citerons la méthode non invasive de plethysmographie qui mesure l'augmentation du volume sanguin dans les vaisseaux irriguant l'extrémité de la queue via un capteur situé en aval d'un dispositif d'occlusion (*tail-cuff*). Cette technique n'est pas onéreuse mais elle ne donne qu'une mesure indirecte de la PAS à court terme et n'est pas très précise. De plus, les animaux sont contraints, immobilisés au moment de la mesure et afin d'assurer un flux sanguin suffisant dans la queue, l'animal doit être dans un environnement assez chaud. Ainsi le stress provoqué par ces conditions peut naturellement nuire aux résultats. Ces méthodes non invasives sont généralement utilisées pour obtenir une valeur basale de la PA pour tester l'activité anti-hypertensive de certains composés. Dus aux artefacts de cette méthode, il est souvent nécessaire de confirmer les mesures avec d'autres techniques invasives standard (Parasuraman S. *et al*, 2012, Van Vliet B. N. *et al*, 2000).

Ainsi, le cathétérisme intra-artérielle, très précis, mesure la PA directement au niveau des artères carotide, radiale, fémorale ou brachiale et convient pour mesurer la réactivité vasculaire face à de nombreux agonistes et antagonistes. Le cathéter rempli avec une solution saline est peu onéreux, sa calibration est facile pour les mesures de PAM et permet une prise de mesures à long terme. Cependant, il s'agit d'une technique pouvant créer de nombreux artefacts causés par l'inconfort de l'animal, la chirurgie et l'anesthésie, de même que par le risque d'infection potentielle et la perte de perméabilité du cathéter (Parasuraman S. *et al*, 2012, Van Vliet B. N. *et al*, 2000).

Enfin, la technique de radiotélémétrie passe par l'implantation d'une sonde (cathéter avec agent anti-thrombotique) dans l'aorte abdominale du rat qui va prendre des mesures précises de PAS et PAD absolues et transférer les données à un récepteur externe relié à un système informatisé. Cette instrumentation de qualité peut être utilisée pendant des mois sans perte de signal et peut être réutilisée sur plusieurs rats. L'avantage de cette technique est qu'au moment des mesures, les rats qui se sont remis de la chirurgie et de l'anesthésie (minimum une semaine) sont conscients et ne sont ni contraints, ni manipulés. Le stress et les artéfacts dus à la chirurgie et l'anesthésie ne sont alors pas à prendre en considération dans les résultats. De plus, les mesures sont précises et prises en continue sur 24h et le seul désavantage de cette technique étant le facteur financier, il va sans dire qu'il s'agit de la méthode de choix pour les études sur l'HTA (Parasuraman S. *et al*, 2012, Van Vliet B. N. *et al*, 2000).

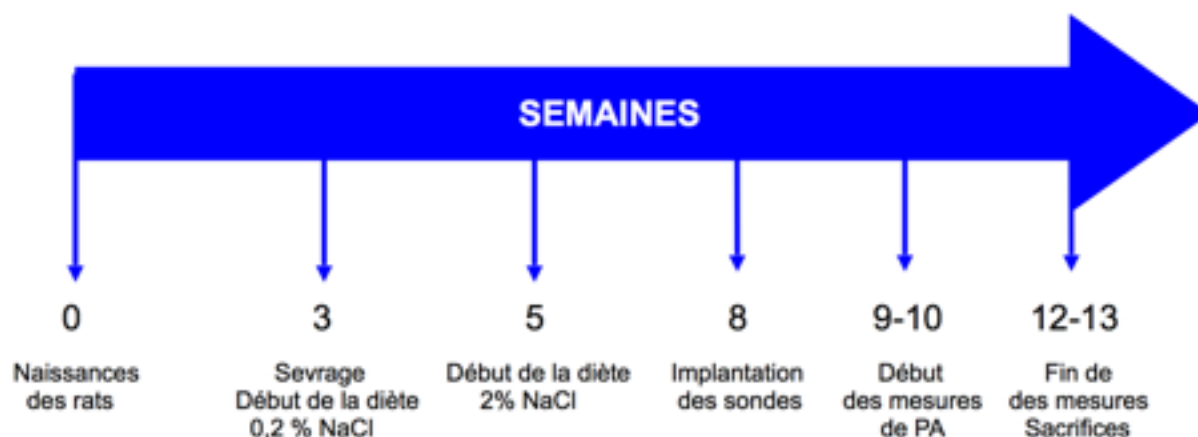
### **II-3. Protocole animalier**

Les protocoles de manipulation des animaux sont approuvés par le Comité Institutionnel de Protection de Animaux (CIPA) du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Une semaine à 10 jours après leur naissance, les rats sont identifiés par un numéro inscrit sur une étiquette métallique agrafée à leur cou. Une biopsie du bout de leurs queues est effectuée afin de procéder au génotypage. Les rats mâles sont ensuite sevrés à l'âge de 21 jours et maintenus sur une diète faible en Na<sup>+</sup> (0,2% NaCl, Harlan Teklad 7034, Madison, Winsconsin, EU) pendant 2 semaines. À l'âge de 5 semaines (35 d), ces derniers sont mis sur une diète riche en Na<sup>+</sup> (2% NaCl, Harlan Teklad 94217, Madison, Winsconsin, EU) jusqu'à la fin des expériences.

Trois semaines après le début de la diète riche en Na<sup>+</sup>, les sondes de télémétrie sont implantées dans l'aorte abdominale des rats alors âgés de 8 semaines (56 d) et pesant de 250 à 320 g. Les sondes consistent en un cathéter rempli d'une solution non compressible attaché à un capteur, une pile et d'un dispositif électronique émettant un signal radio vers une plaque réceptrice extérieure. Le cathéter est inséré dans l'aorte descendante via l'artère fémorale et



suturé sur la paroi vasculaire. Les animaux ont environ 10 à 12 jours pour récupérer de la chirurgie et de l'anesthésie et retrouver un comportement normal. Après cette période de convalescence pendant laquelle les animaux sont suivis de près, les mesures de télémétrie réalisées via le système *Data Sciences Inc (St-Paul, Minnesota, USA) - Dataquest software* peuvent commencer. Les mesures de PAS, PAD, PAM et de fréquences cardiaques sont prises pendant 10 secondes, toutes les 2 minutes, pendant 3 semaines. Malgré un environnement contrôlé: le temps d'exposition à la lumière et la température étant toujours les mêmes, plusieurs mesures de télémétrie sont réalisées tout au long de l'année sur plusieurs lignées de rats appartenant à la même souche. Une fois les mesures terminées, les animaux âgés de 12 à 13 semaines (84 à 91 d) sont sacrifiés par décapitation et leur organes ainsi que les sondes de télémétrie sont extraits (**Figure 8**).



**Figure 8: Schéma du protocole animalier**

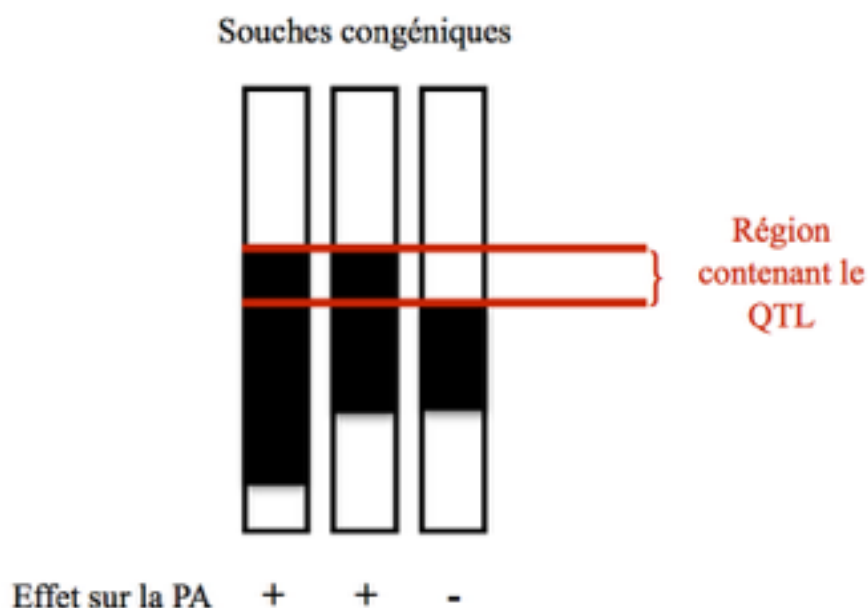
## II-4 Analyses statistiques

Les souches congéniques sont comparées aux souches parentales pour leur phénotype. Des analyses de variances (*Analysis of Variance*, ANOVA) à mesures répétées sont réalisées afin de détecter des différences entre plusieurs groupes comparés. Ces tests dépendent de la moyenne et de la dispersion de chaque groupe et tiennent compte du nombre de souches à comparer et du nombre d'individus par souche, de même que de la durée sur laquelle les mesures sont prises. Celles-ci permettent de prendre en considération que la PA pour chaque animal est prise à différents moments. Si aucune différence significative n'est détectée entre les groupes comparés par ANOVA, l'analyse peut s'arrêter là. En revanche, lorsqu'une différence significative est perçue, un test de comparaison multiple (Dunnnett *post hoc*) doit être réalisé. En effet, ce test permet de réaliser plusieurs comparaisons entre paires de groupes et ainsi déterminer quelle souche est différente par rapport au contrôle parental, témoin. Ce dernier ajuste la valeur p pour les différences en termes de taille d'échantillon. En revanche, le test de comparaisons multiples de Tukey est plus approprié pour comparer les souches congéniques entre elles et ainsi les interactions entre ces dernières. Le programme informatique SYSTAT 9.0 (SPSS Sci. Chicago, Illinois, EU) est utilisé pour ces analyses statistiques. De cette façon, il est possible de détecter des différences de PA mesurées par télémétrie entre deux souches de 5 à 10 rats chacune.

## II-5 Cartographie de QTLs

Une fois la PA mesurée chez les souches et sous-souches congéniques, il est possible d'établir une cartographie chromosomique que l'on appelle aussi carte de substitution ou encore « clonage positionnel » des QTLs influençant la PA (Deng A.Y., 2007).

Certaines sous-souches présenteront une variation significative de PA par rapport à la souche parentale, de la même façon que la souche congénique originale. D'autres, n'auront aucun effet sur la PA comparée à la souche parentale. Ainsi, la région chromosomique conservée par les sous-souches ayant un effet sur la PA et perdue par celles qui n'ont pas d'effet sur le phénotype est identifiée comme la région abritant un QTL (**Figure 9**).



**Figure 9: Cartographie chromosomique des QTLs (carte de substitution).**

Les barres solides noires représentent le segment chromosomique normotendu homozygote (LL) et en blanc la région homozygote hypertendue (SS). « + » représente une variation de PA par rapport à la souche parentale SS/Jr et « - » représente l'absence d'effet significatif sur la PA.

## II-5.1 Marqueurs génétiques

La localisation chromosomique de ces QTLs se fait via génotypage des souches et sous-souches congéniques. Les marqueurs génétiques les plus utilisés chez les rats sont les microsatellites. Il s'agit de courtes répétitions en tandem de di-, tri-, ou tétranucléotides qui s'étendent sur environ 50 pb. On les désigne également sous le nom de *Short Tandem Repeats* (STR), *Simple Sequence Length Polymorphism* (SSLP) ou encore *Simple Sequence Repeats* (SSR). Ces répétitions de séquences sont très nombreuses et réparties dans l'ADN non codant chez les eucaryotes. Ces dernières sont multi-alléliques et donc très polymorphiques en ce qui concerne leur longueur et peuvent facilement être génotypées via *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Rapp JP., 2000). Un grand nombre de microsatellites ont été détectés par de nombreux laboratoires et sont disponibles dans des bases de données telles que *EuMicroSatdb* (*Eukaryotic MicroSatellite database*), *SNPSTR database*, NCBI par exemple.

Les SNPs, quant à eux, représentent les variants génétiques les plus répandus dans le génome, cependant, étant bi-alléliques, ils sont moins polymorphiques que les microsatellites (Pulst S. M., 1999).

Les régions contenant les marqueurs génétiques sont alors amplifiées par simple PCR sur l'ADN des rats extrait à partir d'une biopsie de queue. Le degré de résolution de cette cartographie de QTLs dépend donc du nombre de rats inclus dans l'étude et de la densité de marqueurs disponibles dans la région chromosomique d'intérêt permettant ou non de localiser la position exacte des COs (Nabika T. *et al*, 2000).

## II-5.2 Génotypage

Afin de réduire les régions chromosomiques contenant les QTLs, un génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites et SNPs, pour la plupart découverts au laboratoire a été réalisé. Des amorces d'oligonucléotides uniques de parts et d'autres du marqueur génétique ont été conçues au laboratoire à l'aide du logiciel *Primer 3* puis synthétisées par *Integrated DNA Technology Inc. (IDT, Iowa, EU)*.

L'amplification de la région contenant le marqueur sera réalisée par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) à l'aide du kit *Taq DNA Polymerase with dNTP Mix* (Bio Basic inc.) et une migration par électrophorèse sur gel d'agarose du produit s'en suivra. Via cette technique, il est possible de réaliser un *genome scan*, soit un génotypage du génome complet des animaux à l'aide d'un ensemble de presque 100 microsatellites espacés d'une distance d'environ 10 cM entre eux en moyenne.

L'extraction de l'ADN provenant des queues de rats est réalisée via le *QIAamp Tissue Kit* (Qiagen, Inc., Chartsworth, Canada).

## **II-6 Analyse moléculaire et identification de gènes candidats**

La production de congéniques et sous-congéniques, et la localisation de QTLs via l'utilisation de marqueurs génétiques et de méthodes de mesures de PA précises, combinées à des analyses statistiques, mènent à l'identification de gènes candidats pour l'HTA (Rapp JP., 2000).

En effet, une fois qu'un QTL est localisé dans une région très restreinte, plusieurs approches sont appréhendées afin d'identifier le QTL en question. Il s'agit de l'approche par gène candidat fonctionnelle dans le cas de gènes connus pour leurs potentiels rôles dans la régulation de la PA, surtout si la région contient de nombreux gènes, ou positionnelle, compte tenu de leur localisation dans la région abritant le QTL d'intérêt. Les gènes connus pour leur implication dans la voie de régulation de la PA ou même leur action indirecte dans l'HTA peuvent être identifiés dans la région d'intérêt à l'aide de bases de données sur les génomes du rat, de la souris et de l'humain s'il s'agit d'une région conservée. On citera NCBI, UCSC, RGD, *etc...*

## II-6.1 Séquençage

Ainsi, le séquençage des régions codantes, promotrices, 5'UTRs, 3'UTRs et des jonctions introns/exons des gènes contenus dans cette région permettra de dévoiler des mutations entre les souches hypertendues et normotendues ou non, et ainsi déterminer si un gène est un candidat potentiel pour le QTL ou non. Ces régions pouvant faire 1 cM, soit 2 millions de bases chez le rat, peuvent parfois contenir de nombreux gènes d'où l'utilité des bases de données informatiques permettant de trier les gènes par ordre de priorité (gènes connus, nouveaux gènes, *etc...*). Enfin lorsque des mutations sont trouvées, des études fonctionnelles doivent être envisagées afin de prouver l'implication du gène en question dans l'HTA. Dans ce contexte, les animaux transgéniques sont souvent la méthode ultime afin de pouvoir isoler l'effet d'un seul gène candidat. Les résultats de ces études peuvent mener à l'identification de variants dont les effets sont minimes sur le phénotype mais dont la découverte permettra d'approfondir nos connaissances quant à la voie de régulation de la PA. D'autres auront des effets plus importants sur la PA (Nabika T., *et al*, 2000).

Les génomes complets de SS/Jr et Lew ont été séquencés par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, utilisant les technologies de séquençage *Illumina, HiSeq -Illumina Paired-ends 100bp sequencing lane*.

L'ADN des deux souches a été extrait et purifié en laboratoire à partir des reins de rats ayant suivi le protocole de pré-télémétrie à l'aide du kit *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Chartsworth, Canada)*. Le logiciel *NextiaGen*© développé par Max Chauvet nous a permis de positionner les variants génétiques dans l'ADN génomique et l'ARNm des gènes.

Le séquençage de ces deux souches nous a permis de constituer notre propre base de données permettant d'extraire les mutations des séquences codantes des gènes entre SS/Jr et Lewis de même que les régions promotrices, 5'UTR, 3'UTR, les jonctions exons-introns et les variations du nombre de copies (*Copy Number Variation, CNV*).

Les gènes contenus dans une région abritant un QTL ont aussi été séquencés individuellement. Lorsqu'une mutation était trouvée dans un gène, un deuxième séquençage ainsi qu'une analyse par enzymes de restriction, lorsque cela est possible, étaient réalisés afin de confirmer la mutation.

## **II-6.2 Analyse d'expression**

Le taux d'expression de ces gènes devra aussi être comparé entre les souches congéniques et parentales via analyse de Northern Blot, qRT-PCR ou puces d'expression puisqu'il est fort probable que certains gènes en cause dans le phénotype soient différenciellement exprimés entre les souches. Cependant, il est parfois difficile de déterminer le ou les tissus qui doivent être examinés pour de telles études. Les reins et les vaisseaux sanguins sont des organes cibles évidents mais les organes endocriniens et le cerveau sont également des organes susceptibles d'exprimer des gènes impliqués dans la régulation de la PA. Cependant, même si l'expression d'un gène en cause dans l'HTA n'est pas altérée, des mutations contenues dans ce gène pourraient agir sur l'expression d'autres gènes.

L'ADN complémentaire (ADNc) provenant d'un panel d'organes récoltés lors du sacrifice des rats, à la fin du protocole de télémétrie, est soumis à des *Reverse Transcription-PCR* (RT-PCR) au laboratoire afin de déterminer où s'expriment les gènes d'intérêt. Puis des *real time quantitative* RT-PCR (qRT-PCR) sont réalisées afin de comparer le taux d'expression d'un gène dans un organe en particulier entre deux souches à l'aide du Platinum SYBR Green qPCR superMix-UDG de Invitrogen ( cat # 11733-046).

## **CHAPITRE III**

### **PROJET DE RECHERCHE**



L'hypertension artérielle est un fléau mondial. Menant au développement de maladies cardiovasculaires, cette dernière est responsable de 9,4 millions de décès par an dans le monde (OMS, 2013). Les traitements anti-hypertenseurs ne permettent pas à ce jour de guérir l'HTA mais de la maîtriser ou même de la prévenir, d'où leur utilisation à long terme voire à vie (*Hypertension Canada*, 2015). La compréhension des mécanismes génétiques sous-jacents au développement de l'HTA s'avère primordiale afin de viser le progrès thérapeutique et aboutir à un traitement personnalisé.

L'HTA est un trait quantitatif, multigénique, complexe pour lequel de nombreuses stratégies génétiques ont été mises au point afin de comprendre le mécanisme moléculaire à l'origine de son développement. L'utilisation du modèle animal et plus particulièrement la création de souches congéniques de rats s'avère être une technique de choix permettant d'établir un lien de cause à effet direct entre le phénotype et le génotype et présente de nombreux avantages comparée aux analyses de liaison seules et aux études d'associations pangénomiques (GWAS). Ainsi, nos travaux se basent sur l'utilisation de la souche de rats hypertendue Dahl *Salt-Sensitive* (SS/Jr) et la souche normotendue Lewis (LEW) pour réaliser ces congéniques.

Les articles « *Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes* » et « *Hypertension suppression, not a cumulative thrust of quantitative trait loci, predisposes blood pressure to normotension* » de **Crespo K. et al** publiés en **2011 et 2015** posent les bases de l'existence d'une spécificité des populations en démontrant l'importance du choix des rats hypertendus et normotendus pour réaliser les souches congéniques. Nous avons montré que le génome normotendu LEW posséderait des éléments supprimeurs de l'HTA qui seraient responsables du maintien de la normotension chez ces rats. Ce phénomène viendrait masquer l'effet des QTLs impliqués dans le développement de l'HTA existant chez SS/Jr. Une interaction épistatique serait donc à l'origine de la normotension dans le génome LEW mais permettrait également d'expliquer l'existence de QTLs faisant augmenter la PA de façon considérable chez les rats SS/Jr, comme nous le démontrons ici.

Jusqu'à récemment, la doctrine admise concernant l'origine polygénique de l'HTA était basée sur plusieurs QTLs ayant chacun un effet minime sur le phénotype final, qui s'additionneraient pour mener au développement de l'HTA. Or, nos données expérimentales stipulent que des interactions plus complexes existent entre les QTLs impliqués dans l'HTA. Ainsi, dans le but d'étudier les interactions intergéniques, un total de 27 doubles et multiples congéniques ont été réalisées dans le fond génétique SS/Jr. Deux types d'interactions, additives et épistatiques, résultent de ces combinaisons de QTLs. Ces travaux nous ont alors mené à l'appréciation d'une modularisation des QTLs qui est exposée dans la première publication présentée dans cette thèse (Chapitre IV-1). Trois modules épistatiques (EM1, EM2, EM3) ont été catégorisés où les QTLs appartenant à un même EM sont épistatiques entre eux mais entretiennent une relation d'additivité avec les QTLs d'un autre EM. Ainsi, les 28 QTLs découverts chez notre modèle SS/Jr participent à des cascades de régulation définies par ces modules épistatiques. 26% des gènes identifiés par GWAS chez l'Homme, qui pourrait jouer un rôle dans la régulation de la PA appartiennent à EM1 ou EM2, suggérant qu'une telle organisation des QTLs pourrait être à l'origine de l'HTA chez l'humain. De plus, l'ordre hiérarchique entre certains couples de QTLs a pu être déterminé au sein de EM1 et EM2, approfondissant nos connaissances de l'architecture génétique complexe régulant la PA.

En parallèle, nos travaux nous ont, entre autre, mené à l'identification d'un QTL situé sur le chromosome 16 du rat (C16QTL), appartenant au EM1 et qui révélerait une nouvelle voie de l'homéostasie de la PA (Chapitre IV-2). Le gène *retinoblastoma-associated protein 140 (Rap140)/family with sequence similarity 208 member A (Fam208a)*, présentant une mutation non synonyme entre SS/Jr et LEW est le gène candidat le plus plausible pour le C16QTL parmi les sept gènes contenus dans la région chromosomique contenant ce QTL. Celui-ci code pour un facteur de transcription et semblerait influencer l'expression de *Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y<sup>+</sup> system) member 12 (Slc7a12)*, spécifiquement et significativement sous exprimé dans les reins de la souche congénique portant C16QTL par rapport à la souche SS/Jr. *Rap140/Fam208a* agirait comme un inhibiteur

de la transcription de *Slc7a12* menant à une diminution de la pression chez la souche congénique.

Le concept de modularisation des QTLs en voies de régulation de la PA s'applique ici pour la première fois à un trait quantitatif chez le mammifère. L'étude de la nouvelle voie de signalisation *Rap140/Fam208a - Slc7a12* constitue un exemple de la façon dont nous pouvons approfondir nos connaissances quant à l'origine génétique de l'hypertension chez SS/Jr. Ainsi, à long terme, de nouvelles combinaisons de cibles thérapeutiques pourraient être développées.

## **CHAPITRE IV**

# **RÉSULTATS - PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

# **IV-1. Modularization and epistatic hierarchy determine homeostatic actions of multiple blood pressure quantitative trait loci**

**Cristina Chauvet\*<sup>1</sup>, Kimberley Crespo\*<sup>1</sup>, Annie Ménard<sup>1</sup>, Julie Roy<sup>1</sup>,  
Alan Y. Deng<sup>1#</sup>**

**\*These authors contributed equally to the current work**

**Human Molecular Genetics, 2013, Vol. 22, No. 22: 4451–4459**

Received January 11, 2013; Revised June 12, 2013; Accepted June 19, 2013

<sup>1</sup>Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and, Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>#</sup>Corresponding author: Alan Y. Deng, Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Conflict of interest statement : The authors have no conflict of interest to declare.

Funding: This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and a joint China-Canada Health Research Initiative to A.Y.D. C.C. is supported by a doctoral fellowship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. K.C. is supported by a doctoral fellowship from Fond Québécois de Recherche en Santé.

Abbreviations: BP, blood pressure; *C1QTL1*, QTL1 on Chr 1; *C2QTL2*, QTL2 on Chr 2, and so on; Chr, chromosome; DBP, diastolic blood pressure; DSS, Dahl salt-sensitive rats; EM, epistatic module; GWAS, genome-wide association studies; MAP, mean arterial pressure; QTL, quantitative trait locus; SBP, systolic blood pressure

## IV-1.1 Contribution des co-auteurs

Cet article définit les interactions additives *versus* épistatiques entre les 28 QTLs découverts chez notre modèle de rats. Grâce à l'étude de ces interactions nous avons classé les QTLs en modules épistatiques correspondant à des voies de régulation de la PA et avons été capable de déterminer l'ordre hiérarchique entre certains couples de QTLs. Ces données révèlent une architecture complexe de l'organisation des QTLs impliqués dans l'hypertension. La réalisation des souches et sous-souches congéniques, des doubles et multiples congéniques ont été réalisées par Annie Ménard et Julie Roy.

Ma contribution à cet article, à égalité avec Cristina Chauvet repose sur le génotypage des souches, sous-souches et doubles et multiples congéniques permettant de délimiter les régions d'intérêt abritant des QTLs pour les chromosomes 1, 2, 3, 5, 7, 8 et 16. J'ai vérifié l'expression tissulaire d'une grande partie des gènes situés sur ces chromosomes. J'ai effectué le séquençage des régions codantes, des régions 5'UTRs et 3'UTRs, ainsi que des jonctions intron-exon des ces gènes et j'ai identifié et confirmé à plusieurs reprises les mutations contenues dans les gènes susceptibles de représenter les candidats pour ces QTLs.

Ma contribution en pourcentage aux différentes figures et tableaux de l'article est:

Tableau IV-1.2: 25%

Tableau IV-S1.2: 50%

Tableau IV-S1.3 (a):100%

Tableau IV-S1.3 (b):100%

Figure IV-S1.1 (a): 100%

Figure IV-S1.1 (b): 100%

Figure IV-S1.1 (c): 50%

Figure IV-S1.1 (d): 100%

Figure IV-S1.1 (e): 100%

Figure IV-S1.1 (g): 100%

Figure IV-S1.1 (i): 100%

## **IV-1.2 Abstract**

Hypertension, the most frequently diagnosed clinical condition world-wide, predisposes individuals to morbidity and mortality, yet its underlying pathological etiologies are poorly understood. So far, a large number of quantitative trait loci (QTLs) have been identified in both humans and animal models, but how they function together in determining overall blood pressure (BP) in physiological settings is unknown. Here, we systematically and comprehensively performed pair-wise comparisons of individual QTLs to create a global picture of their functionality in an inbred rat model. Rather than each of numerous QTLs contributing to infinitesimal BP increments, a modularized pattern arises: 2 epistatic ‘blocks’ constitute basic functional ‘units’ for nearly all QTLs, designated as epistatic module 1 (EM1) and EM2. This modularization dictates the magnitude and scope of BP effects. Any EM1 member can contribute to BP additively to that of EM2, but not to those of the same module. Members of each EM display epistatic hierarchy, which seems to reflect a related functional pathway. Rat homologues of 11 human BP QTLs belong to either EM1 or EM2. Unique insights emerge into the novel genetic mechanism and hierarchy determining BP in the Dahl salt-sensitive SS/Jr (DSS) rat model that implicate a portion of human QTLs. Elucidating the pathways underlying EM1 and EM2 may reveal the genetic regulation of BP.

## **IV-1.3 Introduction**

Essential hypertension, the most prominent of human disorders, leads to stroke and fatal cardiovascular diseases (1,2). Up to now, hypertension is under control in only 34% of patients, and even for them, available treatments are empirical at best as they are not directed at causes of the disease, but rather at symptoms that require life-long medication (3). The greatest challenge in finding primary triggers, not secondary responses, to essential hypertension is to identify quantitative trait loci (QTLs) that underlie the physiological etiologies of blood pressure (BP) determination (2). Genome-wide association studies (GWAS) in humans have

localized QTLs for systolic (SBP) and diastolic (DBP) (2,4), mean arterial pressure (MAP) and pulse pressure (5).

Each QTL is assumed to exert a miniscule phenotypic effect, and multiple QTLs work together to incrementally augment BP. Evidently, 28 human QTLs (2) account for less than 1% of total BP changes. By inference, thousands of such QTLs would have to exist to explain the majority of BP variations in general human populations. Although fractionating polygenic risk factors is often adopted in epidemiological studies, the biological impact of such practice in a functional context remains enigmatic.

Coincidentally, experimental models of hypertension have yielded numerous QTLs (6,7). Are they required as quantitative increments cumulatively achieving a BP threshold? In this context, how do Dahl salt-sensitive SS/Jr (DSS) rats, that possess BP-lowering alleles at several QTLs, stay hypertensive (8,9)? Is it because they have more BP-elevating than BP-diminishing QTL alleles that mathematically counterbalance one another?

These issues have to be addressed experimentally, i.e. via the investigation of each QTL individually and in combination with another, while retaining the rest of the genome homogeneously constant. This approach is not feasible in clinical studies, but the insights gained are valuable for understanding the genetic hierarchy and organization of essential hypertension. The current work aims to elucidate the organization that assembles and configures the genetic architecture that determines BP in DSS rats.



## IV-1.4 Results

### IV-1.4.1 Study design in grouping QTLs

In isolation, the effect magnitude from a single QTL accounts for at least 20% of the BP difference between 2 contrasting parental strains, and no combination with another QTL is necessary to achieve it (Supplemental Fig.S1 (IV-1)). Epistasis refers to the effect of one gene masking that of another when acting together (6). Epistatic interactions predict that the BP effects of 2 QTLs cannot exceed those of a single QTL alone, (10). Based on this phenomenon, Deng proposed (6) a modularized scheme in that multiple BP QTLs may be assembled on the basis of their epistatic interactions or lack thereof.

To accomplish this task, one QTL can be used as a reference/entry point to which several QTLs can be modularized. A new component in the same epistatic module can be discovered by making a ‘double’ congenic strain, combining a QTL known to be a component of one starting module with another QTL whose modular involvement is not evident. If such a ‘double’ congenic strain has the same BP as each of the 2 ‘single’ congenic strains that constitute it, the 2 QTLs behave epistatically to each other and, consequently, they can be regrouped into the same module. If not, they belong to a different module. By repeating this process with all the known QTLs, more components of the same epistatic module can be added into the existing modular network, and an independent module can be established.

Epistatic hierarchy among QTLs in the same module can be determined if 2 QTLs have discernible BP effects. For example, a BP-decreasing QTL stands clearly higher in epistatic hierarchy than a BP-increasing QTL on Chromosome (Chr) 3, because the combined effects of the 2 QTLs are the same as those of the BP-decreasing QTL alone (11). Based on this rationale, the following experiments were performed.

As a starting point, combination of 2 congenic strains, C10S.L30 (containing *C10QTL1*) and C10S.L16 (containing *C10QTL2*) (Supplemental Fig.S1-f (IV-1)) , proved that they act additively (Table I (IV-1) and Fig. 1a (IV-1)). C10 refers to Chr 10. S.L30 indicates

that the congenic strain, #30, was made in the genetic background of DSS rats (see Materials and Methods section for details). QTL2 refers to QTL #2 on Chr 10.

*C10QTL1* and *C10QTL2* served as 2 initiating and separate reference/entry points onto which all QTLs (Supplemental Table S-I (IV-1).) could be modularized for their mutual epistatic relationships (6). A new member of the *C10QTL1* module, i.e. epistatic module 1 (EM1), can be found if that QTL acts epistatically to it, such as *C10QTL5* (12). The same principle applies to the module composed of *C10QTL2*, i.e. EM2. A new EM, in addition to EM1 and EM2, can be discovered if a given QTL acts additively with both *C10QTL1* and *C10QTL2*.

Table I (IV-1): Assessment of QTL-QTL interactions by congenic combinations

Congenic strains	QTL designation	n	MAP (mmHg)	MAP differences (mmHg) congenic minus DSS		Mechanism
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-26		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C10S.L30/C10S.L16	<i>C10QTL1 + C10QTL2</i> observed <i>C10QTL1 + C10QTL2</i> predicted	5	109 ± 8	-68 -53	<i>P</i> = 0.067	Additive
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-34		
C10S.L28	<i>C10QTL4</i>	9	133 ± 5	-27		
C10S.L16/C10S.L28	<i>C10QTL2 + C10QTL4</i> observed <i>C10QTL2 + C10QTL4</i> predicted	5	151 ± 4	-26 -71	<i>P</i> < 0.002	Epistasis
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-21		
C16S.L7	<i>C16QTL</i>	7	149 ± 2	-23		
C10S.L30/C16S.L7	<i>C10QTL1 + C16QTL</i> observed <i>C10QTL1 + C16QTL</i> predicted	8	150 ± 9	-22 -44	<i>P</i> = 0.049	Epistasis
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	6	151 ± 3	-21		
C16S.L7	<i>C16QTL</i>	7	149 ± 2	-23		
C10S.L16/C16S.L7	<i>C10QTL2 + C16QTL</i> observed <i>C10QTL2 + C16QTL</i> predicted	8	137 ± 3	-35 -44	<i>P</i> = 0.31	Additive
C8S.L2	<i>C8QTL2</i>	9	197 ± 5	20		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C8S.L2/C10S.L16	<i>C8QTL2 + C10QTL2</i> observed <i>C8QTL2 + C10QTL2</i> predicted	8	150 ± 4	-27 -7	<i>P</i> < 0.01	Epistasis
C8S.L2	<i>C8QTL2</i>	9	197 ± 5	20		
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-26		
C8S.L2/C10S.L30	<i>C8QTL2 + C10QTL1</i> observed <i>C8QTL2 + C10QTL1</i> predicted	8	161 ± 1	-16 -6	<i>P</i> = 0.19	Additive
C8S.L1	<i>C8QTL1</i>	7	138 ± 5	-39		
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-26		
C8S.L1/C10S.L30	<i>C8QTL1 + C10QTL1</i> observed <i>C8QTL1 + C10QTL1</i> predicted	5	134 ± 2	-43 -65	<i>P</i> < 0.01	Epistasis
C3S.L3	<i>C3QTL1</i>	7	144 ± 5	-33		
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-26		
C3S.L3/C10S.L30	<i>C3QTL1 + C10QTL1</i> observed <i>C3QTL1 + C10QTL1</i> predicted	12	136 ± 3	-41 -59	<i>P</i> < 0.03	Epistasis
C3S.L3	<i>C3QTL1</i>	7	144 ± 5	-33		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C3S.L3/C10S.L16	<i>C3QTL1 + C10QTL2</i> observed <i>C3QTL1 + C10QTL2</i> predicted	5	133 ± 5	-44 -60	<i>P</i> = 0.18	Additive
C17S.L11	<i>C17QTL1</i>	5	129 ± 8	-48		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C17S.L11/C10S.L16	<i>C17QTL1 + C10QTL2</i> observed <i>C17QTL1 + C10QTL2</i> predicted	5	146 ± 3	-31 -75	<i>P</i> < 0.001	Epistasis
C17S.L11	<i>C17QTL1</i>	5	137 ± 2	-46		
C17S.L9	<i>C17QTL2</i>	8	151 ± 7	-32		
C17S.L11/C17S.L9	<i>C17QTL1 + C17QTL2</i> observed <i>C17QTL1 + C17QTL2</i> predicted	7	144 ± 6	-39 -70	<i>P</i> < 0.003	Epistasis
C2S.L4	<i>C2QTL4L</i>	8	199 ± 4	22		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	10	151 ± 3	-27		
C2S.L4 /C10S.L16	<i>C2QTL4L + C10QTL2</i> observed <i>C2QTL4L + C10QTL2</i> predicted	5	157 ± 7	-20 -5	<i>P</i> < 0.05	Epistasis
C2S.L4	<i>C2QTL4L</i>	8	199 ± 4	22		
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-26		
C2S.L4 /C10S.L30	<i>C2QTL4L + C10QTL1</i> observed <i>C2QTL4L + C10QTL1</i> predicted	6	183 ± 9	6 -4	<i>P</i> = 0.28	Additive
C16S.L7	<i>C16QTL</i>	7	134 ± 5	-43		
C18S.L3	<i>C18QTL2</i>	5	124 ± 4	-53		
C16S.L7/C18S.L3	<i>C16QTL + C18QTL2</i> observed <i>C16QTL + C18QTL2</i> predicted	5	141 ± 4	-36 -96	<i>P</i> < 0.001	Epistasis
C3S.L7	<i>C3QTL3</i>	5	123 ± 2	-54		
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	11	144 ± 2	-33		
C3S.L7/C10S.L30	<i>C3QTL3 + C10QTL1</i> observed <i>C3QTL3 + C10QTL1</i> predicted	5	116 ± 3	-61 -87	<i>P</i> < 0.02	Epistasis
C1S.L3	<i>C1QTL2</i>	10	134 ± 7	-43		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C1S.L3/C10S.L16	<i>C1QTL2 + C10QTL2</i> observed <i>C1QTL2 + C10QTL2</i> predicted	6	138 ± 5	-39 -70	<i>P</i> < 0.008	Epistasis
C1S.L2	<i>C1QTL3</i>	8	125 ± 4	-52		

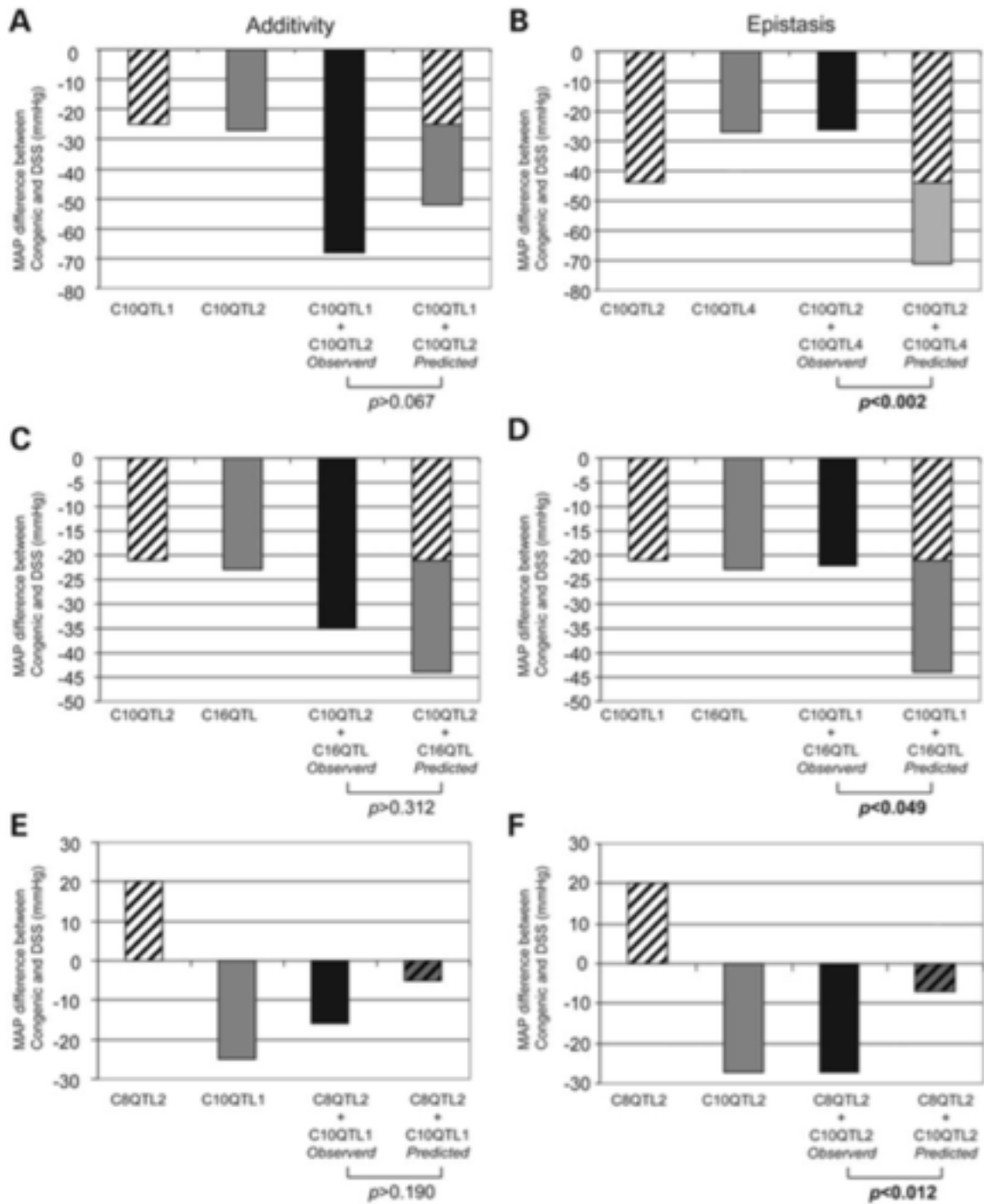
Continued

Congenic strains	QTL designation	n	MAP (mmHg)	MAP differences (mmHg) congenic minus DSS		Mechanism
C10S.L30/C10S.L16	<i>C10QTL1 + C10QTL2</i>	10	107 ± 6	-70		
C1S.L2/C10S.L30/C10S.L16	<i>C1QTL3 + C10QTL1 + C10QTL2</i> observed	6	109 ± 2	-68	<i>P</i> < 0.001	Epistasis
	<i>C1QTL3 + C10QTL1 + C10QTL2</i> predicted			-122		
C1S.L4	<i>C1QTL1</i>	16	143 ± 3	-34		
C10S.L30/C10S.L16	<i>C10QTL1 + C10QTL2</i>	5	109 ± 8	-69		
C1S.L4/C10S.L30/C10S.L16	<i>C1QTL1 + C10QTL1 + C10QTL2</i> observed	5	118 ± 3	-59	<i>P</i> < 0.001	Epistasis
	<i>C1QTL1 + C10QTL1 + C10QTL2</i> predicted			-103		
C7S.L	<i>C7QTL</i>	6	138 ± 3	-39		
C10S.L30/C10S.L16	<i>C10QTL1 + C10QTL2</i>	10	107 ± 6	-70		
C7S.L/C10S.L30/C10S.L16	<i>C7QTL + C10QTL1 + C10QTL2</i> observed	5	125 ± 3	-52	<i>P</i> < 0.001	Epistasis
	<i>C7QTL + C10QTL1 + C10QTL2</i> predicted			-109		
C2S.M15	<i>C2QTL3</i>	8	144 ± 4	-33		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C2S.M15/C10S.L16	<i>C2QTL3 + C10QTL2</i> observed	5	133 ± 2	-44	<i>P</i> = 0.018	Epistasis
	<i>C2QTL3 + C10QTL2</i> predicted			-60		
C2S.M15	<i>C2QTL3</i>	8	144 ± 4	-33		
C10S.L25	<i>C10QTL3</i>	7	150 ± 2	-27		
C2S.M15/C10S.L25	<i>C2QTL3 + C10QTL3</i> observed	6	129 ± 4	-48	<i>P</i> = 0.13	Additive
	<i>C2QTL3 + C10QTL3</i> predicted			-60		
C2S.M19	<i>C2QTL2</i>	9	124 ± 6	-53		
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-26		
C2S.M19/C10S.L30	<i>C2QTL2 + C10QTL1</i> observed	5	135 ± 5	-42	<i>P</i> < 0.001	Epistasis
	<i>C2QTL2 + C10QTL1</i> predicted			-81		
C2S.M19	<i>C2QTL2</i>	5	138 ± 8	-39		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C2S.M19/C10S.L16	<i>C2QTL2 + C10QTL2</i> observed	5	125 ± 2	-52	<i>P</i> = 0.20	Additive
	<i>C2QTL2 + C10QTL2</i> predicted			-66		
C2S.M21	<i>C2QTL5</i>	16	149 ± 4	-28		
C10S.L30/C10S.L16	<i>C10QTL1 + C10QTL2</i>	5	109 ± 8	-68		
C2S.M21/C10S.L30/C10S.L16	<i>C2QTL5 + C10QTL1 + C10QTL2</i> observed	5	148 ± 9	-29	<i>P</i> < 0.001	Epistasis
	<i>C2QTL5 + C10QTL1 + C10QTL2</i> predicted			-96		
C2S.M7	<i>C2QTL1</i>	14	145 ± 3	-32		
C10S.L16	<i>C10QTL2</i>	7	150 ± 3	-27		
C2S.M7/C10S.L16	<i>C2QTL1 + C10QTL2</i> observed	5	133 ± 8	-44	<i>P</i> = 0.12	Additive
	<i>C2QTL1 + C10QTL2</i> predicted			-59		
C2S.M7	<i>C2QTL1</i>	14	145 ± 3	-32		
C10S.L30	<i>C10QTL1</i>	10	151 ± 3	-26		
C2S.M7/C10S.L30	<i>C2QTL1 + C10QTL1</i> observed	7	131 ± 3	-46	<i>P</i> = 0.12	Additive
	<i>C2QTL1 + C10QTL1</i> predicted			-58		
C2S.M7	<i>C2QTL1</i>	14	145 ± 3	-32		
C3S.L3	<i>C3QTL1</i>	7	144 ± 5	-33		
C2S.M7/C3S.L3	<i>C2QTL1 + C3QTL1</i> observed	9	117 ± 2	-60	<i>P</i> = 0.56	Additive
	<i>C2QTL1 + C3QTL1</i> predicted			-65		

Table I (IV-1) legend: MAP, mean arterial pressure; DSS, Dahl salt-sensitive rats. QTL-QTL interactions were analyzed by 2 x 2 ANOVA as presented in Fig. 1 and analyzed as described in the Fig. 1 (IV-1) legend. No multiple comparisons were made between studies concerning epistatic interactions or a lack of it. Congenic strains defining QTLs are reported in

Supplemental Fig S1 (IV-1)

Figure 1 (IV-1): Analysis of interactions among representative QTLs



Legend to Figure 1 (IV-1): The left three columns in each panel represent differences in mean arterial pressure (MAP) between a congenic and DSS strains, i.e. BP lowered by a congenic strain. The last column to the right indicates a ‘predicted’ value of MAP lowered by combining 2 different QTLs. The BP effect of C10QTL1 is represented by congenic strain C10S.L30; the BP effect of C10QTL2 is represented by congenic strain C10S.L16; the combined BP effect of [C10QTL1 and C10QTL2] is represented by a ‘double’ congenic strain C10S.L30+C10S.L16. p indicates the results on the interaction as performed by 2 x 2 ANOVA. The actually ‘observed’ BP effect of the ‘double’ congenic strain combining C10QTL1+C10QTL2 is not different (p interaction <0.067) from a ‘predicted’ sum of BP effects of C10QTL1+C10QTL2, indicating additivity. In contrast, the actually ‘observed’ BP effect of another ‘double’ congenic strain combining C10QTL2+C10QTL4 is different (p interaction <0.002) from a ‘predicted’ sum of BP effects of C10QTL2+C10QTL4, indicating epistasis. (a), additivity between C10QTL1 and C10QTL4; (b), epistasis between C10QTL2 and C10QTL4; (c), additivity between C10QTL2 and C16QTL; (d), epistasis between C10QTL1 and C16QTL; (e), additivity between C8QTL2 and C10QTL1; (f), epistasis between C8QTL2 and C10QTL2.

#### **IV-1.4.2 Modularization of BP QTLs**

An analysis was first performed of *C10QTL4* and *C10QTL2* by combining 2 separate congenic strains, C10S.L28 and C10S.L16 (Supplemental Fig.S1-f (IV-1)), into 1 single congenic strain, C10S.L28/C10S.L16. The combined effect of *C10QTL4*+*C10QTL2* did not exceed that of *C10QTL4* or *C10QTL2* alone (Table I (IV-1) and Fig. 1b (IV-1)), i.e. an epistatic interaction exists between them ( $p < 0.002$ ). Thus, *C10QTL4* and *C10QTL2* belong to EM2 (Table II (IV-1)).

Next, the interaction between *C10QTL1* and *C16QTL* was evaluated by combining 2 congenic strains, C10S.L30 and C16S.L7 (Supplemental Fig.S1f and S1g (IV-1)) into a single

congenic strain, C10S.L30/C16S.L7. Simultaneously, the C10S.L16/C16S.L7 combination was produced to assess the interaction between *C10QTL2* and *C16QTL*. *C16QTL* behaves epistatically with *C10QTL1* ( $p=0.049$ ), but additively with *C10QTL2* ( $p=0.31$ ) (Table I and Fig. 1c, d (IV-1)). Thus, *C16QTL* and *C10QTL1* belong to EM1. Modeled on classifying *C16QTL*, other QTLs were analyzed in ‘double’ congenic combinations. In all, 27 ‘double’ congenic combinations were created and independently examined (Table I). All QTLs (Supplemental Fig.S1 (IV-1)) participated in either EM1 or EM2 except for *C2QTL1* (Table II (IV-1)). *C2QTL1* acted additively with both *C10QTL1* and *C10QTL2*, and, consequently, belongs to a separate EM: EM3.

EM1, EM2 and EM3 have 16, 8 and 1 members, respectively (Table II (IV-1)). Three QTLs belonged to either EM1 or EM2, but their precise classification was not established. Genetic hierarchy exists among the QTLs in each module. In EM2, the BP-decreasing *C10QTL2* stands higher in hierarchy than the BP-increasing *C8QTL2*, because the effect of *C10QTL2* masks that of *C8QTL2*, not *vice versa* (Table I and Fig.1f (IV-1)).

Next, we addressed the issue of whether or not modularized groupings of BP QTLs had biological meanings or were just statistical rituals devoid of them. We reasoned that, if EM1 and EM2 were fundamental function blocks, BP should stay constant, regardless of how many QTLs are present from each module.

**Table II (IV-1) : Modularization of BP QTLs by epistasis**

<b>EM #</b>	<b>QTLs included</b>	<b>Model QTL</b>	<b>Candidate genes for model QTLs</b>
EM1	<i>C10QTL1, C10QTL3, C10QTL5, C3QTL1, C3QTL2, C3QTL3, C8QTL1, C16QTL, C18QTL1, C18QTL2, C18QTL3, C18QTL4, C2QTL2, C2QTL4M, C2QTL5, C2QTL6, (C7QTL, C1QTL1 and C1QTL3)</i>	<i>C10QTL5, C18QTL3</i>	<i>Proline-rich 11 (Prr11) Alpha kinase 2 (Alpk2)</i>
EM2	<i>C10QTL2, C10QTL4, C2QTL4L, C8QTL2, C1QTL2, C17QTL1, C17QTL2, C2QTL3, (C7QTL, C1QTL1 and C1QTL3)</i>	<i>C10QTL2</i>	<i>ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 8a (Abca8a)</i>
EM3	<i>C2QTL1</i>	<i>C2QTL1</i>	Unidentified

Table II (IV-1) legend: QTLs in parentheses belong to either EM1 or EM2. All QTL-QTL interactions were assessed in the current work except for those closely linked on the same chromosome, such as C2QTL2, C2QTL4M, C2QTL5 and C2QTL6, being in the same epistatic module, EM1 (29), C3QTL1 and C3QTL2 in the same module (11), C10QTL1, C10QTL3 and C10QTL5 in the same module (10,12), and C18QTL1, C18QTL2, C18QTL3 and C18QTL4 in the same module (27,30). Abca8a and Ppr11 are identified from (31), and Alpk2 from (30).



#### IV-1.4.3 Biological significance of QTL modularization

To prove that EM1 and EM2 constitute 2 essential functional cores in BP regulation, we generated multiple QTL combinations, each of them containing at least 1 member from EM1 and EM2, all carrying BP-lowering QTL alleles (Supplemental Table.S1 (IV-1)). 3 to 8 BP QTL combinations were similar ( $p>0.15$ ) to those of 2 QTLs (*C10QTL1* + *C10QTL2*) (Fig. 2 (IV-1)), as if EM1 + EM2 exerted a ‘ground floor’ effect. This outcome was not due to bottom limit, because the BP of Lewis rats (95mmHg) seemed still lower ( $p<0.001$ ) than that of EM1+EM2 combined (110-125 mmHg). Consequently, more QTLs beyond the 2 core members, each from EM1 and EM2, became redundant rather than cumulative in their combined impact on BP.

Next, we examined correspondence between the BP QTLs found in our animal model and those identified in humans.

#### IV-1.4.4 Implications of modularization for human QTLs

11 out of 42 (26%) human genes or QTL intervals (underlined in Supplemental Table II (IV-1)) (2,4,5) were included in 8 congenic strains demonstrating BP effects. Their rat homologues belonged to either EM1 or EM2 affecting BP. *MOV10*, *CAPZA1* and *FIGN/GRB14* were contained in large congenic strains, C2S.M (13) and C3S.L2 (11), but were not modularized for lack of appropriate congenic strains that could isolate them from adjacent QTLs.

We then analyzed rat homologues of human genes implicated in BP regulation or harboring structural mutations. C1S.L2 traps 4 human QTLs around ADM (Supplemental Fig.S1a (IV-1)) that interact epistatically with *C10QTL1* + *C10QTL2* (Table I (IV-1)), i.e. they belong to either EM1 or EM2 (Table II (IV-1)). C3S.L7 (14) carries the segment harboring *Jag1/Gnas/EDN3*, corresponding to *C3QTL3* (EM1) (Table II (IV-1) and Supplemental Fig.S1b (IV-1)). The coding regions and exon-intron junctions for *Adm* (15) and *Edn3* (16) are

identical between DSS and Lewis [and DSR rats (17) for *Edn3*] (Supplemental Table. III-a, b (IV-1)).

Although a non-synonymous *HFE* SNP is associated with human BP (2), and *Hfe* is situated in the *C17QTL2*-lodging interval (Supplemental Fig.S1h (IV-1)), no structural and splicing *Hfe* mutations were detected (Supplemental Table.SII-c (IV-1)). Barring variants impacting on their gene expressions, *Adm*, *Edn3* and *Hfe* themselves are not supported as BP QTLs. Nevertheless, *C17QTL2* marked by *Hfe* exists and belongs to EM2 (Table II (IV-1)).

11 out of 42 human QTLs, such as *GUCY1A3-GUCY1B3*, *SLC39A8*, and *NPR3-C5orf23*, were excluded as BP QTLs contrasting DSS rats with a specific normotensive strain (Table II (IV-1) and Supplemental Fig.S1e (IV-1)). They may still influence BP in other strain comparisons, because different normotensive, and probable hypertensive, strains may have distinctive genetic determinants (18). Thus, the specific gene for these human QTLs await functional identification.

## IV-1.5 Discussion

Significant revelations from this study are: **(a)** 28 QTLs that can provoke hypertension regulate BP via 3 functional modules, namely, EM1, EM2 and EM3. Modularity in QTL actions gives rise to a novel genetic concept. This unique mechanism may help shed light on the functionality of certain human BP QTLs. **(b)** EM1 and EM2 are fundamental modules that provide novel insights into the genetic mechanisms and hierarchy globally governing BP homeostasis.

### IV-1.5.1 Epistatic modularization, not quantitative accumulation, is the *modus operandi* in biological BP determination by QTLs.

The prevailing view is that a complex and quantitative trait, such as BP, must be realized by arithmetic accumulation of numerous QTLs, each of which has only a miniscule influence on overall phenotype. Counter-intuitively, the effects of DSS QTLs individually and

in assembly do not produce a spectrum of continuous BP variations, but rather impact BP as ‘units’ in relatively clear-cut ‘leaps’ (Fig. 2 (IV-1)). This genetic insight suggests that the aggregating outcome of multiple QTLs in DSS rats is achieved via a modularized mechanism, not progressive increments. All QTLs in the same EM may be interpreted to be components up- or down-stream in a common pathway. Accordingly, EM1 and EM2 seem to be multi-component pathways.

The modularized modality of QTLs in controlling BP in the DSS inbred model has added a new dimension to, but does not nullify or replace, the established norm governing those in outbred populations at large. BP appears as a continuum in a distribution curve in general human populations (2) and outbred animals. The gene actions determining this continuum should now include the modularized mechanism in addition to the small-effect-but-cumulative paradigm (2).

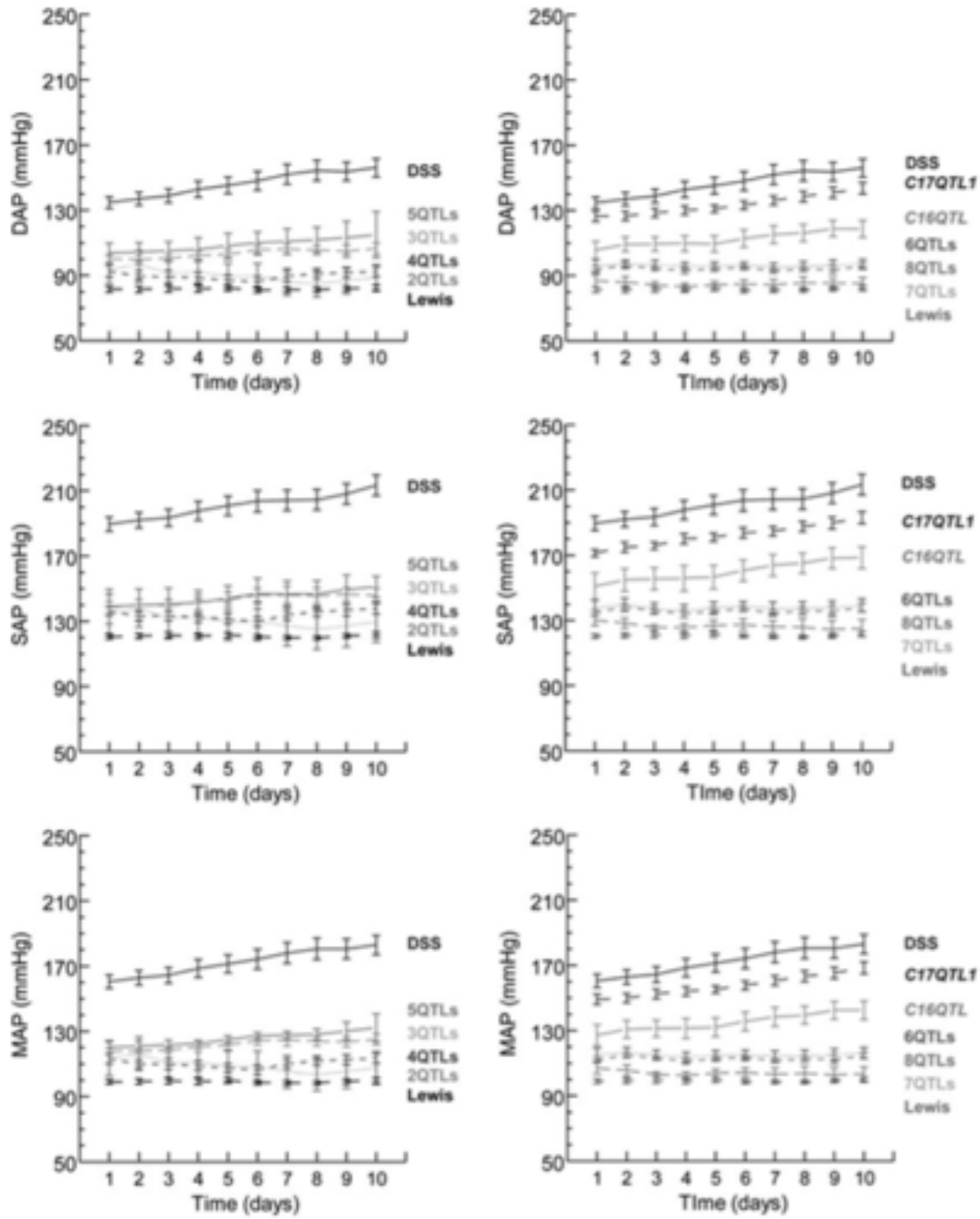
Although the modularity of BP QTLs does exist in an inbred model, it is not evident whether or not, and to what extent, it can be generalized to an outbred population, such as in humans. An outbred population consists of myriad individuals, and each of them, or monozygotic twins (or multiple births), can be viewed as an inbred strain. Conceivably, QTLs may be modularized in their influence on BP in some individuals, but not in others. It is possible that certain QTLs may be modularized across heterogeneous individuals. The only way to establish modularity between 2 QTLs is to isolate a QTL and then combine both of them. This approach is not achievable in outbred populations, but individual QTLs can be isolated in inbred rodent models and tested, as in the current study.

In this context, it is necessary to distinguish the actual biological impact of a QTL from the statistically-estimated magnitude of phenotypic effect and the statistically-fractionated contribution of each QTL to the whole phenotype. For example, after typical genetic analysis in a F2 (DSS x Lewis) population (19), the magnitude of BP effect for each QTL was calculated and the contribution to global BP calculated statistically as a percentage, accounting for total variance. While these estimates are widely accepted as the standard genetic interpretation of a QTL action (20), the true biological effects of QTLs individually and in

combination only become clear in isolation and in pair-wise combinations. It turns out that all QTLs contrasting DSS and Lewis rats are modularized in their effects on BP (Table II (IV-1)). Considering that individuals in a F2 population are genetically heterogeneous, they approximately resemble an outbred population. Thus, the statistical treatment of QTLs in an outbred or F2 population follows the principles of population genetics, whereas the modularity of QTLs is governed by their biological impact on BP. They represent 2 different aspects of QTL characterization, namely, statistical vs. biological, depending on the context of analysis and the rigor of functional validation.

Discovering QTL modularity is important in that it paves the way for identifying and understanding a common pathway to BP homeostasis and the hierarchical relationship among pathway components.

Once again, the limited application of the modularized mechanism is obvious, as it appears in inbred strains. This mechanism is yet to be tested in outbred populations. Whether or not QTLs would function cumulatively or otherwise in a physiological setting in outbred human populations awaits further functional proves beyond simple statistics. Nevertheless, the modularity exists as shown in our current work, and is a possibility that warrants attention in the future research of human polygenic hypertension.



**Figure 2 (IV-1): BPs of single and multiple congenic strains producing 1-8 QTL combinations**

Legend to Figure 2 (IV-1): DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure. Error bars represent SEM. n of strains ranges from 5 to 12. BP response patterns, such as diurnal variations among all congenic strains, were not different. For simplicity of presentation and comparison, a 24-hour BP average is considered as 1 data point on the graph for each strain. C16QTL and C17QTL1 are defined by single congenic strains C16S.L7 and C17S.L11 respectively (Supplemental Fig. S1g, S1h (IV-1)). A 2-QTL combination was achieved by combining 2 congenic strains carrying them, then 3, 4, and so on. 2 (or multiple) closely-linked QTLs are combined into a congenic strain containing both of them (or multiples). 2 QTLs are C10QTL1 (epitomizing EM1) + C10QTL2 (exemplifying EM2); 3 QTLs are C10QTL4 (EM2) + C18QTL3 (EM1) + C2QTL6 (EM1); 4 QTLs are C10QTL1 (EM1) + C10QTL2 (EM2) + C2QTL4M (EM1) + C2QTL5 (EM1); 5 QTLs are C2QTL5 (EM1) + C10QTL4 (EM2) + C16QTL (EM1) + C18QTL3 (EM1) + C18QTL4 (EM1); 6 QTLs are C10QTL4 (EM2) + C10QTL5 (EM1) + C10QTL1 (EM1) + C10QTL3 (EM1) + C10QTL2 (EM2) + C3QTL1 (EM1); 7 QTLs are C10QTL4 (EM2) + C10QTL5 (EM1) + C10QTL1 (EM1) + C10QTL3 (EM1) + C10QTL2 (EM2) + C18QTL1 (EM1) + C18QTL2 (EM1); and 8 QTLs are C10QTL2 (EM2) + C10QTL3 (EM1) + C3QTL3 (EM1) + C2QTL3 (EM2) + C2QTL2 (EM1) + C2QTL4M (EM1) + C2QTL5 (EM1) + C2QTL6 (EM1). EM, epistatic module (Table 2). ANOVA + Dunnett values for all BP components are  $p < 0.03$  (most conservative) for DSS vs congenic strains trapping QTLs;  $p < 0.01$  for congenic strains harboring C16QTL or C17QTL1 vs congenic strains containing 2-8 QTLs and Lewis.

#### IV-1.5.2 Pathway of epistatic modules

Candidate genes have been identified for several QTLs in EM1. They are *Loc100363423* for *C10QTL3*, *Proline-rich 11 (Prr11)* for *C10QTL5*, *Alpha kinase 2 (Alpk2)* for *C18QTL3*, and 5 candidates for *C10QTL1* (Table II (IV-1) and Supplemental Fig. S1 (IV-1)). Since all these genes are not known to regulate BP biologically and even their cellular functions are not identified, the physiological mechanisms by which they influence BP might fall in the same pathway, because they belong to the same module. This framework may pave the way for identifying one QTL based on a known mechanism of another QTL in the same epistatic module. For example, assuming that *Alpk2* may encode a kinase that might be involved in BP control, *PRR11* could somehow participate in the *ALPK2* pathway.

One candidate gene was found for *C10QTL2* in EM2 to be *ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 8a (Abca8a)*. *ABCA8A* belongs to a family of transporters that are implicated in the high-density lipoprotein metabolism, atherogenesis and coronary heart disease via control of cholesterol efflux (21). The mechanism of its involvement in BP homeostasis is not known, but based on *Abca8a* being in EM2, the mode of its action may be independent of those of *Alpk2* and *Prr11*, which belong to EM1.

Nevertheless, these QTLs in EM1 and EM2 are novel and may influence BP either directly or indirectly via regulation of other genes or their products known to affect BP.

In contrast, genes encoding well-known molecules are either excluded or unsupported as etiologically BP-impacting agents, such as *Ace*, *Nos2*, *Adm*, *Edn3*, *Npr1*, *Npr3*, *Gucyl1a3*, *Gucyl1b3*, *Atp1a1*, *Adrb2*, and *Nedd4l* (Table II (IV-1) and Supplemental Fig. S1 (IV-1)). How can they be important in BP regulation? One possibility is that they may not be primary triggers, but secondary responders to triggers such as *Abca8a* and *Prr11* in BP homeostasis.

Given the power of resolution in modern GWAS of BP QTLs, only 11 human QTLs corresponding to those found in the Dahl model were detected. The majority of rat QTLs were ‘missed’, especially those on Chr 2, 10 and 18, in human studies (Supplemental Fig. S1 (IV-1)).

A few factors may explain this discrepancy. First, certain QTLs found in rats may be rodent-specific and they may not function as triggers to initiate hypertension in humans. Second, since a high-salt diet was included in the BP protocol, certain QTLs found under this condition may mostly apply to salt-accelerated hypertension. Third, in human studies, both women and men were assumed to be recruited and the data on them were pooled, whereas in our current animal model, only males were investigated. There is evidence that some rat QTLs affect BP only in males, not in females (22). Thus, certain rat QTLs may be sex-specific. Finally, some rat QTLs were detected only when the genetic background was homogeneous, not when it was heterogeneous. For example, a QTL on Chr 7 was detected only in a congenic strain (18), but was missed in a F<sub>2</sub> (DSS x Lewis) population (19). Human populations are heterogeneous, whereas our congenic strains are homogeneous.

#### **IV-1.6 Conclusion**

In summary, multiple QTLs function via specific modules in the inbred DSS model. In designing anti-hypertensive drugs, simultaneously targeting mediators in 2 separate modules seems more effective in lowering BP of a hypertensive individual than targeting those in the same module. Functional hierarchy exists among QTLs in the same EM, which is demonstrated by the interplay between BP-increasing and BP-decreasing QTL alleles. 26% of human QTLs have rat homologues that belong to EM1 and EM2 combined, implying that certain human QTLs might function via a modularized mechanism. The QTLs identified in animal models (Supplemental Table. S-I (IV-1)) may facilitate the discovery of further genetic architecture in humans that is hidden from the most powerful GWAS, but is pertinent to essential hypertension, since 116 human QTLs are estimated to exist (2) and only 28 have been found.



## **IV-1.7 Materials and Methods**

### **IV-1.7.1 Animals**

Although inbred DSS rats are known as a model of salt-sensitivity (23), the QTLs governing their BP can act either on low or high-salt diets (24). Thus, the genetic determination of hypertension in DSS rats can serve as a general model of essential hypertension. Protocols for handling and maintaining animals were approved by our institutional animal ethics committee (CIPA).

### **IV-1.7.2 Construction of new congenic strains or substrains**

DSS and Lewis rats were parents in the production of congenic strains. Breeding and screening procedures were accelerated similarly to those reported previously (8). New strains were validated by polymorphic microsatellite markers with an overall marker density of 10-20 cM/marker across the genome. The genotypes of markers are indicated in Supplemental Figure 1 for the region where crossovers were sought to derive congenic substrains. In the current work, 4 new congenic strains were produced (Supplemental Fig. S1a, S1c (IV-1)) and designated as C1S.L2, C1S.L3, C1S.L4 and C5S.L. C1 refers to Chr 1; S.L denotes congenic substitution of a chromosomal segment from hypertensive DSS rats by their homologue from Lewis rats in the DSS genetic background. A number following S.L indicates # of congenic strains.

One new sub-line came from C16S.L5 (14), designated as C16S.L7 (Supplemental Fig. S1g (IV-1)). 3 new sub-lines were derived from C17S.L2 (25), designated as C17S.L9, C17S.L11 and C17S.L12, respectively (Supplemental Fig. S1h (IV-1)).

### **IV-1.7.3 Systematic assessment of QTL-QTL interactions by congenic combinations**

A congenic strain relies on specific replacement of a chromosome segment from the recipient strain by its homologue from a donor, while keeping the remaining genome as that of

the recipient (26). In a sense, the congenic strategy is similar to that of ‘knock in’. If BP changes in a congenic strain, a QTL should reside within the chromosome segment replaced.

Supplemental Figure S1 (IV-1) depicts congenic strains entrapping the QTLs under study. Only congenic strains produced in the DSS genetic background were utilized, because those made in the Lewis background did not exhibit any BP effect (18,27) and thus cannot be informative on QTL-QTL interactions.

Each interaction was tested independently in that each time only 3 strains in a comparison were measured for BP along with DSS rats. For example, when analyzing the interaction between *C10QTL1* and *C10QTL2* (Table I (IV-1) and Supplemental Fig. S1a (IV-1)), only 3 congenic strains plus DSS were analyzed simultaneously, i.e. DSS, C10S.L30, C10S.L16 and C10S.L30/C10S.L16. To analyze the interaction between *C10QTL2* and *C10QTL4*, only DSS, C10S.L16 (Table I and Supplemental Fig. S2b (IV-1)), C10S.L28 and C10S.L16/C10S.L28 were studied, and so forth for the remaining comparisons listed in Table I (IV-1).

#### **IV-1.7.4 Animal protocols and BP measurements**

Breeding protocols and dietary treatments were the same as reported previously (8). Male rats were weaned at 21 days of age, maintained on a low-salt diet (0.2% NaCl), then fed a high-salt diet (2% NaCl), starting from 35 days of age until the end of the experiment. Telemetry probes were implanted when the rats were 8 weeks old (i.e. after 3 weeks on the 2% NaCl diet). BPs for all strains were measured continuously for 2 weeks, starting from the 10th day of post-operative recuperation.

#### **IV-1.7.5 Statistical analysis**

Repeated measures’ analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett’s test (taking multiple comparisons and sample sizes into account) compared DBP, SBP and MAP between groups, as reported previously (10,28). 2 x2 ANOVA assessed QTL-QTL interactions (or lack thereof) by evaluating whether the observed effect of a ‘double’ or ‘multiple’ congenic strain

combining separate QTLs was significantly different from a predicted sum of effects from each individual QTL (10,28) .

#### **IV-1.8 References**

1. Kearney,P.M., Whelton,M., Reynolds,K., Muntner,P., Whelton,P.K., and He,J. (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365, 217-223.
2. International Consortium for Blood Pressure (2011) Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 478, 103-109.
3. Chobanian,A.V., Bakris,G.L., Black,H.R., Cushman,W.C., Green,L.A., Izzo,J.L., Jones,D.W., Materson,B.J., Oparil,S., Wright,J.T., et al. (2003) Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42, 1206-1252.
4. Kato,N., Takeuchi,F., Tabara,Y., Kelly,T.N., Go,M.J., Sim,X., Tay,W.T., Chen,C.H., Zhang,Y., Yamamoto,K., et al. (2011) Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet* 43, 531-538.
5. Wain,L.V., Verwoert,G.C., O'Reilly,P.F., Shi,G., Johnson,T., Johnson,A.D., Bochud,M., Rice,K.M., Henneman,P., Smith,A.V., et al. (2011) Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure. *Nat Genet* 43, 1005-1011.
6. Deng,A.Y. (2007) Genetic basis of polygenic hypertension. *Hum Mol Genet* 16, R195-R202.
7. Rapp,J.P. (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 80, 135-172.

8. Ariyarajah,A., Palijan,A., Dutil,J., Prithiviraj,K., Deng,Y., and Deng,A.Y. (2004) Dissecting quantitative trait loci into opposite blood pressure effects on Dahl rat chromosome 8 by congenic strains. *J Hypertens* 22, 1495-1502.
9. Eliopoulos,V., Dutil,J., Deng,Y., Grondin,M., and Deng,A.Y. (2005) Severe hypertension caused by alleles from normotensive Lewis for a quantitative trait locus on chromosome 2. *Physiol Genomics* 22, 70-75.
10. Charron,S., Duong,C., Menard,A., Roy,J., Eliopoulos,V., Lambert,R., and Deng,A.Y. (2005) Epistasis, not numbers, regulates functions of clustered Dahl rat quantitative trait loci applicable to human hypertension. *Hypertension* 46, 1300-1308.
11. Palijan,A., Dutil,J., and Deng,A.Y. (2003) Quantitative trait loci with opposing blood pressure effects demonstrating epistasis on Dahl rat chromosome 3. *Physiol Genomics* 15, 1-8.
12. Chauvet,C., Charron,S., Menard,A., Xiao,C., Roy,J., and Deng,A.Y. (2008) Submegabase resolution of epistatically interacting quantitative trait loci for blood pressure applicable for essential hypertension. *J Hypertens* 26, 893-901.
13. Dutil,J., Eliopoulos,V., Tremblay,J., Hamet,P., Charron,S., and Deng,A.Y. (2005) Multiple quantitative trait loci for blood pressure interacting epistatically and additively on dahl rat chromosome 2. *Hypertension* 45, 557-564.
14. Duong,C., Charron,S., Xiao,C., Hamet,P., Menard,A., Roy,J., and Deng,A.Y. (2006) Distinct quantitative trait loci for kidney, cardiac, and aortic mass dissociated from and associated with blood pressure in Dahl congenic rats. *Mamm Genome* 17, 1147-1161.
15. Nicholls,M.G., Lainchbury,J.G., Lewis,L.K., McGregor,D.O., Richards,A.M., Troughton,R.W., and Yandle,T.G. (2001) Bioactivity of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in man. *Peptides* 22, 1745-1752.

16. Inoue,A., Yanagisawa,M., Kimura,S., Kasuya,Y., Miyauchi,T., Goto,K., and Masaki,T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct iso-peptides predicted by three separate genes. *Proc Nat Acad Sci USA* 86, 2863-2867.
17. Lee,S.J., Liu,J., Westcott,A.M., Vieth,J.A., DeRaedt,S.J., Yang,S., Joe,B., and Cicila,G.T. (2006) Substitution mapping in dahl rats identifies two distinct blood pressure quantitative trait loci within 1.12- and 1.25-mb intervals on chromosome 3. *Genetics* 174, 2203-2213.
18. Crespo,K., Chauvet,C., Blain,M., Menard,A., Roy,J., and Deng,A.Y. (2011) Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes. *J Hypertens* 29, 460-465.
19. Garrett,M.R., Dene,H., Walder,R., Zhang,Q., Cicila,G.T., Assadnia,S., Deng,A.Y., and Rapp,J.P. (1998) Genomic scan and congenic strains for blood pressure quantitative trait loci using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res* 8, 711-723.
20. Lander,E., Kruglyak,L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11, 241-247.
21. Jensen,M.K., Pai,J.K., Mukamal,K.J., Overvad,K., and Rimm,E.B. (2007) Common genetic variation in the ATP-binding cassette transporter A1, plasma lipids, and risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 195, e172-e180.
22. Deng,A.Y., Menard,A., Xiao,C., and Roy,J. (2008) Sexual dimorphism on hypertension of quantitative trait loci entrapped in dahl congenic rats. *Clin Exp Hypertens* 30, 511-519.
23. Dahl,L.K., Heine,M., and Tassinari,L. (1962) Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. *Nature* 194, 480-482.
24. Huang,B.S., Ahmad,M., Deng,A.Y., and Leenen,F.H. (2007) Neuronal responsiveness to central Na<sup>+</sup> in 2 congenic strains of Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 49, 1315-1320.

25. Grondin,M., Eliopoulos,V., Lambert,R., Deng,Y., Ariyarajah,A., Moujahidine,M., Dutil,J., Charron,S., and Deng,A.Y. (2005) Complete and overlapping congenics proving the existence of a quantitative trait locus for blood pressure on Dahl rat chromosome 17. *Physiol Genomics* 21, 112-116.
26. Deng,A.Y. (2007) (a) Positional cloning of quantitative trait loci for blood pressure: how close are we?: a critical perspective. *Hypertension* 49, 740-747.
27. Charron,S., Lambert,R., Eliopoulos,V., Duong,C., Menard,A., Roy,J., and Deng,A.Y. (2005) A loss of genome buffering capacity of Dahl salt-sensitive model to modulate blood pressure as a cause of hypertension. *Hum Mol Genet* 14, 3877-3884.
28. Rapp,J.P., Garret,M.R., and Deng,A.Y. (1998) Construction of a double congenic strain to prove an epistatic interaction on blood pressure between rat chromosomes 2 and 10. *J Clin Invest* 101, 1591-1595.
29. Chauvet,C., Menard,A., Tremblay,J., Xiao,C., Shi,Y., L'heureux,N., Cardin,S., Tardif,J.C., Nattel,S., and Deng,A.Y. (2009) Cardiac pathways distinguish two epistatic modules enacting BP quantitative trait loci and candidate gene analysis. *Hypertens Res* 32, 631-637.
30. Chauvet,C., Crespo,K., Menard,A., Wu,Y., Xiao,C., Blain,M., Roy,J., and Deng,A.Y. (2011) alpha-Kinase 2 is a novel candidate gene for inherited hypertension in Dahl rats. *J Hypertens* 29, 1320-1326.
31. Chauvet,C., Menard,A., Xiao,C., Aguila,B., Blain,M., Roy,J., and Deng,A.Y. (2012) Novel genes as primary triggers for polygenic hypertension. *J Hypertens* 30, 81-86.

## IV-1.9 Supplementary data

**Supplemental data Table S-I (IV-1): Summary of QTLs and their blood pressure effects defined by congenic strains**

Chromosome	QTL names	Congenic strains	DSS allele effect	References
1	C1QTL1 C1QTL2 C1QTL3	C1S.L4 C1S.L3 C1S.L2	BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing	Fig. 1, current work
2	C2QTL4L C2QTL1 C2QTL2 C2QTL3 C2QTL4M C2QTL5 C2QTL6	C2S.L4 C2S.M7 C2S.M19 C2S.M15 C2S.M18 C2S.M21 C2S.M24	BP-increasing BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing	(1-3)
3	C3QTL1 / - BPQTL C3QTL2 / + BPQTL C3QTL3	C3S.L3/S.L3 C3S.L4/S.L4 C3S.L6	BP-decreasing BP-increasing BP-decreasing	(4) (5)
5		C5S.L1	No effect	Fig. 1, current work
7	C7QTL	C7S.L1	BP-decreasing	(6)
8	C8QTL1/- BP QTL C8QTL2/+ BP QTL	C8S.L1 C8S.L2	BP-decreasing BP-increasing	(7)
10	C10QTL1 C10QTL2 C10QTL3 C10QTL4 C10QTL5	C10S.L30 C10S.L16 C10S.L25 C10S.L28 C10S.L29	BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing	(8)
16	C16QTL	C16S.L7	BP-decreasing	(5) and current work
17	C17QTL1 C17QTL2	C17S.L11 C17S.L9	BP-decreasing BP-decreasing	(9) and current work

18	C18QTL1 C18QTL2 C18QTL3	C18S.L4 C18S.L3 C18S.L2	BP-decreasing BP-decreasing BP-decreasing	(10)
----	-------------------------------	-------------------------------	---	------

Legend to Supplemental data Table S-I (IV-1): The extent of their BP effects is shown in Figure 1 (IV-1) in the text. Others QTLs in the DSS genome were not tested because they did not appear in the genetic contrast between DSS and Lewis [or the Milan normotensive (MNS)] rats from which current congenic strains were made. These additional QTLs are summarized in Tables I and II (IV-1) (11) and located on Chromosomes 9, 12, 13 and 15.



**Supplemental data Table S-II (IV-1): Correspondence of human blood pressure quantitative trait loci (QTLs) and their rat homologues**

<b>Human QTL interval</b>	<b>Human SNPs</b>	<b>Rat Chr/ Congenics</b>	<b>Comments References</b>	<b>Epistatic module (EM) #</b>
<b><u>FURIN-FES</u></b>	rs2521501	1 C1S.L2	Included in Fig. 1(a), (12)	EM1 or EM2
<b><u>ADM</u></b>	rs7129220	1 C1S.L2	Included in Fig. 1(a), (12)	EM1 or EM2
<b><u>PLEKHA7</u></b>	rs381815	1 C1S.L2	Included in Fig. 1(a), (12)	EM1 or EM2
<b><u>PLCE1</u></b>	rs932764	1 C1S.L2	Included in Fig. 1(a), (12)	EM1 or EM2
<b><u>MOV10</u></b>	rs2932538	2 C2S.M	Included in Fig. 1(e), (1,12)	undefined
<b><u>CAPZA1</u></b>	rs17030613	2 C2S.M	Included in Fig. 1(e), (1,13)	undefined
<b><u>JAG1</u></b>	rs1327235	3 C3S.L7	Included in Fig. 1(b), (5,12)	EM1
<b><u>GNAS-EDN3</u></b>	rs6015450	3 C3S.L7	Included in Fig. 1(b), (5,12)	EM1
<b><u>FIGN/GRB14 (MAP)</u></b>	rs1446468 rs16849225	3 C3S.L2	Included in Fig. 1(b), (4,13,14)	undefined
<b><u>NOV (PP)</u></b>	rs2071518	7 C7S.L	Included in Fig. 1(d), (6,14)	EM1 or EM2

<b><u>HFR</u></b>	rs17367504	5	Excluded, Fig. 1(c), (12)	
		C5S.L		
<b><u>CASZ1</u></b>	rs880315	5	Excluded, Fig. 1(c), (13)	
		C5S.L		
<b><u>ZNF652</u></b>	rs16948048	10	Excluded, Fig. 1(f), (12,15)	
		C10S.L12		
<b><u>PLCD3</u></b>	rs12946454	10	Excluded, Fig. 1(f), (12,15)	
		C10S.L8		
<b><u>GOSR2</u></b>	rs17608766	10	Excluded, Fig. 1(f), (12,15)	
		C10S.L8		
<b><u>CACNB2</u></b>	rs11014166	17	Excluded, Fig. 1(h), (9,12)	
	rs4373814	C17S.L3		
<b><u>CYP17A1</u></b>	rs1119154,	1	(12)	Untested
	rs1004467	Non		
	rs11191548			
<b><u>ADRB1</u></b>	rs2782980	1	(14)	Untested
	<b><u>(MAP)</u></b>	Non		
<b><u>CNNM2/</u></b>	rs11191548	1	(13)	Untested
	<b><u>NT5C2</u></b>	Non		
<b><u>PIK3CG</u></b>	rs17477177	6	(14)	Untested
	<b><u>(PP)</u></b>	Non		
<b><u>ATP2B1</u></b>	rs2681492/	7	(12)	Untested
	rs2681472	Non		
	rs17249754			

Legend to supplemental data Table S-II (IV-1): The underlined intervals in bold emphasize the inclusion (i.e. included) of a human homologue in a congenic strain exhibiting a BP effect (Fig. 1 (IV-1) in the text). ‘Excluded’ refers to the human homologue in the rat that have been excluded as a candidate gene because a congenic strain carrying it does not exhibit a BP effect.

Epistatic modules (EM) are defined in Table I (IV-1) and summarized in Table II (IV-1) in the text. *ADAMTS8*, metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8; *ADM*, adrenomedullin; *ADRB1*, adrenergic, beta-1-, receptor; *ALDH2*, aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial); *ATP2B1*, ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1; *BAT2*(*PRRC2b*), proline-rich coiled-coil 2B; *BAT5* (*ABHD16A*), ab hydrolase domain containing 16A; *C5orf23*, chromosome 5 open reading frame 23; *C10orf107*, chromosome 10 open reading frame 107; *CACNB2*, calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit; *CAPZA1*, capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1; *CASZ1*, castor zinc finger 1; *CHIC2*, cysteine-rich hydrophobic domain 2; *CNNM2*, cyclin M2; *CSK*, c-src tyrosine kinase; *CYP1A2*, cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2; *CYP17A*, cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1; *EBF1*, early B-cell factor 1; *EDN3*, endothelin 3; *ENPEP*, glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A); *FES*, feline sarcoma oncogene; *FGF5*, fibroblast growth factor 5; *FIGN*, fidgetin; *FLJ32810*(*ARHGAP42*), Rho GTPase activating protein 42 ; *FURIN*, paired basic amino acid cleaving enzyme; *GNAS*, GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus; *GOSR2*, golgi SNAP receptor complex member 2; *GRB14*, growth factor receptor-bound protein 14; *GUCY1A3*, guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3; *GUCY1B3*, guanylate cyclase 1, soluble, beta 3; *HFE*, hemochromatosis; *JAG1*, jagged 1; *MAP4*, microtubule-associated protein 4; *MECOM* , MDS1 and EVI1 complex locus; *MTHFR*, methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H); *MOV10*, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse); *NOV*, nephroblastoma overexpressed gene; *NPR3*, natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C); *NT5C2*, 5'-nucleotidase, cytosolic II; *PIK3CG*, phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide; *PLCD3*, phospholipase C, delta 3; *PLCE1*, phospholipase C, epsilon 1; *PLEKHA7*, pleckstrin homology domain containing, family A member 7; *PTPN11*, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; *RPL6*, ribosomal protein L6; *SH2B3*, SH2B adaptor protein 3; *SLC4A7*, solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7; *SLC39A8*, solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8; *STL7*, Serum triglyceride level QTL 7; *TBX3*, T-box 3; *TBX5*, T-box

5; *TMEM133*, transmembrane protein 133; *ULK3*, unc-51-like kinase 3; *ULK4*, unc-51-like kinase 4 (*C. elegans*); *ZNF652*, zinc finger protein 652. Chr, chromosome; PP, pulse pressure; MAP, mean arterial pressure.

**Supplemental data Table S-IIIa (IV-1): Sequence alignment of *Adrenomedulin* (*Adm*) between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats**

```

DSS      GTTTCCTGGTGACACTAGGCAGACACTCCAGCCTTTACCGCTCCTGGTTTCTCGGCTTCT 60
Lewis    GTTTCCTGGTGACACTAGGCAGACACTCCAGCCTTTACCGCTCCTGGTTTCTCGGCTTCT 60
*****

DSS      CATCGCAGTCAGTCTTGGACTTTGCGGGTTTTGCCGCTGTCAGAAGGACGTCTCGGACTT 120
Lewis    CATCGCAGTCAGTCTTGGACTTTGCGGGTTTTGCCGCTGTCAGAAGGACGTCTCGGACTT 120
*****

          ↓

DSS      TCTGCTTCAAGTGCTTGACAACCTCACCTTTTCCAGCAGGtaggaaccg...tcctttccagGGT 180
Lewis    TCTGCTTCAAGTGCTTGACAACCTCACCTTTTCCAGCAGGtaggaaccg...tcctttccagGGT 180
*****

DSS      ATCGGAGCATCGCTACAGAAATGAAGCTGGTTTCCATCGCCCTGATGTTATTGGGTTTCGCT 240
Lewis    ATCGGAGCATCGCTACAGAAATGAAGCTGGTTTCCATCGCCCTGATGTTATTGGGTTTCGCT 240
*****

          ↓

DSS      CGCCGTCTCGGCGCGGACACCGCACGGCTCGACACTTCCTCGCAGTTCGAAAGAAgtg 300
Lewis    CGCCGTCTCGGCGCGGACACCGCACGGCTCGACACTTCCTCGCAGTTCGAAAGAAgtg 300
*****

DSS      agtttg...tgttttctagGTGGAATAAGTGGGCGCTAAGTCGTGGGAAGAGGGAAC TACAA 360
Lewis    agtttg...tgttttctagGTGGAATAAGTGGGCGCTAAGTCGTGGGAAGAGGGAAC TACAA 360
*****

DSS      GCGTCCAGCAGTACCCTACGGGCTCGTTGATGAGAAGACAGTCCCGACCCAGACTCTT 420
Lewis    GCGTCCAGCAGTACCCTACGGGCTCGTTGATGAGAAGACAGTCCCGACCCAGACTCTT 420
*****

          ↓

DSS      GGGCTCCAGGACAAGCAGAGCAGCTTAGCACCCACAAGCCAGgtaactaact...ttctcc 480
Lewis    GGGCTCCAGGACAAGCAGAGCAGCTTAGCACCCACAAGCCAGgtaactaact...ttctcc 480
*****

DSS      gcagCACTCAGAGCACAGCCACATTCGAGTCAAACGCTACCGCCAGAGCATGAACCAGG 540
Lewis    gcagCACTCAGAGCACAGCCACATTCGAGTCAAACGCTACCGCCAGAGCATGAACCAGG 540

```

```

*****
DSS      GGTCCCGCAGCACTGGATGCCGCTTTGGGACCTGCACAATGCAGAACTGGCTCACCAGA 600
Lewis    GGTCCCGCAGCACTGGATGCCGCTTTGGGACCTGCACAATGCAGAACTGGCTCACCAGA 600
*****

DSS      TCTACCAGTTTACAGACAAAGACAAGGACGGCATGGCCCCAGAAACAAGATCAGCCCTC 660
Lewis    TCTACCAGTTTACAGACAAAGACAAGGACGGCATGGCCCCAGAAACAAGATCAGCCCTC 660
*****

DSS      AAGGCTATGGCCGCCGCGCCGGCGTTCCCTGCCAGAGGTCTCCGAGCCCGGACTGTGG 720
Lewis    AAGGCTATGGCCGCCGCGCCGGCGTTCCCTGCCAGAGGTCTCCGAGCCCGGACTGTGG 720
*****

DSS      AGTCCTCCAGGAGCAGACACACTCAGCTCCAGCCTCCCGGCGCACCAAGACATCTCCA 780
Lewis    AGTCCTCCAGGAGCAGACACACTCAGCTCCAGCCTCCCGGCGCACCAAGACATCTCCA 780
*****

DSS      GAGTCTCTAGGTTA TAGGTGCGGGTGGCAGCATTGAACAGTCGGGCGAGTATCCCATTGG 840
Lewis    GAGTCTCTAGGTTA TAGGTGCGGGTGGCAGCATTGAACAGTCGGGCGAGTATCCCATTGG 840
*****

DSS      CGCCTGCGGAATCAGAGAGCTTCGCACCCTGAGCGGACTGAGACAATCTTGCAGAGATCT 900
Lewis    CGCCTGCGGAATCAGAGAGCTTCGCACCCTGGCGGACTGAGACAATCTTGCAGAGATCT 900
*****

DSS      GCCTGGCTGCCCTAGGGGAGGCAGAGGAACCCAAGATCAAGCCAGGCTCACGTCAGAAA 960
Lewis    GCCTGGCTGCCCTAGGGGAGGCAGAGGAACCCAAGATCAAGCCAGGCTCACGTCAGAAA 960
*****

DSS      CCGAGAATTACAGGCTGATACTCTCTCCGGGCAGGGGTCTGAGCCACTGCCTTGCCCCT 1020
Lewis    CCGAGAATTACAGGCTGATACTCTCTCCGGGCAGGGGTCTGAGCCACTGCCTTGCCCCT 1020
*****

DSS      CATAAACTGGTTTTCTCACGGGCATACGCCTCATTACTACTTGAACCTTCCAAAACCTA 1080
Lewis    CATAAACTGGTTTTCTCACGGGCATACGCCTCATTACTACTTGAACCTTCCAAAACCTA 1080
*****

DSS      GCGAGGAAAAGTGCAATGCTTGTATACAGCCAAAGGTAACATATCATATTTAAGTTTGTT 1140
Lewis    GCGAGGAAAAGTGCAATGCTTGTATACAGCCAAAGGTAACATATCATATTTAAGTTTGTT 1140
*****

DSS      GATGTCAAGAGGTTTTTTTTTT 1162
Lewis    GATGTCAAGAGGTTTTTTTTTT 1162
*****

```

**Supplemental data Table S-IIIb (IV-1): Sequence alignment of *Endothelin3 (Edn3)* among Dahl salt-sensitive (DSS), Lewis and Dahl salt-resistant (DSR) rats**

```

DSS      GGGCAGCTCGCTCTGAAAGTTCGTGACCGCCTCAGCCAACTAACTCTGAGCCCTGGGACG 60
Lewis   GGGCAGCTCGCTCTGAAAGTTCGTGACCGCCTCAGCCAACTAACTCTGAGCCCTGGGACG 60
DSR     GGGCAGCTCGCTCTGAAAGTTCGTGACCGCCTCAGCCAACTAACTCTGAGCCCTGGGACG 60
*****

DSS      CCCAGTTCAGGCAGCGGCAGGACTCGAAAGCTGTACCCAGTCTCACTACCCTTTTGCGGT 120
Lewis   CCCAGTTCAGGCAGCGGCAGGACTCGAAAGCTGTACCCAGTCTCACTACCCTTTTGCGGT 120
DSR     CCCAGTTCAGGCAGCGGCAGGACTCGAAAGCTGTACCCAGTCTCACTACCCTTTTGCGGT 120
*****

DSS      CACAAGCGGCCACCCTCCAGGCCCGGTGCTCCCGCGCTGATCGGGGTTCATGGAGCTGG 180
Lewis   CACAAGCGGCCACCCTCCAGGCCCGGTGCTCCCGCGCTGATCGGGGTTCATGGAGCTGG 180
DSR     CACAAGCGGCCACCCTCCAGGCCCGGTGCTCCCGCGCTGATCGGGGTTCATGGAGCTGG 180
*****
                                     ↓

DSS      GGCTGTGGCTCCTTCTCGGGCTCACAGTGACCTCCGCTGCAGgtaagcagga...tccccaac 240
Lewis   GGCTGTGGCTCCTTCTCGGGCTCACAGTGACCTCCGCTGCAGgtaagcagga...tccccaac 240
DSR     GGCTGTGGCTCCTTCTCGGGCTCACAGTGACCTCCGCTGCAGgtaagcagga...tccccaac 240
*****

DSS      agCTGCACTGCCTGCACAGCCTGAAATGCTGGGCAGGAGCGGGGACCAGGCAGGTCTGG 300
Lewis   agCTGCACTGCCTGCACAGCCTGAAATGCTGGGCAGGAGCGGGGACCAGGCAGGTCTGG 300
DSR     agCTGCACTGCCTGCACAGCCTGAAATGCTGGGCAGGAGCGGGGACCAGGCAGGTCTGG 300
*****

DSS      GGACCAGGAGGAAAAGAGGGTGCCTGCACACCACCGACCTCGGCGCTGCACGTGCTTCAC 360
Lewis   GGACCAGGAGGAAAAGAGGGTGCCTGCACACCACCGACCTCGGCGCTGCACGTGCTTCAC 360
DSR     GGACCAGGAGGAAAAGAGGGTGCCTGCACACCACCGACCTCGGCGCTGCACGTGCTTCAC 360
*****

DSS      TTATAAGGACAAGGAGTGTGTCTACTACTGCCACCTGGACATCATCTGGATCAACTCC 420
Lewis   TTATAAGGACAAGGAGTGTGTCTACTACTGCCACCTGGACATCATCTGGATCAACTCC 420
DSR     TTATAAGGACAAGGAGTGTGTCTACTACTGCCACCTGGACATCATCTGGATCAACTCC 420
*****
                                     ↓

DSS      Tgagtgagttg...tactctgcagACAGACTGTGCCCTATGGACTGTCCAACCACAGAGGAA 480
Lewis   Tgagtgagttg...tactctgcagACAGACTGTGCCCTATGGACTGTCCAACCACAGAGGAA 480
DSR     Tgagtgagttg...tactctgcagACAGACTGTGCCCTATGGACTGTCCAACCACAGAGGAA 480
*****

```

DSS GCCTCCGGGAAAGAGGTCCTCGGGGCCAGTTCCAGAAAGTCCCAGTCTTCTCCACAGA 540  
Lewis GCCTCCGGGAAAGAGGTCCTCGGGGCCAGTTCCAGAAAGTCCCAGTCTTCTCCACAGA 540  
DSR GCCTCCGGGAAAGAGGTCCTCGGGGCCAGTTCCAGAAAGTCCCAGTCTTCTCCACAGA 540  
\*\*\*\*\*

DSS CACGCTTACGTTGTGCCTGTGCAGGGGTGGATGACAAGGCCTGCGCATACTTCTGTGCAC 600  
Lewis CACGCTTACGTTGTGCCTGTGCAGGGGTGGATGACAAGGCCTGCGCATACTTCTGTGCAC 600  
DSR CACGCTTACGTTGTGCCTGTGCAGGGGTGGATGACAAGGCCTGCGCATACTTCTGTGCAC 600  
\*\*\*\*\*

↓

DSS ACGTCACCAGgtatgacaca...gtccccacagTTATTCCAGGAGAGCAGAAAAGGCAGCTGC 660  
Lewis ACGTCACCAGgtatgacaca...gtccccacagTTATTCCAGGAGAGCAGAAAAGGCAGCTGC 660  
DSR ACGTCACCAGgtatgacaca...gtccccacagTTATTCCAGGAGAGCAGAAAAGGCAGCTGC 660  
\*\*\*\*\*

DSS AGAAGAGAAGCAGGAGACTGGAGGTCCACGTCAAAGgtgagggcag...cttgaatagGCTG 720  
Lewis AGAAGAGAAGCAGGAGACTGGAGGTCCACGTCAAAGgtgagggcag...cttgaatagGCTG 720  
DSR AGAAGAGAAGCAGGAGACTGGAGGTCCACGTCAAAGgtgagggcag...cttgaatagGCTG 720  
\*\*\*\*\*

DSS AAGTCAAGGACAGATAAAGTCCACCAGCCTTAGCTGGCTTTATCGGACCACAACTGATGC 780  
Lewis AAGTCAAGGACAGATAAAGTCCACCAGCCTTAGCTGGCTTTATCGGACCACAACTGATGC 780  
DSR AAGTCAAGGACAGATAAAGTCCACCAGCCTTAGCTGGCTTTATCGGACCACAACTGATGC 780  
\*\*\*\*\*

↓

DSS TTCTTGCTTCCTGCGGTGGATTTCCCCGGCTCTCCctgectgccc 826  
Lewis TTCTTGCTTCCTGCGGTGGATTTCCCCGGCTCTCCctgectgccc 826  
DSR TTCTTGCTTCCTGCGGTGGATTTCCCCGGCTCTCCctgectgccc 826  
\*\*\*\*\*

**Supplemental data Table S-IIIc (IV-1): Sequence alignment of *Hemochromatosis*  
(*Hfe*) between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats**

```

DSS      gtttgaagccTCAGCAATGGCTACAGGGTGA CTCTTGGATCCTCCACGTTTCCAGGTCC 60
Lewis    gtttgaagccTCAGCAATGGCTACAGGGTGA CTCTTGGATCCTCCACGTTTCCAGGTCC 60
*****

DSS      TAGTGA AAAACCGGTGGACCCAGCTGGAGG C ATG GACCGATCAGCTGGGCTCCCTGTGCGG 120
Lewis    TAGTGA AAAACCGGTGGACCCAGCTGGAGG C ATG GACCGATCAGCTGGGCTCCCTGTGCGG 120
*****

                                     ↓

DSS      CTGCTATTGCTGCTGCTGTTGTTGCTGCTGTGGTCCGTGGCCCCGAGGCGCTGCGGCC 180
Lewis    CTGCTATTGCTGCTGCTGTTGTTGCTGCTGTGGTCCGTGGCCCCGAGGCGCTGCGGCC 180
*****

DSS      ggtgagtgcg...gacttccccagGTTACATTCTCTACGATATCTCTTCATGGGTGCCTCAA 240
Lewis    ggtgagtgcg...gacttccccagGTTACATTCTCTACGATATCTCTTCATGGGTGCCTCAA 240
*****

DSS      AGCCAGACCTCGGGCTGCCTTTCTTTGAGGCTCTGGGTTATGTGGATGACCAGCTCTTTG 300
Lewis    AGCCAGACCTCGGGCTGCCTTTCTTTGAGGCTCTGGGTTATGTGGATGACCAGCTCTTTG 300
*****

DSS      TATCCTACAATCACGAGAGTCGCCGTGCTGAGCCCAGGGCCCCATGGATCTTGGGGCAGA 360
Lewis    TATCCTACAATCACGAGAGTCGCCGTGCTGAGCCCAGGGCCCCATGGATCTTGGGGCAGA 360
*****

DSS      CATCAAGCCAGCTGTGGCTGCAGCTGAGTCAGAGCCTGAAAGGGTGGGATTACATGTTC 420
Lewis    CATCAAGCCAGCTGTGGCTGCAGCTGAGTCAGAGCCTGAAAGGGTGGGATTACATGTTC 420
*****

                                     ↓

DSS      TAGTGGACTTCTGGACCATCATGGGCAACTATAACCCAGTAAGGgtatgtagag...tcatt 480
Lewis    TAGTGGACTTCTGGACCATCATGGGCAACTATAACCCAGTAAGGgtatgtagag...tcatt 480
*****

DSS      tccagTCACGAAGTTGAGAGTGGTGCCTGAGTCTCACATCCTGCAGGTGATCCTAGGATG 540
Lewis    tccagTCACGAAGTTGAGAGTGGTGCCTGAGTCTCACATCCTGCAGGTGATCCTAGGATG 540
*****

DSS      TGAGGTGCATGAAGACAACAGTACCAGTGGCTTCTGGAAATATGGCTACGATGGGCAAGA 600
Lewis    TGAGGTGCATGAAGACAACAGTACCAGTGGCTTCTGGAAATATGGCTACGATGGGCAAGA 600
*****

DSS      TCACCTGAATTCTGCCCAAGACACTGAACTGGAGTGCAGCCGAGCCAAGGCCTGGGC 660
Lewis    TCACCTGAATTCTGCCCAAGACACTGAACTGGAGTGCAGCCGAGCCAAGGCCTGGGC 660
*****

```



DSS CACCAAGATGGAGTGGGAAGAGCACAGGATCCGTGCCAGACAGAGCAGGGACTACCTGCA 720  
Lewis CACCAAGATGGAGTGGGAAGAGCACAGGATCCGTGCCAGACAGAGCAGGGACTACCTGCA 720  
\*\*\*\*\*

DSS GAGGGACTGCCCCAGCAGCTGAAGCAGGTCTGGAGCTCCAGAGAGGGTTCTGGGACA 780  
Lewis GAGGGACTGCCCCAGCAGCTGAAGCAGGTCTGGAGCTCCAGAGAGGGTTCTGGGACA 780  
\*\*\*\*\*

↓

DSS GCAAGgtacacgaa...ttccttcaagTGCCTACTTTGGTGAAGTGACTCGCCACTGGGCC 840  
Lewis GCAAGgtacacgaa...ttccttcaagTGCCTACTTTGGTGAAGTGACTCGCCACTGGGCC 840  
\*\*\*\*\*

DSS TCTACAGGGACCTCTCTAAGGTGTCAGGCTCTGAATTTCTTCCCCAGAACATCACTATG 900  
Lewis TCTACAGGGACCTCTCTAAGGTGTCAGGCTCTGAATTTCTTCCCCAGAACATCACTATG 900  
\*\*\*\*\*

DSS AGGTGGTTGAAGGACAGCCAGCCCCTAGATGCCAAGGATGTCAACCCTGAGAACGTGCTG 960  
Lewis AGGTGGTTGAAGGACAGCCAGCCCCTAGATGCCAAGGATGTCAACCCTGAGAACGTGCTG 960  
\*\*\*\*\*

DSS CCAAATGGGGATGGGACCTATCAGGGCTGGCTGACCTTGGCTGTGGCCCTGGAGAAGAG 1020  
Lewis CCAAATGGGGATGGGACCTATCAGGGCTGGCTGACCTTGGCTGTGGCCCTGGAGAAGAG 1020  
\*\*\*\*\*

DSS ACAAGGTTTCAGCTGTCAAGTGGAGCACCCAGGCCTGGATCAGCCTCTCACTGCCACTTGG 1080  
Lewis ACAAGGTTTCAGCTGTCAAGTGGAGCACCCAGGCCTGGATCAGCCTCTCACTGCCACTTGG 1080  
\*\*\*\*\*

↓

DSS Ggtgagyacgg...ttgttttagAGCCCTCACGGTCTCAGGACATGATTATTGGAATCATAA 1140  
Lewis Ggtgagyacgg...ttgttttagAGCCCTCACGGTCTCAGGACATGATTATTGGAATCATAA 1140  
\*\*\*\*\*

DSS GTGGGATCACCATTTGTGCCATCTTCTTTGTGGAATTCTGATCCTAGTCTTAAGGAAAA 1200  
Lewis GTGGGATCACCATTTGTGCCATCTTCTTTGTGGAATTCTGATCCTAGTCTTAAGGAAAA 1200  
\*\*\*\*\*

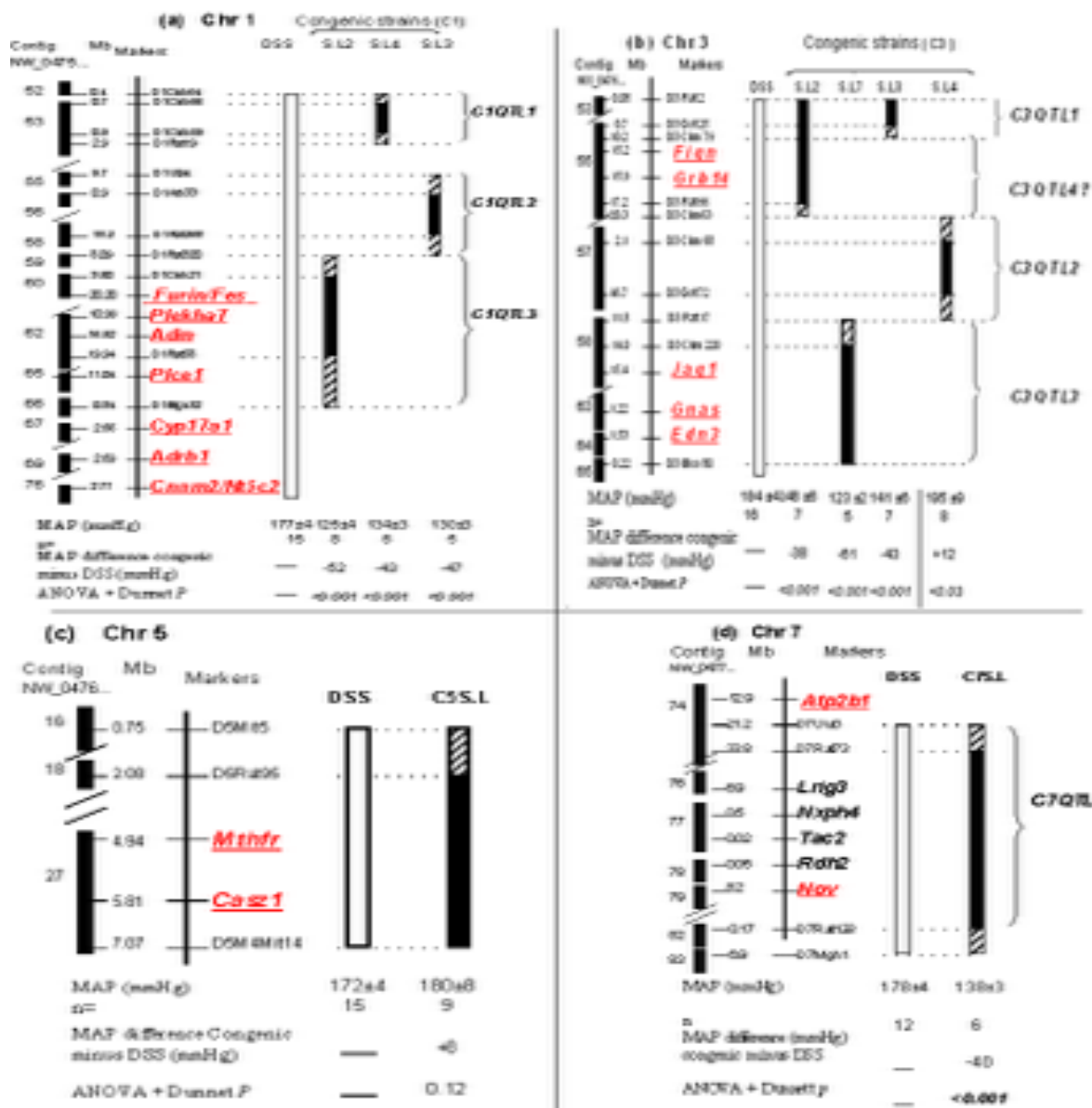
DSS GGAAGGTTTCAGgtgagtgga...atcttcccagGAGGAACCATGGGTGACTATGTCTTAAC 1260  
Lewis GGAAGGTTTCAGgtgagtgga...atcttcccagGAGGAACCATGGGTGACTATGTCTTAAC 1260  
\*\*\*\*\*

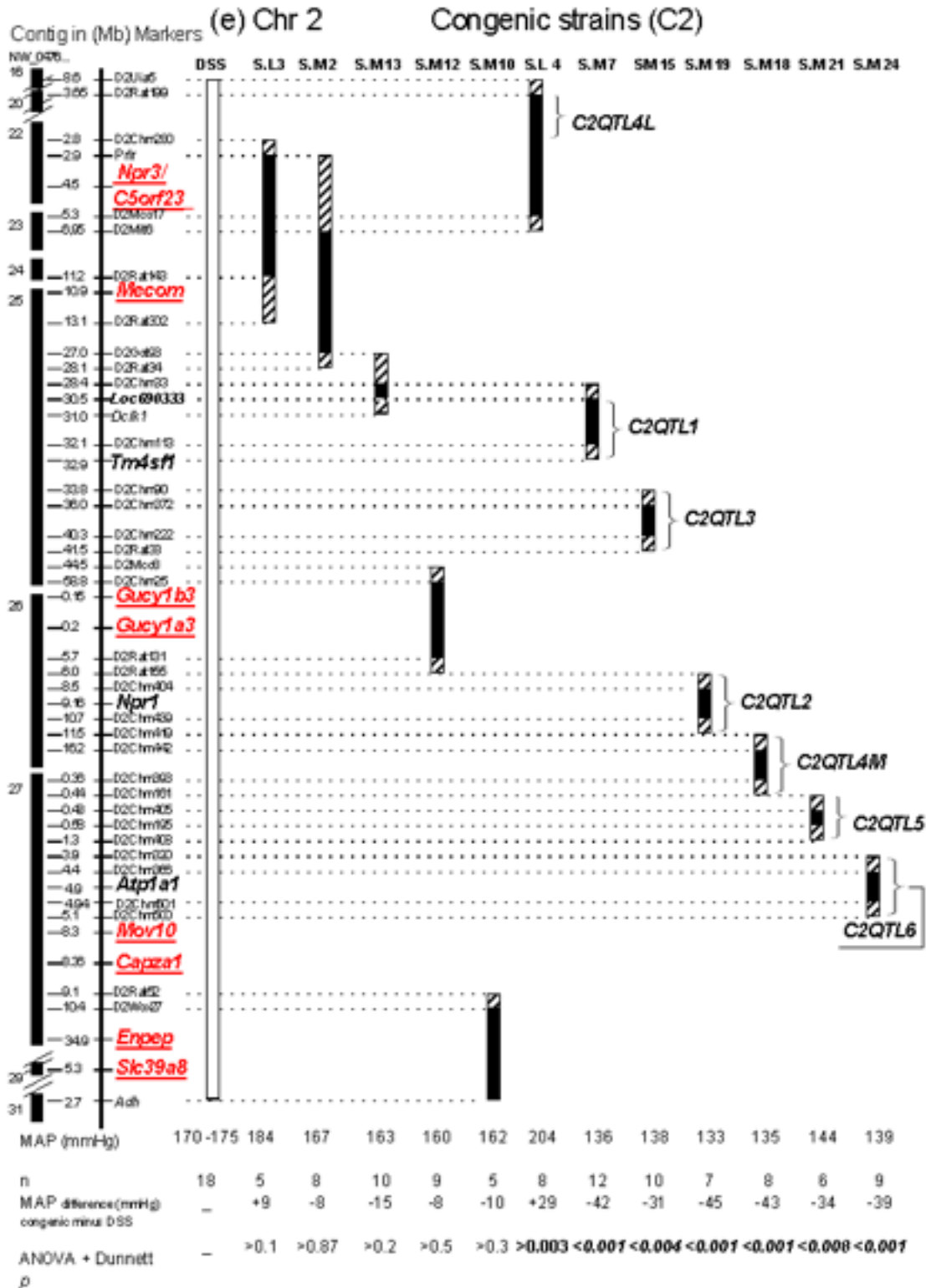
DSS AGAGTGTGAGTCACTGCAGCATGCAGAAGCACAGAAGAGAGAAGACTCAGCCAAAGACT 1320  
Lewis AGAGTGTGAGTCACTGCAGCATGCAGAAGCACAGAAGAGAGAAGACTCAGCCAAAGACT 1320  
\*\*\*\*\*

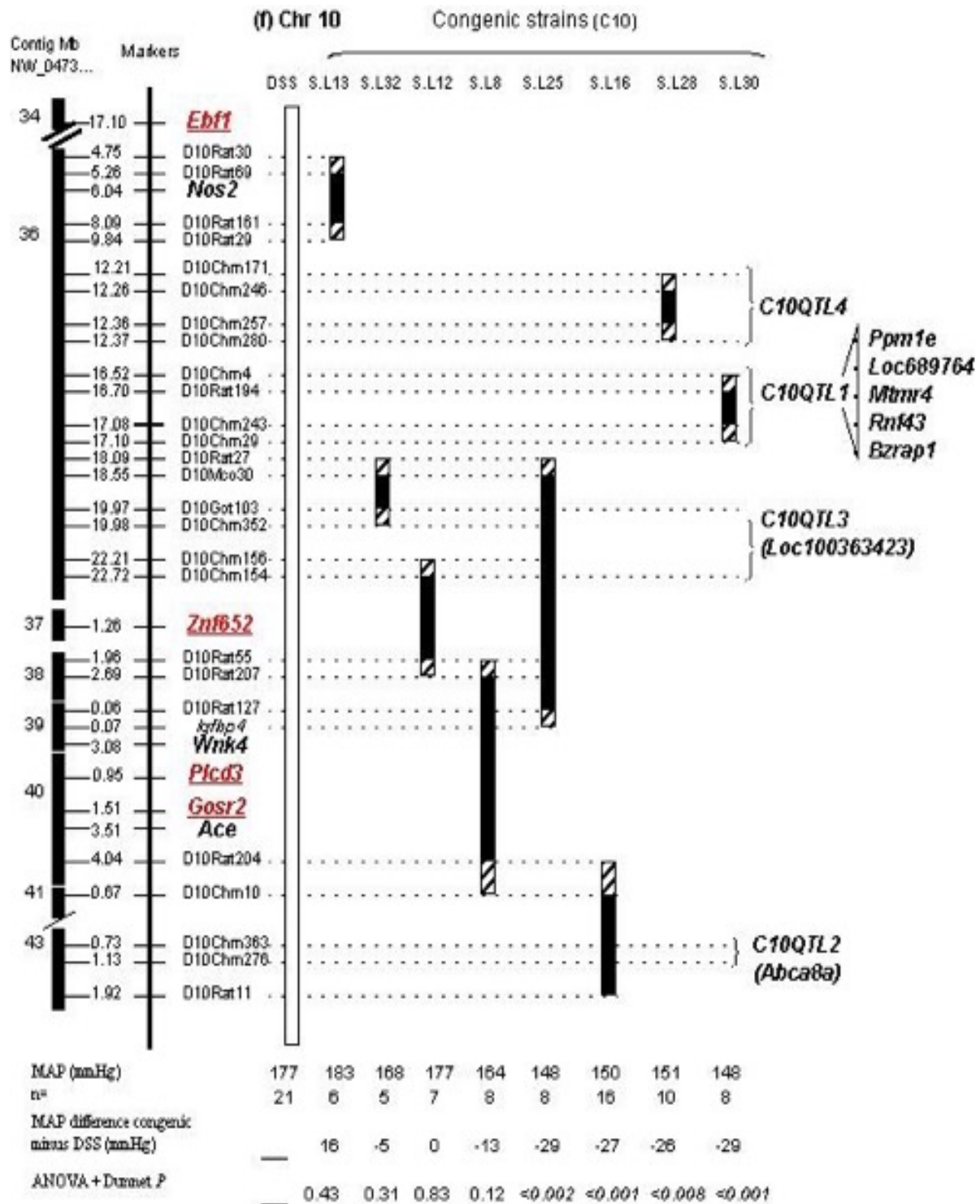
DSS	TGGAGGGGACACACTTGCTCCATTCTAGAACACAGCTGGACCTAACACACAGAAACTGCC	1380
Lewis	TGGAGGGGACACACTTGCTCCATTCTAGAACACAGCTGGACCTAACACACAGAAACTGCC *****	1380
DSS	TGAGGACTCTGCCCTTAGCTTTCCCTGTTTGCTTTCTTAAGGTGTTTTCTCCAGTTAAGT	1440
Lewis	TGAGGACTCTGCCCTTAGCTTTCCCTGTTTGCTTTCTTAAGGTGTTTTCTCCAGTTAAGT *****	1440
DSS	TCAGTTCCTGAATAATAGTGACTGCCCCAGCTGCAACCTCTCCCTTCAGAACCAGTCTCA	1500
Lewis	TCAGTTCCTGAATAATAGTGACTGCCCCAGCTGCAACCTCTCCCTTCAGAACCAGTCTCA *****	1500
DSS	TGATCTTTAAGCTGCTACTTGCAGGCATCCTTCGTTTCTGCATCCACCTAGACTTCGTA	1560
Lewis	TGATCTTTAAGCTGCTACTTGCAGGCATCCTTCGTTTCTGCATCCACCTAGACTTCGTA *****	1560
DSS	TGTCTACTTAAAAAGCCCCACTAAATTTGGGGACACATGATTCATTTCCACATCTGAAG	1620
Lewis	TGTCTACTTAAAAAGCCCCACTAAATTTGGGGACACATGATTCATTTCCACATCTGAAG *****	1620
DSS	AAGTTATGAACCTTCATCCTGGGATGCACACATCTTGTGCCAGAATTTTTCATACATAT	1680
Lewis	AAGTTATGAACCTTCATCCTGGGATGCACACATCTTGTGCCAGAATTTTTCATACATAT *****	1680
DSS	CCTAGGACCCATTCAATTGTCATTTGAGCCTCTCTATCTGTAGTGACTACTCTGACTTC	1740
Lewis	CCTAGGACCCATTCAATTGTCATTTGAGCCTCTCTATCTGTAGTGACTACTCTGACTTC *****	1740
	↓	
DSS	TCTGCCATTGGAGTGTTATGGCAATAAAGCTATGAACGTTacacactgtg	1790
Lewis	TCTGCCATTGGAGTGTTATGGCAATAAAGCTATGAACGTTacacactgtg *****	1790

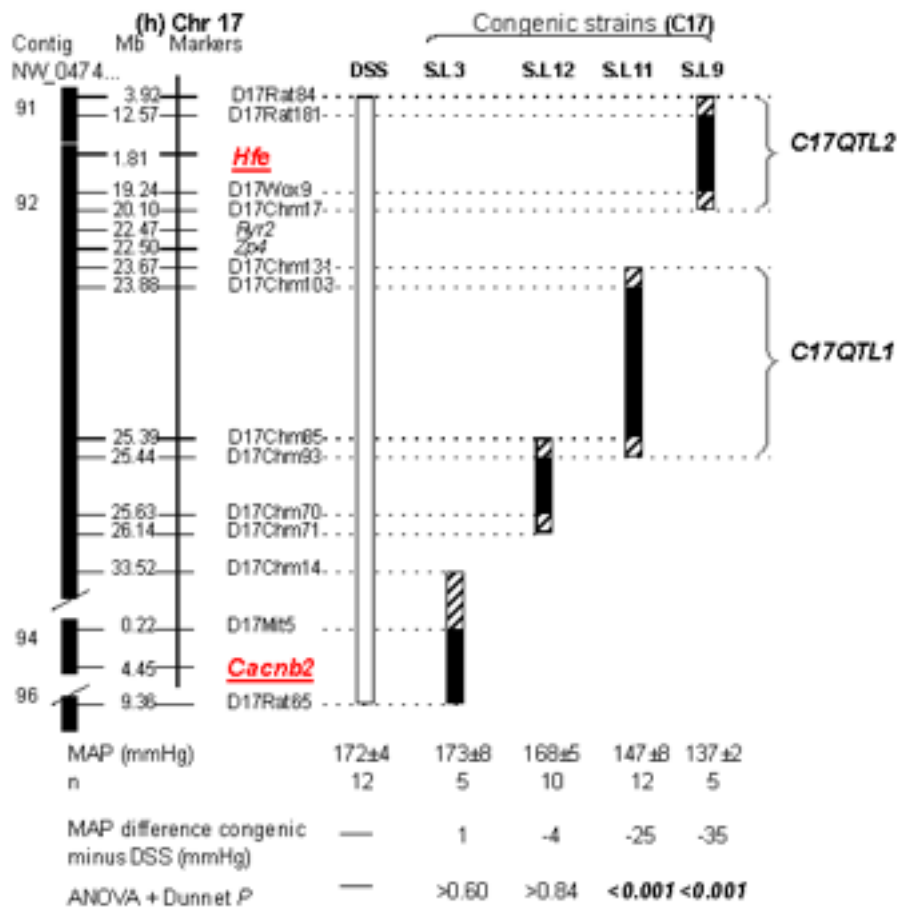
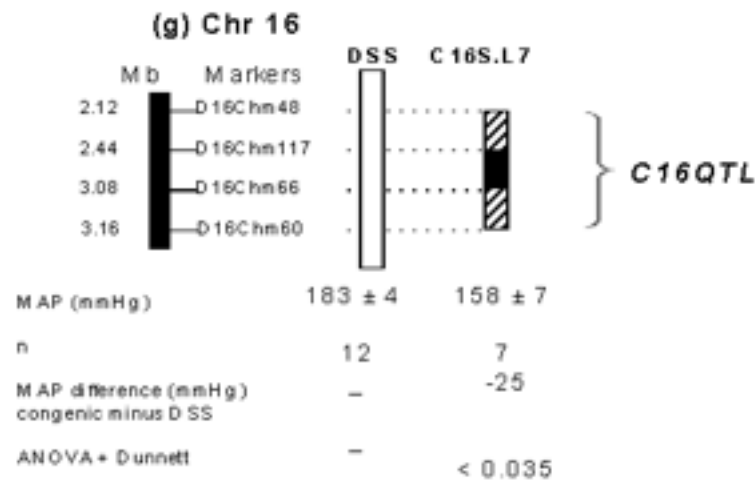
Legend to Supplemental data Table S-IIIc (IV-1): \* indicates nucleotide identity. gDNAs were first amplified by PCR and then sequenced. Nucleotides of the mRNA are in capital letters. The intro/exon junctions (10 pb for each side and separated by“...” for each exon) are given in minuscules. ↓ marks the last nucleotide of each exon. Initiation and stop codons are marked in blocks.

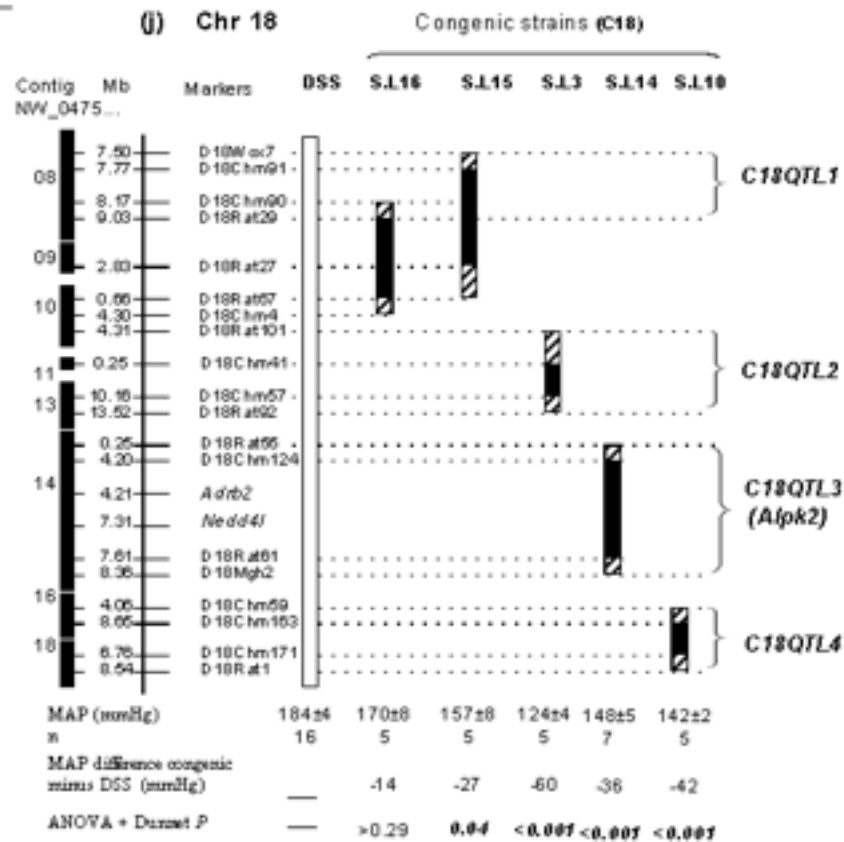
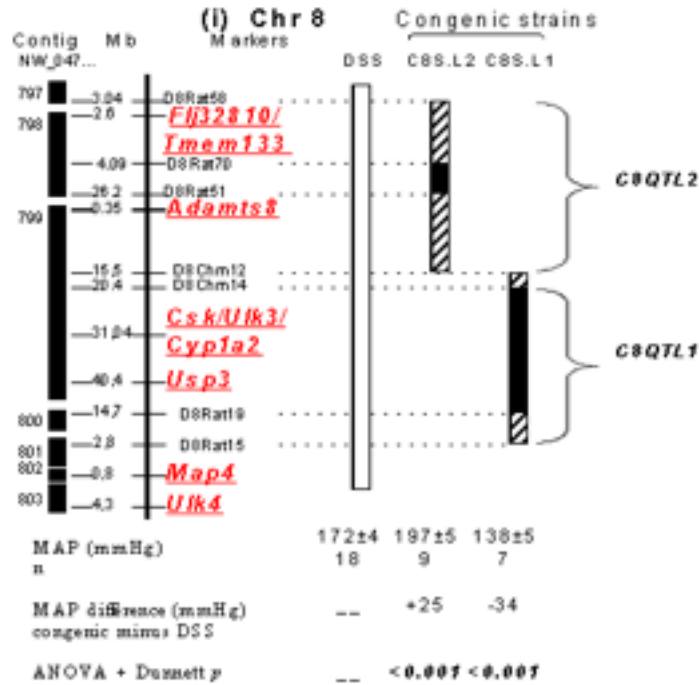
Supplemental data Figure S1 (IV-1): Definition of QTLs for blood pressure by congenic strains.











Legend to supplemental data Figure S1 (IV-1): A solid bar under congenic strains symbolizes the DSS fragment (a white bar) that has been replaced by that of Lewis (S.L) or MNS (S.M). Striped bars on ends of the solid bars denote the ambiguity of crossover breakpoints between markers. Mean arterial pressures (MAPs) for all the strains are averages for the duration of the measurement.  $\pm$  SEM of MAPs for the congenic strains on Chromosomes 2 and 10 ranges from 2 to 5 and there are not included in the figure for a lack of space. Systolic and diastolic arterial pressures are consistent with their MAPs of all the strains (data not shown). Genes **underlined** denote the positions for the rat homologues of human BP QTLs (12-14), and their full gene names are given in the legend for Supplemental Table S-II (IV-1). C3QTL4? is only implicated from a conserved homology between the rat and human QTLs. Rat genes of biological interest are named in the legend for Supplemental Tables S-I and S-II (IV-1) except for *Ace*, angiotensin I converting enzyme; *Adrb2*, adrenergic, beta-2-, receptor; surface; *Alpk2*, alpha-kinase 2; *Atp1a1*, ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide; *Nedd4l*, neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like; *Nos2*, inducible nitric oxide synthase2; *Nxph4*, neurexophilin 4; *Npr1*, natriuretic peptide receptor A/ guanylate cyclase A; *Rdh2*, retinol dehydrogenase 2; *Tac2*, tachykinin 2; *Wnk4*, WNK lysine deficient protein kinase 4. Newly-produced congenic strains are C1S.L2, C1S.L3, C1S.L4, C5S.L, C16S.L7, C17S.L9, C17S.L11, and C17S.L12. The rest of the congenic strains are as reported previously (1,2,4-8,10,15-17). DSS, Dahl salt-sensitive rat; MNS, Milan normotensive rat; n, number of animals used. Chr, chromosome.



## IV-1.10 Supplemental data references

1. Chauvet,C., Menard,A., Tremblay,J., Xiao,C., Shi,Y., L'heureux,N., Cardin,S., Tardif,J.C., Nattel,S., and Deng,A.Y. (2009) Cardiac pathways distinguish two epistatic modules enacting BP quantitative trait loci and candidate gene analysis. *Hypertens.Res.*, **32**, 631-637.
2. Dutil,J., Eliopoulos,V., Tremblay,J., Hamet,P., Charron,S., and Deng,A.Y. (2005) Multiple quantitative trait loci for blood pressure interacting epistatically and additively on dahl rat chromosome 2. *Hypertension*, **45**, 557-564.
3. Eliopoulos,V., Dutil,J., Deng,Y., Grondin,M., and Deng,A.Y. (2005) Severe hypertension caused by alleles from normotensive Lewis for a quantitative trait locus on chromosome 2. *Physiol Genomics*, **22**, 70-75.
4. Palijan,A., Dutil,J., and Deng,A.Y. (2003) Quantitative trait loci with opposing blood pressure effects demonstrating epistasis on Dahl rat chromosome 3. *Physiol. Genomics*, **15**, 1-8.
5. Duong,C., Charron,S., Xiao,C., Hamet,P., Menard,A., Roy,J., and Deng,A.Y. (2006) Distinct quantitative trait loci for kidney, cardiac, and aortic mass dissociated from and associated with blood pressure in Dahl congenic rats. *Mamm. Genome*, **17**, 1147-1161.
6. Crespo,K., Chauvet,C., Blain,M., Menard,A., Roy,J., and Deng,A.Y. (2011) Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes. *J.Hypertens.*, **29**, 460-465.
7. Ariyarajah,A., Palijan,A., Dutil,J., Prithviraj,K., Deng,Y., and Deng,A.Y. (2004) Dissecting quantitative trait loci into opposite blood pressure effects on Dahl rat chromosome 8 by congenic strains. *J.Hypertens*, **22**, 1495-1502.
8. Chauvet,C., Charron,S., Menard,A., Xiao,C., Roy,J., and Deng,A.Y. (2008) Submegabase resolution of epistatically interacting quantitative trait loci for blood pressure applicable for essential hypertension. *J. Hypertens*, **26**, 893-901.
9. Grondin,M., Eliopoulos,V., Lambert,R., Deng,Y., Ariyarajah,A., Moujahidine,M., Dutil,J., Charron,S., and Deng,A.Y. (2005) Complete and overlapping congenics proving

the existence of a quantitative trait locus for blood pressure on Dahl rat chromosome 17. *Physiol. Genomics*, **21**, 112-116.

10. Charron,S., Lambert,R., Eliopoulos,V., Duong,C., Menard,A., Roy,J., and Deng,A.Y. (2005) A loss of genome buffering capacity of Dahl salt-sensitive model to modulate blood pressure as a cause of hypertension. *Hum.Mol.Genet.*, **14**, 3877-3884.
11. Deng,A.Y. (2007) Genetics of polygenic hypertension from animal models to humans. *Curr. Hyp. Rev.*, **3**, 284-297.
12. The International Consortium for blood pressure (2011) Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*, **478**, 103-109.
13. Kato,N., Takeuchi,F., Tabara,Y., Kelly,T.N., Go,M.J., Sim,X., Tay,W.T., Chen,C.H., Zhang,Y., Yamamoto,K., et al. (2011) Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet*, **43**, 531-538.
14. Wain,L.V., Verwoert,G.C., O'Reilly,P.F., Shi,G., Johnson,T., Johnson,A.D., Bochud,M., Rice,K.M., Henneman,P., Smith,A.V., et al. (2011) Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure. *Nat Genet*, **43**, 1005-1011.
15. Palijan,A., Lambert,R., Dutil,J., Sivo,Z., and Deng,A.Y. (2003) Comprehensive congenic coverage revealing multiple blood pressure quantitative trait loci on Dahl rat chromosome 10. *Hypertension*, **42**, 515-522.
16. Chauvet,C., Crespo,K., Menard,A., Wu,Y., Xiao,C., Blain,M., Roy,J., and Deng,A.Y. (2011) alpha-Kinase 2 is a novel candidate gene for inherited hypertension in Dahl rats. *J.Hypertens.*, **29**, 1320-1326.
17. Chauvet,C., Menard,A., Xiao,C., Aguila,B., Blain,M., Roy,J., and Deng,A.Y. (2012) Novel genes as primary triggers for polygenic hypertension. *J.Hypertens*, **30**, 81-86.

## **IV-2. Retinoblastoma-associated protein 140 as a candidate for a novel etiological gene to hypertension**

**Kimberley Crespo<sup>1</sup>, Annie Ménard<sup>1</sup>, Alan Y. Deng<sup>1</sup>**

**Accepted by Clinical and Experimental Hypertension, Feb 09, 2016**

<sup>1</sup>Research Centre, CRCHUM (Centre hospitalier de l'Université de Montréal), Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Alan Y. Deng, Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Running head: Rap140 transcription factor in hypertension

Grant supports: Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to AYD and a doctoral fellowship to KC (Fond de recherche en sante du Quebec)

Conflict of interest: None

## IV-2.1 Contribution des co-auteurs

Cet article décrit l'identification d'un gène candidat pour un QTL situé sur le chromosome 16 du rat et son mécanisme probable sur la régulation de la PA via la régulation transcriptionnelle d'un gène dont le rôle sur la PA serait direct. Nous émettons ici pour la première fois l'implication probable de ces deux gènes dans l'homéostasie de la PA.

Annie Ménard a réalisé les souches congéniques et les qPCRs.

Ma contribution à cet article est d'environ 50%. Je me suis occupée du génotypage des souches congéniques C16S.L8 et C16S.L9 afin de délimiter la région d'intérêt. J'ai vérifié l'expression tissulaire des gènes d'intérêt. J'ai effectué le séquençage des régions codantes, 5'UTRs et 3'UTRs, ainsi que des jonctions intron-exon des gènes compris dans la région chromosomique abritant le C16QTL. J'ai identifié et confirmé à plusieurs reprises la mutation contenue dans le gène *Rap140/Fam208a*, candidat le plus probable pour soutenir le C16QTL.

Ma contribution en pourcentage aux différentes figures et tableaux de l'article est:

Tableau 1:	100%
Figure 1:	70%
Figure 2 (a,b,c):	100%
Figure 3:	50%
Supplément 3:	100%
Supplément 4:	100%
Supplément 5:	100%
Supplément 6:	100%
Supplément 7:	100%
Supplément 8:	100%

## IV-2.2 Abstract

Gene discovery in animal models may lead to the revelation of therapeutic targets for essential hypertension as well as mechanistic insights into blood pressure (BP) regulation. Our aim was to identify a disease-causing gene for a component of polygenic hypertension contrasting inbred hypertensive Dahl salt-sensitive (DSS) and normotensive Lewis rats. The chromosome segment harboring a quantitative trait locus (QTL), *C16QTL*, was first isolated from the rat genome via congenic strains. A gene responsible for *C16QTL* causing a BP difference between DSS and Lewis rats was then identified from molecular analyses combining our independently-conducted total genome and gene-specific sequencings. The *retinoblastoma-associated protein 140 (Rap140)/family with sequence similarity 208 member A (Fam208a)* is the only gene supported to be *C16QTL* among 3 genes in genome block 1 present in the *C16QTL*-residing interval. A mode of its actions could be to influence the expressions of genes that are downstream in a pathway potentially leading to BP regulation such as that encoding the solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y<sup>+</sup> system) member 12 (*Slc7a12*), which is specifically expressed in kidneys. Thus, *Rap140/Fam208a* probably encoding a transcription factor is the strongest candidate for a novel BP QTL that acts via a putative *Rap140/Fam208a-Slc7a12-BP* pathway. These data implicate a premier physiological role for *Rap140/Fam208* beyond development and a first biological function for the *Slc7a12* protein in any organism.

Key words: *Rap140*, *Fam208a*, genetics of hypertension, *Slc7a12*, renal mechanism

## IV-2.3 Introduction

Although its prevalence and elevated risks for cardiovascular and renal consequences are well recognized [1], essential hypertension is poorly understood as its etiology of pathogenesis eludes clarification [2,3]. Despite that nearly 30 genetic loci, known as quantitative trait loci (QTLs), have been detected that are associated with systolic and/or diastolic pressures [4,5], no genes with function-changing mutations have actually been identified that are responsible for a blood pressure (BP) QTL in humans [6]. Because of the conserved homology among mammalian species, causal genes discovered in rodent models of hypertension has the potential of providing mechanistic insights [7] into the human BP homeostasis, that may lead to hypertension when disturbed.

Localization of BP QTLs in rat models of essential hypertension has been largely accomplished to various chromosome segments [3]. The present challenge is to pinpoint them at the molecular level by position genetics and to elucidate their mechanisms regulating BP [7]. The first step in confronting this challenge is to identify a candidate gene for a BP QTL that may be causal to hypertension and are molecularly contrasting between the 2 comparing rat strains used in genetic studies [8].

Previously, we localized a BP QTL, *C16QTL*, to a segment of Chromosome (Chr) 16 in a congenic strain made from crossing hypertensive Dahl salt-sensitive (DSS) and normotensive Lewis rats [9]. *C16QTL* behaved as if it determined a ‘monogenic trait’ [10], suggesting that a gene may be responsible for it. Due to a large number of genes contained in the segment, the single gene among them was not identifiable.

The current investigation had 2 objectives. First, a fine congenic resolution (FCR) of *C16QTL* was to be conducted to an experimental limit, and second, a candidate gene for *C16QTL* was to be sorted out via molecular analyses. Among 3 possible genes narrowed by FCR and excluded from genome sequence identities, we have identified protein-altering genetic variants in the gene encoding retinoblastoma-associated protein 140 (*Rap140*)/family

with sequence similarity 208 member A (*Fam208a*) as the candidate for *C16QTL*, despite its embryonic lethality in homozygous mouse mutants [11].

## **IV-2.4 Methods**

### **IV-2.4.1 Animals**

Protocols for handling as well as maintaining animals were approved by our institutional animal committee (CIPA).

### **IV-2.4.2 Construction of congenic strains**

All congenic strains carry different Chr 16 segments of Lewis strain that are placed on the DSS background. The earlier congenic strain C16S.L5 [9] was the basis for deriving new congenic strains utilized in the current study. Briefly, C16S.L5 was bred to DSS to beget the F<sub>1</sub> generation. F<sub>1</sub>S were crossed to produce F<sub>2</sub> offspring among which crossovers were sought. After screening for more than 400 F<sub>2</sub>S, 5 crossovers were found. Four of them gave rise to informative congenic sub-strains (Figure 1 (IV-2)), which were designated: DSS.Lewis-(D16Chm36-D16Mit2)/Lt (abbreviated as C16S.L6), DSS.Lewis-(D16Rat112-D16Chm60)/Lt (C16S.L7), and DSS.Lewis-(D16Chm36-D16Chm60)/Lt (C16S.L8), and DSS.Lewis-(D16Chm48-D16Chm60)/Lt (C16S.L9).

### **IV-2.4.3 Experimental protocols and analyses**

Breeding procedure, dietary treatments, telemetry implantation, postoperative care and BP measurement durations were essentially the same as reported previously [9,12]. In brief, male rats were weaned at 21 days of age, kept on a low salt diet followed by a high salt diet starting from 35 days of age until the end of the experiment. Telemetry probes were implanted at 56 days of age (namely 3 weeks from the time of the high salt diet). BP of DSS was pooled from 3 different measurements since they were not different. In the BP presentation (Fig. 1 (IV-2)), averaged readings for the duration of measurement were given for each strain.

Since systolic and diastolic pressures were consistent (data not shown) with mean arterial pressures (MAP) of all the strains, only their MAPs are provided for simplicity.

Repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, which corrects for multiple comparisons and unequal sample sizes, was used to compare a parameter in MAP between 2 groups as reported previously [9,12]. During the BP comparison, ANOVA was first applied to assess the intergroup differences. If it was significant, the Dunnett's test ensued to identify which group was different from DSS, and the level of significance. The power and sample size calculations in the analysis are as given previously [12].

#### **IV-2.4.4 Independent total genome sequencing of DSS and Lewis rats**

Supplement S1 (IV-2) outlines the methods, procedure, interpretation, sequence calling and data mining along with relative references that we have performed. As shown in results, our genome database has revealed relevant protein-altering mutations that the public rat genome database (RGD) did not, and thus are uniquely useful for mutation screening in identifying a candidate for the QTL in question.

Our genome sequences of DSS and Lewis became our database (Supplement 2 (IV-2)) for identifying single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes in the *CI6QTL*-containing interval (Fig. 1 (IV-2)). Bioinformatics software NextiaGen© developed by Max Chauvet was used to position variants resulting from the SNP analysis within the genomic sequence of each gene.

#### **IV-2.4.5 Mutation screenings**

First, all missense and intron-exon junction mutations were initially detected from our database of total genome sequencing of DSS and Lewis rats, and are homozygous for the Lewis alleles, (i.e. LL) in the congenic strain that defines *CI6QTL*. Subsequently, the chromosome segment carrying the mutation was individually PCR-amplified and validated by Sanger sequencing. Thus, we have independently verified all mutations listed in Table I (IV-2).



Second, to eliminate false negatives in total genome sequencings, we have amplified by PCR and sequenced every exon and intron-exon junctions in all 7 genes present in the *C16QTL*-residing segment.

Third, copy number variations (CNVs) were detected as genome deletions and duplications from our database (Supplement S2 (IV-2)) and those of RGD [13].

Finally, the protein-coding genes contained in the *C16QTL*-residing interval were assessed for expression by reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR) in a panel of cDNAs extracted from various organs of DSS and/or Lewis rats.

#### **IV-2.4.6 Quantitative real time polymerase chain reactions (qPCR):**

Expressions of genes were assessed by a standard procedure as reported previously [14].

## **IV-2.5 Results**

### **IV-2.5.1 *C16QTL* placement**

The smallest segment that defined the interval lodging *C16QTL* emanated from congenic strain C16S.L9 (Fig. 1 (IV-2)), which alone displayed a magnitude of BP effect accounting for about 28% of the averaged MAP difference (88 mmHg) between DSS (183 mmHg) and Lewis (95 mmHg). *C16QTL* acts autonomously of other QTLs in the DSS genome and is independently confirmed 4 times by 4 congenic strains, i.e. C16S.L6, C16S.L7, C16S.L8 and C16S.L9 (Fig. 1 (IV-2)).

### **IV-2.5.2 Molecular analyses identified *retinoblastoma-associated protein 140 (Rap140)/ family with sequence similarity 208 member A (Fam208a)* as the sole candidate gene for *C16QTL***

Except for the pseudogenes, all the expressed genes present in the *C16QTL*-containing interval in the C16S.L9 congenic strain have been sequenced in 2 ways (see the following

section). Among them, only *Rap140/ Fam208a* is supported as the candidate gene for *C16QTL*, because it harbors non-conserved mutations (Table I and Supplement S3 (IV-2)).

**Table I (IV-2). Mutation screening of genes in the *C16QTL*-containing interval**

Genome block	Gene	Codons				In/Ex junctions	
		Size of codons (bp)	# of exon	Mutation detected Lew/ DSS	Change in amino acid (AA) Lew/DSS	Mutation detected in In/Ex junction	Alter-Splicing
1	<i>Asb14</i>	1785	9	No		No	
1	<i>Appl1</i>	4444	22	No		No	
1	<i>Hesx1</i>	558	4	No		No	
1	<i>IL17rd</i>	2223	13	No		No	
2	<i>Arhgef3</i>	1575	10	A 1362 C	No	No	
				T 1428 G	No	No	
						E3 (+17)	No
						E4 (-20)	No
2	<b><i>Fam208a/ Rap140</i></b>	4696	22	<b>ΔGGC73</b>	<b>ΔG26/G26</b>	No	
				A1161C	No	No	
				A2493G	No	No	
						E2 (-49)	No
						E2 (+22)	No
						E3 (-47)	No
						E4 (-14)	No
		E5 (+25)	No				
		E13 (-14)	No				
2	<i>Ccdc66</i>	2840	18	A1059G	No	No	
						E11 (+30)	No

Footnote to Table I (IV-2): Gene locations on Chromosome 16 are indicated on the map in Fig. 1. The position of a mutation enumerates from the ATG start codon of that gene. The amino acid position begins from the first methionine. *Arhgef3*, *Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3*; *Appl1*, adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1; *Asb14*, *ankyrin repeat and SOCS box-containing 14*; *Ccdc66*, *coiled-coil domain containing 66*; *Hesx1*, *HESX homeobox 1*[15], *IL17rd*, *interleukin 17 receptor*; *Rap140*, *retinoblastoma-associated protein 140/ family with sequence similarity 208 member A (Fam208a)*. *LOC102548056* and *LOC102548123* are designated as non coding RNAs that are located in either the 5'untranslated or 3'untranslated regions in the known genes around them and are not included in the table. There are no SNPs in them. In: intron, Ex: exon, (+) and (-): nucleotide after and before a given exon respectively. No Copy Number Variation (CNV) had been found for those genes from total genome sequencing of DSS and Lewis rats based on our current work and those of others [13]. Genome blocks 1 and 2 are explained in the results. All the nucleotide variations were confirmed by separate sequencings of PCR-amplified genome fragments.

First, *Rap140/Fam208a* bears a deletion of 3 base pairs (bp) from #73-75 that removes a single amino acid of Glycine from the coding region of Lewis rats (Fig. a and b (IV-2)). The rest of the *Rap140/ Fam208a* coding region is identical between DSS and Lewis (Supplement S3 (IV-2)). The recently published RGD [13] did not reveal the 3-bp deletion from comparing our independently-generated genome sequences of DSS and Lewis. Since this 3-bp deletion in Lewis has been confirmed both in our sequencing and as a size polymorphism (Fig. 2b (IV-2)), the *Rap140/Fam208a* protein of Lewis rats is truly 1 amino acid shorter than its DSS counterpart and the information of RGD [13] was false-negative.

In contrast, all the remaining 6 genes in the *CI6QTL*-lodging interval (Fig. 1 (IV-2)) carry the identical coding region in *Asb14*, *Appl1*, *Hesx1* and *Ill17rd*, and same amino acids in *Arhgef3*, and *Ccdc66* (Supplements S4 and S5 (IV-2)) between DSS and Lewis. These data were derived from 2 categories of sequencing by us, i.e. from our total genome databases comparing DSS with Lewis, and from sequencing individual exon fragments amplified by PCR that covered the complete coding region of a gene in question. The latter method confirmed the former and no additional mutations were detected from the latter method. Thus, our 2 sequencing approaches produced consistent and mutually-validating data and no false negatives of coding variations were found from our total genome sequencing of the 7 genes.

Second, nucleotide differences at intron-exon junctions in all 3 genes, i.e. *Arhgef3*, *Rap140/ Fam208a* and *Ccdc66* (Table I (IV-2)), were first obtained from our genome database and then confirmed by sequencing PCR-amplified genome products. No alternative splicing (Table I (IV-2)) was found. There were no copy number variations (from our sequencing data and the RGD [13]) in any of the 7 genes. Thus, it appears that the single Glycine deletion in the *Rap140/Fam208a* coding domain is necessary and sufficient to support the candidacy of *Rap140/ Fam208a* as *CI6QTL*.

Third, the 7 genes existing in the *CI6QTL*-residing interval can be divided into 2 genome blocks, i.e. block 1 consisting of 4 genes (*Asb14*, *Appl1*, *Hesx1* and *Ill17rd*) and block 2 consisting of 3 genes *Arhgef3*, *Rap140/ Fam208a* and *Ccdc66*. Based on genome sequences

from the RGD [13] and our database, block 1 is practically identical, whereas block 2 is divergent between DSS and Lewis in C16S.L9 (Table I (IV-2)). Among the 3 genes in block 2, only *Rap140/ Fam208a* bears protein-changing mutations and thus is supported as the candidate for *C16QTL*.

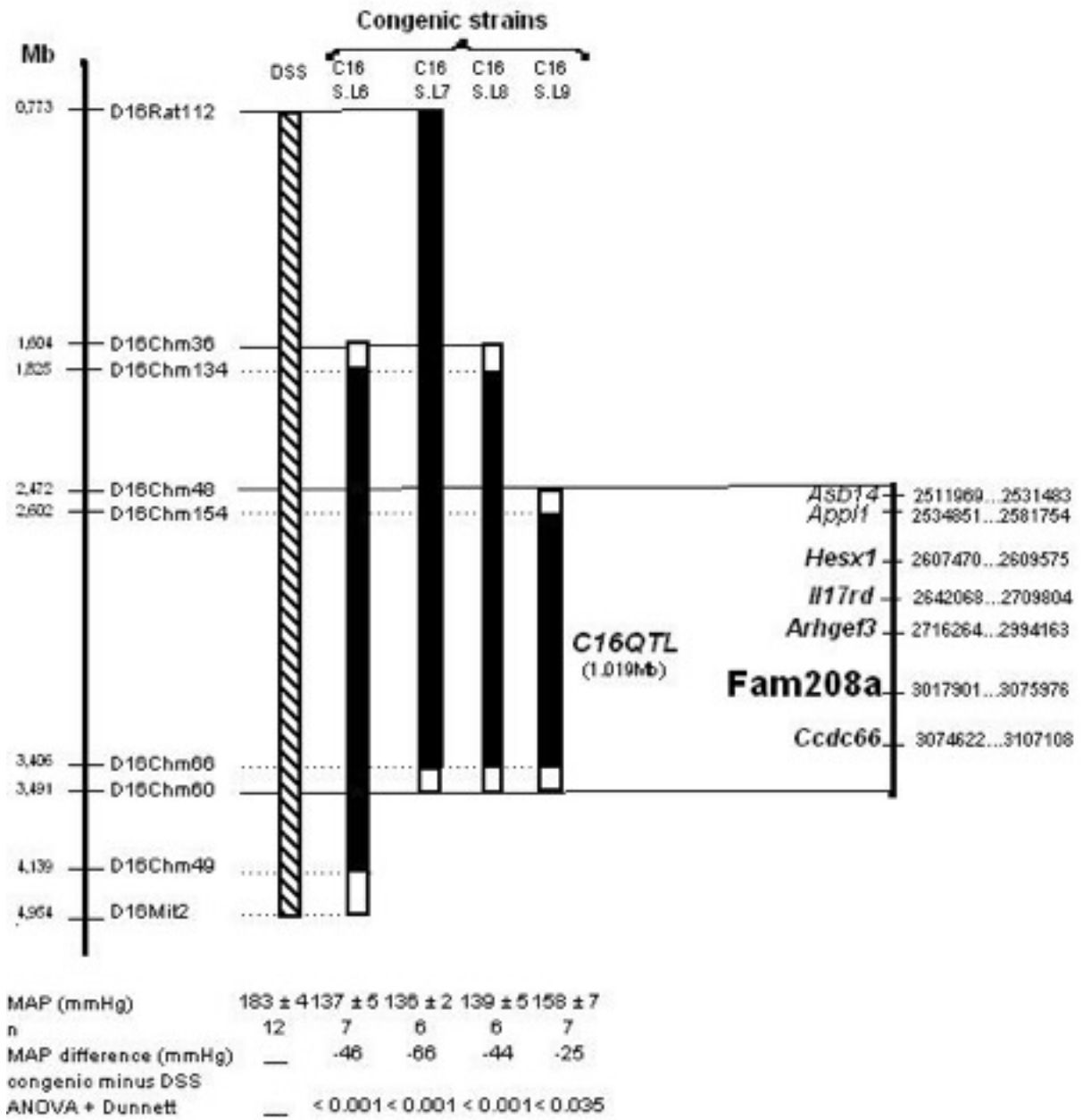
In block 1, *Hesx1* is a developmentally-expressed gene restricted to embryos [15]. The segment carrying *Asb14*, *Appl1*, *Hesx1* and *IL17rd* is highly conserved between DSS and Lewis. Not only there are no single nucleotide variations in their coding domains and intron-exon junctions (Table I (IV-2)), but also in their 5'UTRs and 3'UTRs and their introns (Supplement S6 (IV-2)). Beyond the fact that very few single nucleotide polymorphisms (SNPs) appeared in non-coding regions from total genome sequencings, a C-T SNP in 5'UTR of *Asb14* (the first in Supplement S6 (IV-2)) was commonly detected in the RGD [13] as well as ours, but upon re-sequencing of a PCR-amplified segment containing it, the SNP does not exist. So far, not even 1 single SNP in a non-coding region of these 4 genes is confirmed to occur (Supplement S6 (IV-2)) and consequently, those detected from total genome sequencing are false positives. Several more examples of false positives came from microsatellite polymorphisms (Supplement S6 (IV-2)). A total of 66 microsatellites present in block 1 are identical between DSS and Lewis (data not shown). Thus, the 4 genes located in block 1 can be downgraded as probable candidate genes for *C16QTL* for a lack of genome differences between DSS and Lewis.

Fourth, since a MAP difference of 19 mmHg appeared between C16S.L8 and C16S.L9 (Fig.1 (IV-2)), the region non-overlapping between the 2 congenic strains might contain another additive QTL. However, all the genes present in the segment from *Zmiz1* to *Dnah12* did not contain any genomic variations in the coding regions and intron-exon junctions comparing DSS with Lewis rats, except for *Zmiz1* which contains 2 silent coding mutations that are far from splice sites (data not shown). Once again, our sequencings combined total genomes of DSS and Lewis and gene-specific genome fragments. Moreover, no copy number variations were detected for these genes from our total genome sequencing (data not shown) and from the RGD [13]. Thus, there is no supportive evidence for protein-altering variations

and intron-exon junction mutations in the genes present between *Zmiz1* and *Dnah12*. The BP difference between C16S.L8 and C16S.L9 congenic strains mostly likely reflects their phenotypic variations, rather than due to the existence of an additional QTL residing in the *Zmiz1* to *Dnah12* interval.

Finally, the single QTL, *C16QTL*, exists and *Rap140/Fam208a* is strongly supported to be it. The ubiquitous pattern of gene expressions across organs shown by the sensitive method of RT-PCR (Fig. 2c (IV-2)) indicates that *Rap140/Fam208a* is a functional gene and is consistent with the work of other investigators [11]. The pattern of 3-bp deletion as a length polymorphism among rat strains is shown in Supplement S7 (IV-2) and does not reflect BP phenotypes of the various strains, because different normotensive, and by inference, hypertensive strains have diverse genetic determinants on BP [14].

## Chromosome 16 Map

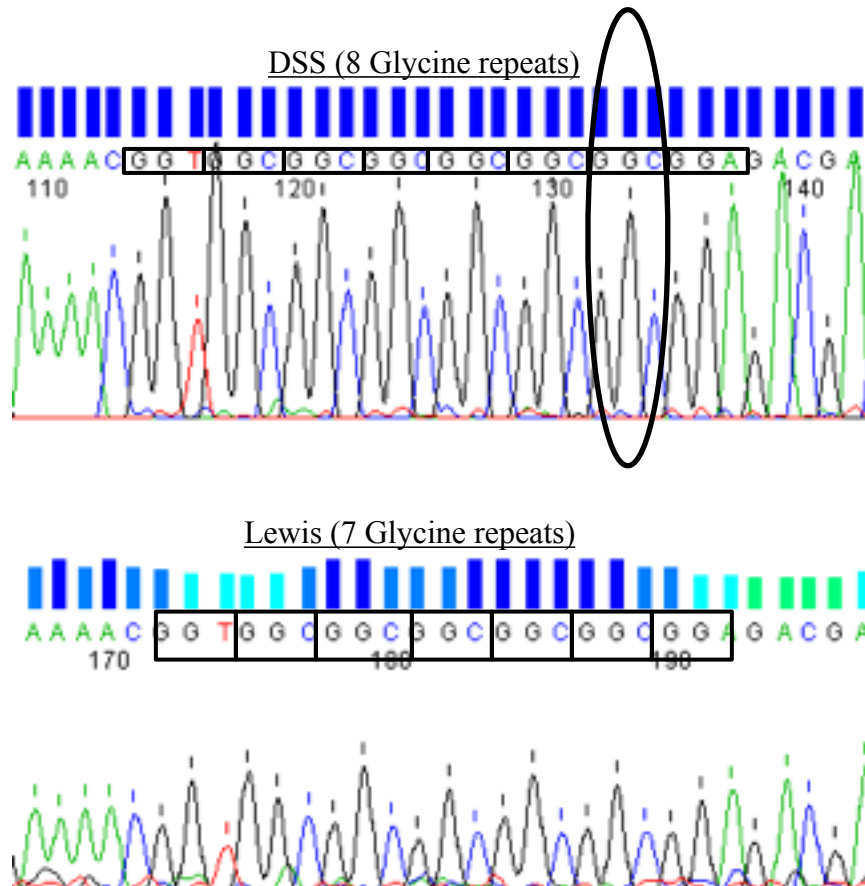


**Figure 1 (IV-2). Fine congenic resolution of *C16QTL*.**

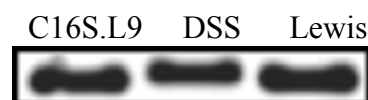
Footnote to figure 1 (IV-2): Marker positions in megabases (Mb) are taken from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Solid bars under congenic strains symbolize the Dahl salt-sensitive (DSS) chromosome fragments that have been replaced by those of Lewis. Open bars on ends of solid bars indicate ambiguities of crossover breakpoints between markers. The full gene nomenclature corresponding to their abbreviations is given in the Table IV-1 legend. Mean arterial pressures (MAPs) for DSS and congenic strains are averaged for the period of measurement and are given at the bottom of the map to facilitate strain comparisons. Significant *p* values are indicated.  $\pm$  indicates SEM. C16S.L6, C16S.L7, C16S.L8 and C16S.L9 have been newly generated from this study. Their full names are listed in the method section.



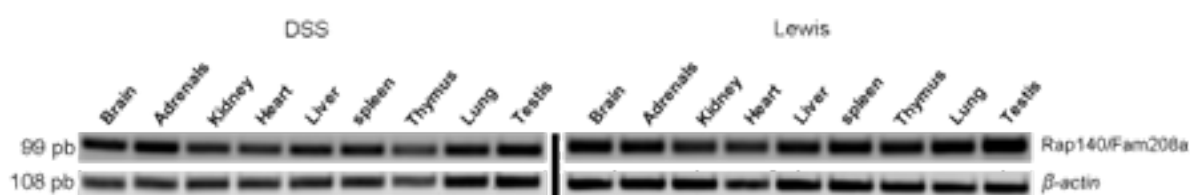
a) The chromatograms of the *Rap140/Fam208a* domain containing Glycine repeats in Dahl-Salt-Sensitive (DSS) and Lewis rats.



b) A length polymorphism spanning the Glycine repeats. Primers used for PCR on genomic DNAs to detect the deletion are forward 5'ATGGCGACTGCTGCGGAGACG 3'and reverse 5' GCTCCGCGGTGGAGAAGACGC 3'.



c) Organ expressions of *Rap140/Fam208a* assayed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Numbers to the left indicate the size of the fragment in base pairs. Primers are forward 5'TGGCCTACAGAGCCTATGAG 3' and reverse 5'ACA AACTGCATATGGACAAAC 3' for *Rap140/Fam208a* ; and 5'ACTGCCGCATCCTCTTCCTC 3'and reverse 5' CCGCTCGTTGCCAATAGTGA 3' for  $\beta$ -actin.



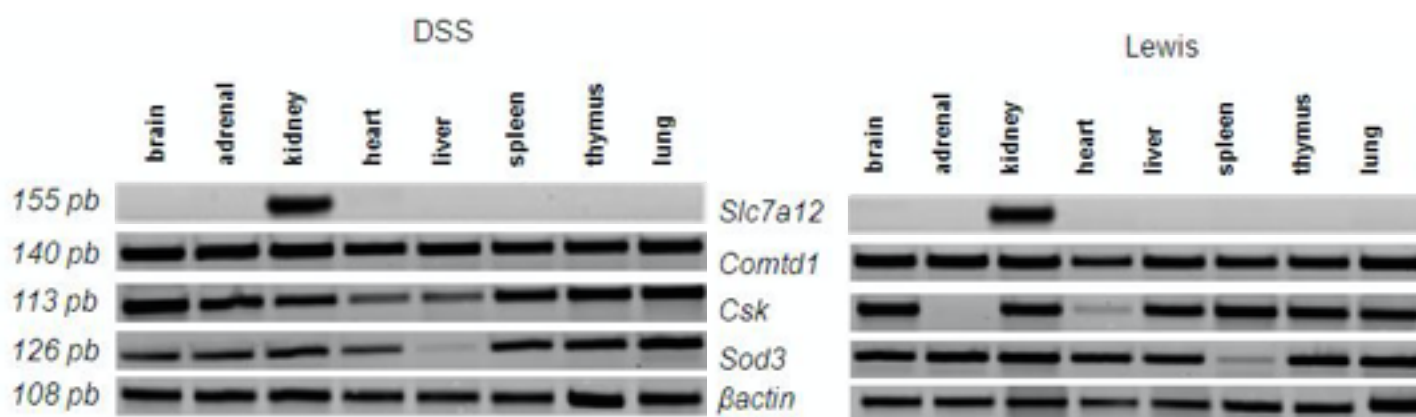
**Figure 2 (IV-2). Detection of 3 bases deletions in *Rap140/Fam208a*.**

#### **IV-2.5.3 *Rap140 /Fam208a* may regulate expressions of genes downstream in a pathway.**

It is known that a single Glycine repeat variation in the androgen receptor affects the level of its protein product without altering the protein function itself [16]. Since the *Rap140 /Fam208a* protein is suspected as a transcription factor interacting with E2F [17], it appeared reasonable to hypothesize that the single Glycine repeat variation in it might cause a change in the quantity of the *Rap140/Fam208a* protein. As a transcription factor, more or less of it could up or down regulate expressions of other genes, some of which might be eventually involved in the BP maintenance.

As a first proof of principle in testing this hypothesis, we chose kidneys as the primary organ for expression studies because they play a prominent role in the long-term BP homeostasis [18], not skins and testes where *Rap140/Fam208a* was abundant [11]. We first

selected a number of genes differentially expressed in the kidneys comparing DSS and Lewis rats as culled from a preliminary gene profiling result (data not shown). Most of these genes are implicated in BP regulation [19-22], they are all located outside the *C16QTL*-residing interval, and their expression patterns across organs are presented in Fig. 3 (IV-2).



**Figure 3 (IV-2). Organ expression pattern of genes assayed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).**

Footnote to figure 3 (IV-2): The organs are from Dahl salt-sensitive (DSS) on the left panel and Lewis rats on the right. Numbers to the left indicate the size of the fragment in base pairs. Primers for RT-PCR for each gene and gene names are given in Table II (IV-2). Primers for  $\beta$ -actin are the same as provide in the Fig. 2 (IV-2) legend. Two primers for all the genes are located in 2 different exons to avoid amplifying genomic DNAs contaminated in RNA preparations, since no products were seen when genomic DNAs were amplified (data not shown). Results shown are from 1 rat of each strain and they have been replicated with multiple rats of the same strain (data not shown). All rats were males, 11 weeks of age and fed a high salt diet for 6 weeks starting from 5 weeks of age.

We reasoned that any of these genes, if regulated by Rap140/Fam208a, could be differentially expressed in the kidneys of DSS and C16S.L9 (Fig. 1 (IV-2)). Because the genome outside the *C16QTL*-containing region is the same in C16S.L9 as in DSS, differential expressions of any gene not included in C16S.L9 have to be elicited by one of the genes lodging in it. Since the 3-bp deletion in *Rap140 /Fam208a* is a prominent genetic difference between DSS and C16S.L9, Rap140/Fam208a, a transcription factor, may act as a primary trigger for differential expressions of genes elsewhere in the genome. Neither *Arhgef3* nor *Ccdc66* in the same genome block 1 as Rap140/Fam208a is known as a transcription factor.

Indeed, among those evaluated by qPCR, the gene encoding the solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter,  $y^+$  system), member 12 (*Slc7a12*) on rat Chr 2 is differentially expressed ( $p < 0.05$ , Table II (IV-2)). Its expression was nearly 5 times less in the C16S.L9 kidneys than that of DSS. In contrast, the other genes tested are not differentially expressed. Thus, a modulation of transporter gene expressions by RAP140/Fam208a appears and is probably target-specific. No evidence of differential expressions in renal gene profiling (data not shown) was found for any of other genes well-known to be involved in BP regulations such as those for the renin-angiotensin-aldosterone system, nitric oxide system, endothelin system.

**Table II (IV-2). Evaluation of gene expressions triggered by *Rap140/Fam208a* via quantitative reverse transcriptase polymerase chain reactions (qPCR) on kidney cDNAs**

Genes	Chr	Mean R C16S.L9/ DSS	Ratio of mean R <sup>C16S.L9</sup> / mean R <sup>DSS</sup>	<i>p</i>	Primers
<i>Slc7a12</i>	2	6.49 x 10 <sup>-1</sup> ± 6.83 x 10 <sup>-1</sup> / 32.3 x 10 <sup>-1</sup> ± 5.47 x 10 <sup>-1</sup>	0.201	0.05	Fwd: 5'- cctcatcgatcatagcaggaga-3 Rev: 5'cagaatctgaagagatgattcc-3
<i>Comtd1</i>	15	1.05 x 10 <sup>0</sup> ± 1.7 x 10 <sup>-1</sup> / 1.76 x 10 <sup>0</sup> ± 1.34 x 10 <sup>0</sup>	0.597	0.53	Fwd: 5'- gctctggatctgggtactttca-3 Rev: 5'- acttctgcctgctccacag-3
<i>Csk</i>	8	3.82x10 <sup>-2</sup> ± 2.44x10 <sup>-2</sup> / 4.46x10 <sup>-2</sup> ± 1.26x10 <sup>-2</sup>	0.856	0.77	Fwd: 5'- atgcagctgggtggagcacta-3 Rev: 5'- ccactgcggtagaattcatct-3
<i>Sod3</i>	14	1.32 x 10 <sup>-1</sup> ± 4.55 x 10 <sup>-2</sup> / 2.39 x 10 <sup>1</sup> ± 1.42 x 10 <sup>-1</sup>	0.552	0.42	Fwd: 5'- gacctggagatctggatgga-3 Rev: 5'- ggaccaagcctgtgatctgt-3

Footnote to Table II (IV-2): Chr, Chromosome location; R represents the ratio of the expression of the gene target relative to that of the *Gapdh* reference. R is the average value of triplicates from 1 rat. Mean R is the average value of R from 3 rats of the same strain. DSS, Dahl salt-sensitive rats. C16S.L9 is the congenic strain defined in Fig. IV-1. ± refers to SEM. *P*, *t*-test. Fwd and Rev refer to the forward and reverse PCR primers for each gene, which are located in 2 separate exons and were designed to span at least 1 intron to eliminate the amplification of genomic DNAs contaminated in RNA preparations. The RNA samples were also treated with DNase before qPCRs. *catechol-O-methyltransferase domain containing 1 (Comtd1)*; *c-src tyrosine kinase (CSK)*; *solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 12 (Slc7a12)*; *superoxide dismutase 3, extracellular (Sod3)*.

The kidneys of the 2 comparing strains were from male rats of 11 weeks of age fed on a 2% NaCl diet starting from 5 weeks of age.

We next addressed the issue of whether or not the differential *Slc7a12* expression being due to the varying expression of any of the 3 genes, *Arhgef3*, *Rap140/Fam208a* and *Ccdc66*, since they all show nucleotide variations within putative promoter regions (Supplement S8 (IV-2)). qPCR showed that their levels of renal expressions were comparable in C16S.L9 and DSS (Supplement S9 (IV-2)). Therefore, the genetic difference of the 3-bases deletion in *Rap140/Fam208a*, not in its expression nor expressions of other genes in genome block 1 in the *C16QTL*-residing interval, seems necessary and adequate to account for the differential expressions of *Slc7a12*.

## IV-2.6 Discussion

Major revelations from the current work are (a) *C16QTL* is restricted to a chromosome segment about 1 megabases (Mb) that bears 7 possible genes divisible into 2 genome blocks. Block 1 contains 4 genes that are synonymous in DSS and Lewis rats, whereas block 2 contains 3 genes that are divergent between DSS and Lewis strains. (b) The *Rap140/Fam208a* gene in block 2 emerged to be the sole candidate gene for *C16QTL* with protein-changing mutations. Thus, *C16QTL* seems represented by a new gene previously not known for BP modulation. (c) A novel pathway mediated by *Rap140/Fam208a* is implicated that may modulate a renal-specific expression of *Slc7a12* potentially relevant for BP.

#### **IV-2.6.1 Fine congenic resolution of *C16QTL***

The use of congenic strains is powerful in physically and not statistically delimiting the fragment lodging *C16QTL* predicated on a cause-effect relationship between a chromosome segment and its phenotypic influence. The congenic approach broadly follows a ‘knock- in’ strategy where a segment (e.g. of 1 Mb in C16S.L9) of the hypertensive DSS has been replaced by that of the normotensive Lewis rat, while maintaining the remaining genome as that of DSS. Consequently, BP has been altered due to the replaced segment (Fig. 1 (IV-2)). Of the 3 polymorphic genes, *Rap140/Fam208a* is the only gene that is different between C16S.L9 and DSS parental strains in harboring protein-altering mutations, yet, this difference seems adequate to change blood pressure. In so doing, the primary causal gene such as *Rap140/Fam208a* to hypertension has been provisionally identified and separated from secondary genes such as *Slc7a12* in response to it, since *Slc7a12* on Chr 2 is identical between C16S.L9 and DSS.

#### **IV-2.6.2 *Rap140/Fam208a* is the only gene supported as *C16QTL***

Our genetic analysis identified *Rap140/Fam208a* to be a credible gene responsible for *C16QTL*. No other genes in the *C16QTL*-containing interval can be bolstered as *C16QTL*, since they are either the same between DSS and Lewis rats, or contain silent mutations (see caveats in discussion).

The function of the RAP140/Fam208a protein is little understood. Homozygous *Rap140/Fam208a* mice with a missense or a splice donor site mutation die before gastrulation [11] indicating that it is required for development. The Rap140/Fam208a protein was detectable by antibodies in the skin and testes extracts, but not in other organs such as kidneys, and it is believed to be a nucleoprotein in testes [11]. In that work, RT-PCR was done as we have shown (Fig. 3 (IV-2)), which is more sensitive than western blotting. Thus, the degree of the gene expression in other organs such as kidneys may be too low to be detected at the protein level.

Rap140/Fam208a [23] belongs to a large class of proteins associated with the retinoblastoma (RB) tumor suppressor [24]. Its cellular function is believed to mimic that of a transcription factor similarly to E2F [17]. E2F constitutes a diverse array of factors that can be transcription activators or suppressors depending on their target genes [25]. Similar to the *RB* gene that is ubiquitously expressed but prominently causes retinoblastoma [24], *Rap140/Fam208a* is omnipresent (Fig. 2 (IV-2)), yet may cause hypertension when mutated as our current data suggest.

How RAP140/Fam208a modulates expressions of genes down stream has been poorly defined, and so far, received little attention. From our current work, it seems to preferentially regulate expressions of a renal transporter gene *Slc7a12*.

A Glycine repeat variant in androgen receptor was associated with human baldness in one population [26], but not in another [27]. Regardless of its role in a human disorder, based on a Glycine variation-function paradigm in the androgen receptor gene [16], the length of Glycine repeats is in inverse correlation with the quantity of protein product, namely, the shorter the repeat, more protein is produced. Glycine repeats are to form a hairpin structure in the gene transcript that can interfere with the translation efficiency into the protein product. The longer the repeats, the stronger the hairpin formation and more powerful the impediment to the protein translation efficiency [16]. Based on this analysis, the Lewis Rap140/Fam208a with a shorter Glycine repeat is expected to produce more RAP140/FAM208A proteins than that of DSS rats.

#### **IV-2.6.3 *Slc7a12* is a potential transcription target for *Rap140/Fam208a***

*Slc7a12* [28] also known as *Asc-2* encodes a cationic amino acid transporter [29]. Since no physiological studies have been done [28], probable mechanisms causing hypertension by SLC7A12/ASC-2 are unknown and can only be inferred from kidney functions and their BP control. *Slc7a12* is restrictively expressed in kidneys (Fig. 3 (IV-2)), and particularly in apical and basal plasma membranes of collecting ducts [28]. SLC7A12/ASC-2 might participate in the synthesis of organic osmolytes from cationic amino acids, and/



or in renal osmotic and fluid imbalances through a facilitated diffusion [30] and consequently in the BP homeostasis [18]. A shorter *Rap140/Fam208a* transcript (Fig. 2 (IV-2)) supposedly results in producing a larger amount of the RAP140/FAM208A protein, which is associated with a lower *Slc7a12* expression and lower BP in C16S.L9 (Table II (IV-2)). Rap140/Fam208a seems to act as a transcription suppressor of *Slc7a12*. As a consequence, a slower diffusion rate/fewer osmolytes with a fewer *Slc7a12* might explain lower BP.

In contrast to *Slc7a12*, none of other genes tested were differentially expressed comparing the DSS with C16S.L9 (Table II (IV-2)), indicating that their differential expressions when comparing DSS and Lewis kidneys are either determined by mutations in their own regulatory regions or by genes other than *C16QTL* in the genome.

#### **IV-2.6.4 *C16QTL* acts ‘indirectly’ on blood pressure**

*Rap140/Fam208a* as *C16QTL* resembles a transcription factor, most likely involved in regulating expressions of other genes, and consequently its identification molecularly validates the concept that a QTL can ‘indirectly’ influence blood pressure via modulating other genes downstream such as *Slc7a12* in a pathway leading to BP regulation, rather than encoding an immediate and ‘direct’ BP physiology agent itself. This concept was logically inferred from the modularized actions of QTLs in influencing BP [7]. Since multiple BP QTLs together affect BP via an epistatic hierarchy [9], these QTLs standing higher in the hierarchy are to regulate other QTLs in the lower hierarchy and therefore are not expected to influence BP directly. The avenue of *Rap140/Fam208a/C16QTL* regulating other QTLs, or regulated by another QTL, in the same epistatic module [9] appears likely and warrants attention.

#### IV-2.6.5 Significance and caveats

First, the transcription regulation of *Slc7a12* by RAP140/Fam208a implicates a putative novel renal mechanism potentially connecting to blood pressure. Our present work suggested, for the first time, an adult physiological function for *Rap140/Fam208a* beyond its involvement in development [11]. Because its expression is highly kidney-specific, the current investigation implicates a premier functional role in blood pressure regulation in any organism for *Slc7a12*. Particularly, a novel pathway of Rap140/Fam208a-Slc7a12-BP tentatively emerged in kidneys. Nevertheless, since Rap140/Fam208a is ubiquitously expressed (Fig. 2c (IV-2)), mechanisms other than the renal origin are probable that may impact on BP.

Second, the Rap140/Fam208a-Slc7a12-BP pathway is the first to be implicated, but by no means, the only likely route to the BP control genetically triggered by differing *Rap140/Fam208a* alleles. Genes in addition to *Slc7a12* downstream and/or upstream of it may be differentially modulated in spatial (e.g. in another organ), temporal and environmental-specific fashions and could also be connected to BP.

Third, *Rap140 /Fam208a* was merely predicted in the rat before our current work. Since the Rap140/Fam208a protein is not detectable in kidneys by antibodies [11], but its gene expression was found by a highly sensitive RT-PCR, the impact of the Glycine deletion (Fig. 2 (IV-2)) on its protein production in kidneys cannot be directly assessed, and was indirectly evaluated by the down regulation of the renal *Slc7a12* expressions (Table II (IV-2)). At the present, no Slc7a12-specific antibodies are available anywhere. Thus, it remains to be determined whether or not the differential *Slc7a12* expressions can result in a differential production of the SLC7A12 protein.

Finally, although the structural 3-bp deletion supports *Rap140/Fam208a* as the candidate gene for *C16QTL* in contrast to the remaining 2 genes in the same genome-variation block, *Arhgef3* and *Ccdc66*, other genetic mechanisms in them cannot be excluded such as a regulatory mutation that could have a function consequence. Despite this caution, neither *Arhgef3* nor *Ccdc66* has a known function connection to BP. Thus, *C16QTL* is represented by a brand-new gene involved in the BP regulation.

## IV-2.7 Perspective

A systematic and comprehensive genetic analysis identified *C16QTL* that can independently influence BP from other QTLs. Our work has provided the first evidence that *Rap140/Fam208a* is a novel and sole candidate gene for *C16QTL*, and may become a plausible target for the genetic research of essential hypertension. One of the pathways originating from it towards the BP homeostasis may be mediated by the kidney-specifically expressed *Slc17a12*, whose function in hypertension is suggested for the first time in any organism from the present work.

## IV-2.8 References

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; **365**: 217-223.
2. Cowley AW, Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nat Rev Genet* 2006; **7**: 829-840.
3. Deng AY. Genetic basis of polygenic hypertension. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: R195-R202.
4. Kato N, Takeuchi F, Tabara Y, Kelly TN, Go MJ, Sim X, Tay WT, Chen CH, Zhang Y, Yamamoto K, Katsuya T, Yokota M, Kim YJ, Ong RTH, Nabika T, Gu D, Chang Lc, Kokubo Y, Huang W, Ohnaka K, Yamori Y, Nakashima E, Jaquish CE, Lee JY, Seielstad M, Isono M, Hixson JE, Chen YT, Miki T, Zhou X, Sugiyama T, Jeon JP, Liu JJ, Takayanagi R, Kim SS, Aung T, Sung YJ, Zhang X, Wong TY, Han BG, Kobayashi S, Ogiwara T, Zhu D, Iwai N, Wu JY, Teo YY, Tai ES, Cho YS, He J. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet* 2011; **43**: 531-538.

5. International BP Consortium. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 2011; **478**: 103-109.
6. Lim J, Shin YA, Hong KW, Jin HS, Koh I, Oh B. Characterization of functional variants in 33 blood pressure loci using 1000 genomes project data. *Genes Genom* 2013; **35**: 387-393.
7. Deng AY. Genetic mechanisms of polygenic hypertension: fundamental insights from experimental models. *Journal of Hypertension* 2015; **33**: 669-680.
8. Deng AY. Positional Cloning of Quantitative Trait Loci for Blood Pressure: How Close Are We?: A Critical Perspective. *Hypertension* 2007; **49**: 740-747.
9. Chauvet C, Crespo K, Menard A, Roy J, Deng AY. Modularization and epistatic hierarchy determine homeostatic actions of multiple blood pressure quantitative trait loci. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 4451-4459.
10. Duong C, Charron S, Deng Y, Xiao C, Menard A, Roy J, Deng AY. Individual QTLs controlling quantitative variation in blood pressure inherited in a Mendelian mode. *Heredity* 2007; **98**: 165-171.
11. Harten SK, Bruxner TJ, Bharti V, Blewitt M, Nguyen TM, Whitelaw E, Epp T. The first mouse mutants of D14Abbl1e (Fam208a) show that it is critical for early development. *Mamm Genome* 2014; **25**: 293-303.
12. Crespo K, Menard A, Deng AY. Hypertension Suppression, Not a Cumulative Thrust of Quantitative Trait Loci, Predisposes Blood Pressure Homeostasis to Normotension. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 2015; **in press**.
13. Atanur S, Diaz A, Maratou K, Sarkis A, Rotival M, Game L, Tschannen M, Kaisaki P, Otto G, Ma M, Keane T, Hummel O, Saar K, Chen W, Guryev V, Gopalakrishnan K, Garrett M, Joe B, Citterio L, Bianchi G, McBride M, Dominiczak A, Adams D, Serikawa

- T, Flicek P, Cuppen E, Hubner N, Petretto E, Gauguier D, Kwitek A, Jacob H, Aitman T. Genome Sequencing Reveals Loci under Artificial Selection that Underlie Disease Phenotypes in the Laboratory Rat. *Cell* 2013; **154**: 691-703.
14. Crespo K, Chauvet C, Blain M, Menard A, Roy J, Deng AY. Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes. *J Hypertens* 2011; **29**: 460-465.
  15. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Martensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RS, Robinson IC. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 1998; **19**: 125-133.
  16. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 2005; **62**: 133-139.
  17. Shan B, Zhu X, Chen PL, Durfee T, Yang Y, Sharp D, Lee WH. Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 5620-5631.
  18. GUYTON AC, COLEMAN TG, Cowley AW, Jr., MANNING RD, Jr., NORMAN RA, Jr., FERGUSON JD. Brief Reviews: A Systems Analysis Approach to Understanding Long-Range Arterial Blood Pressure Control and Hypertension. *Circ Res* 1974; **35**: 159-176.
  19. Berk BC, Corson MA. Angiotensin II Signal Transduction in Vascular Smooth Muscle : Role of Tyrosine Kinases. *Circ Res* 1997; **80**: 607-616.
  20. Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol* 2006; **213**: 67-77.

21. Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* 2006; **48**: 473-481.
22. Ooshima K, Ozaki S, Tabuchi M, Higashino H, Honda E, Park AM, Arima S, Munakata H. Decreased expression of catechol-O-methyltransferase in the renal cortex of malignant spontaneously hypertensive rats. *Tohoku J Exp Med* 2009; **219**: 331-336.
23. Li Q, Wen H, Ao S. Identification and cloning of the cDNA of a Rb-associated protein RAP140a. *Sci China C Life Sci* 2000; **43**: 637-647.
24. Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* 1984; **223**: 1028-1033.
25. Du W, Pogoriler J. Retinoblastoma family genes. *Oncogene* 2006; **25**: 5190-5200.
26. Hillmer AM, Hanneken S, Ritzmann S, Becker T, Freudenberg J, Brockschmidt FF, Flaquer A, Freudenberg-Hua Y, Jamra RA, Metzen C, Heyn U, Schweiger N, Betz RC, Blaumeiser B, Hampe J, Schreiber S, Schulze TG, Hennies HC, Schumacher J, Propping P, Ruzicka T, Cichon S, Wienker TF, Kruse R, Nothen MM. Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia. *Am J Hum Genet* 2005; **77**: 140-148.
27. Ellis J, Scurrah K, Cobb J, Zaloumis S, Duncan A, Harrap S. Baldness and the androgen receptor: the AR polyglycine repeat polymorphism does not confer susceptibility to androgenetic alopecia. *Hum Genet* 2007; **121**: 451-457.
28. Chairoungdua A, Kanai Y, Matsuo H, Inatomi J, Kim DK, Endou H. Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J Biol Chem* 2001; **276**: 49390-49399.

29. Verrey F, Closs E, Wagner C, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2004; **447**: 532-542.
30. Broer S. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol Rev* 2008; **88**: 249-286.

## IV-2.9 Supplements

**Supplement S1 (IV-2):** Total genome sequencing and identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs): DNA Sequencing Pipeline Genome Quebec and McGill Innovation Center, October 2013.

Program	Reference
<b>Genome Analysis Toolkit</b>	<a href="http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit">http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit</a>
<b>BWA</b>	<a href="http://bio-bwa.sourceforge.net/">http://bio-bwa.sourceforge.net/</a>
<b>igvtools</b>	<a href="http://www.broadinstitute.org/igv/igvtools">http://www.broadinstitute.org/igv/igvtools</a>
<b>samtools</b>	<a href="http://samtools.sourceforge.net/">http://samtools.sourceforge.net/</a>
<b>picard</b>	<a href="http://picard.sourceforge.net/">http://picard.sourceforge.net/</a>
<b>snpSift/snpEff</b>	<a href="http://snpeff.sourceforge.net/SnpSift.html">http://snpeff.sourceforge.net/SnpSift.html</a>
<b>Trimmomatic</b>	<a href="http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic">http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic</a>

**Deliverables:** The following files are delivered to clients: (1) A sample statistics file containing the metrics enumerated in Step 6. (2) A .csv file containing all the variants found in at least one sample, often classified by chromosome because of large file sizes. (3) A .csv file containing all the high impact coding variants found in at least one sample, based on the Step 9 annotations.

**Sequencing Reads:** Around 50 to 150 million 100 b.p. paired-end reads from the Illumina HiSeq 2000 sequencer. Base quality is encoded in phred 33.

**Pipeline steps:** The pipeline is executed on Compute Canada clusters via unix bash commands, perl scripts and open source software.

**Step 1: Read trimming and clipping of adapters:** Reads are trimmed from the 3' end to have a phred score of at least 30. Illumina sequencing adapters are removed from the reads, and all reads are required to have a length of at least 32 b.p. Trimming and clipping are done with the Trimmomatic software [1].



**Step 2: Aligning the reads to the genome reference:** The filtered reads are aligned to the reference genome. The alignment is done per lane of sequencing, and then merged for a complete **Binary Alignment Map** file (.bam). The alignment software used is bwa [2], and the merging is done with the picard software [3].

**Step 3: Realigning insertions and deletions (INDELS):** Insertion and deletion realignment is performed on regions where multiple base mismatches are preferred over indels by the aligner since it can appear to be less costly by the algorithm. Such regions will introduce false positive variant calls which may be filtered out by realigning those regions properly. Realignment is done with the GATK software [4].

**Step 4: Fixing the read mates:** Once local regions are realigned, the read mate coordinates of the aligned reads need to be recalculated since the reads are realigned at positions that differ from their original alignment. Fixing the read mate positions is done with picard software [3].

**Step 5: Marking duplicates:** Aligned reads are duplicates if they have the same 5' alignment positions (for both mates in the case of paired-end reads). All but the best pair (based on alignment score) will be marked as a duplicate in the .bam file. Marking duplicates is done with picard software [3].

**Step 6: Compute metrics and generating coverage track:** Multiple metrics are computed at this stage and given in the statistics file:

- Number of raw reads
- Number of filtered reads (after Step 1)
- Number of aligned reads (after Step 2)
- Number of duplicate reads (after Step 5)
- Duplicate rate (number of duplicate reads / number of raw reads. Good run max of 25%)

- Median, mean and standard deviation of insert sizes of reads after alignment
- Mean coverage over exons (mean number of reads per base position)
- Percentage of bases covered at X reads (`%_bases_above_50` means the % of exons bases which have at least 50 reads. A good run is typically around 50%). A TDF (.tdf) coverage track is also generated at this step for easy visualization of coverage in the IGV browser [5].

**Step 7: Variant calling:** Variants (SNPs and INDELS) are called using samtools mpileup and bcftools varfilter [6]. The following options are given to mpileup to filter for low quality variants which could introduce false positive calls: `-L 1000 -E -q 1 -u -D -S`, where:

- L INT max per-sample depth for INDEL calling [250]
- E extended BAQ for higher sensitivity but lower specificity
- q INT skip alignments with mapQ smaller than INT [0]
- u generate uncompressed BCF output
- D output per-sample DP in BCF (require `-g/-u`)
- S output per-sample strand bias P-value in BCF (require `-g/-u`)

The output of mpileup is then fed to varfilter, which does an additional filtering of the variants and transforms the output into the VCF (.vcf) format. The arguments used are: `-d 2 -D 1200 -Q 15 -1 0.0`, where:

- d INT minimum read depth [2]
- D INT maximum read depth [10000000]
- Q INT minimum RMS mapping quality for SNPs [10]
- 1 FLOAT min P-value for strand bias (given PV4) [0.0001]

The final .vcf files are filtered for long 'N' INDELS which are sometimes introduced and causing excessive memory usage by downstream tools.

**Supplement S2 (IV-2):** Selective global evaluation of genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) comparing DSS and Lewis rats.

Chromosome (Chr)	Gene number	SNP Count	SNPs in genes Count	SNPs in Exon Count	SNPs in intron-exon junctions count
Chr1	2 643	431 290	111 941	3 574	1 588
Chr2	1 115	506 527	98 039	1 886	1 111
Chr3	1 550	263 475	62 965	1 944	986
Chr4	1 185	270 209	78 309	1 505	897
Chr5	1 060	188 601	46 127	1 153	666
Chr6	719	247 020	46 312	1 088	649
Chr7	1 117	245 827	61 742	1 955	1 019
Chr8	1 057	204 003	51 750	1 448	752
Chr9	666	159 279	42 518	655	480
Chr10	1 507	196 741	61 224	2 582	1 367
Chr11	480	141 888	32 930	934	418
Chr12	508	94 706	29 131	815	626
Chr13	586	151 050	38 025	877	573
Chr14	551	124 193	29 395	714	389
Chr15	548	162 540	38 436	797	373
Chr16	492	109 407	30 684	740	478
Chr17	491	121 618	26 337	532	345
Chr18	414	134 343	36 156	1 092	387
Chr19	454	74 450	20 745	637	432
Chr20	592	112 869	32 476	2 139	936
chrX	595	122 396	14 593	490	241
<b>Total</b>	<b>18 330</b>	<b>4 062 432</b>	<b>989 835</b>	<b>27 557</b>	<b>14 713</b>

Footnote to supplement S2 (IV-2): Gene number refers to the number of known genes. Intron-exon junctions include before and exon sequences up to 100 base pairs.

Supplement S3 (IV-2). Coding sequence alignment of the *Retinoblastoma associated protein 140 (Rap140/Fam208a)* gene between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats

```

M A T A A E T E A S S T D T S W E N G G
DSS ATGGCGACTCTCCGAGACGGAGGCTCTTCGACGGACACGAGCTGGGAAAACGGTGGC 60
Lewis ATGGCGACTCTCCGAGACGGAGGCTCTTCGACGGACACGAGCTGGGAAAACGGTGGC 60
*****

G G G G G G D D G M K P A L P E L E S S
DSS GGGGGGGGGGGGGGGAGACGGGATGAAGCCAGCCCTTCCGGAGCTTGAGTCTCTCC 120
Lewis GGGGGGGGGGGC---GGAGACGGGATGAAGCCAGCCCTTCCGGAGCTTGAGTCTCTCC 117
*****

L Q N G C V F S T A E L G G R G G G A G
DSS CTACAAAATGGCGGCTCTCTCCACCGGGAGCTCGGCGGCGGGGGGGGGGGGGGG 180
Lewis CTACAAAATGGCGGCTCTCTCCACCGGGAGCTCGGCGGCGGGGGGGGGGGGGGG 177
*****

P E E T A A A E A A R S H G H E P L Q N
DSS CCTGAGGAGACGGCGGAGCCGAGCCGCTCGGAGCCACGGCCACGAGCCGCTTCAGAAC 240
Lewis CCTGAGGAGACGGCGGAGCCGAGCCGCTCGGAGCCACGGCCACGAGCCGCTTCAGAAC 237
*****

K S E A A A A S L P K G A E E P E R P F
DSS AAGTCCGAGCCGGCGGCGCTCTCTGCCCAAAGCCGCGGAGCCGAAAGGCGCTTTT 300
Lewis AAGTCCGAGCCGGCGGCGCTCTCTGCCCAAAGCCGCGGAGCCGAAAGGCGCTTTT 297
*****

R R S F Q I P R K S R E K K A L F Q Q L
DSS AGCCGAGTTTTCAGATCCCGAGAGAGCAGAGAAAAGAAAGCTCTTTTCCAGCAGTTA 360
Lewis AGCCGAGTTTTCAGATCCCGAGAGAGCAGAGAAAAGAAAGCTCTTTTCCAGCAGTTA 357
*****

T P G S R E F E D V L N I L H S S Y L E
DSS ACTCCAGGCTCTCGAGAAATGGAAGATGTTTTAAATATTCTCCATTCACTTACCTTGAA 420
Lewis ACTCCAGGCTCTCGAGAAATGGAAGATGTTTTAAATATTCTCCATTCACTTACCTTGAA 417
*****

P T S V A N F N Y R R A C L I H N E L L
DSS CCGACCTCAGTAGCAAATTTAACTATAGACGAGCTTGCTTGATACATAATGAACCTTTG 480
Lewis CCGACCTCAGTAGCAAATTTAACTATAGACGAGCTTGCTTGATACATAATGAACCTTTG 477
*****

E K E F T E K R R E L K F D G R L D K E
DSS GAAAAAGAGTTTACAGAAAAGAGAAGAAATGAAATTTGATGGTTCGTTAGATAAGGAA 540
Lewis GAAAAAGAGTTTACAGAAAAGAGAAGAAATGAAATTTGATGGTTCGTTAGATAAGGAA 537
*****

L S E S Y A F L M V D R Y Q V Q S I C E
DSS CTTTCAGAGTCTTATGCATTTCTCATGGTTGATCGGTACCAGGTTTCAGAGCATATGTGAA 600
Lewis CTTTCAGAGTCTTATGCATTTCTCATGGTTGATCGGTACCAGGTTTCAGAGCATATGTGAA 597
*****

K G L Q V G Q S K I T V L G S P S M G I
DSS AAAGGATTGCAGGTGGGCCAGTCCAAAATAACAGTTCTTGGCAGTCCCTCCATGGGTATC 660
Lewis AAAGGATTGCAGGTGGGCCAGTCCAAAATAACAGTTCTTGGCAGTCCCTCCATGGGTATC 657
*****

Y L C R Y A D L L Q A N P L E A G A V G
DSS TATCTTTGTAGGTATGCAGATCTCTTACAGGCTAATCCTTTGGAAGCTGGAGCAGTAGGC 720
Lewis TATCTTTGTAGGTATGCAGATCTCTTACAGGCTAATCCTTTGGAAGCTGGAGCAGTAGGC 717
*****

D V V I F K I M K G K I K S I Y D P L S
DSS GATGTTGTTATTTTAAAATAATGAAGGGTAAAATAAAGAGTATTTATGATCCTTTAAGT 780
Lewis GATGTTGTTATTTTAAAATAATGAAGGGTAAAATAAAGAGTATTTATGATCCTTTAAGT 777
*****

V K S L E S M L S K S A L D P T P K E E
DSS GTAAAAAGCTTGGAAATCCATGTTAAGTAAAAGTCTTTGGACCCCTACACCAAAGCATGAA 840
Lewis GTAAAAAGCTTGGAAATCCATGTTAAGTAAAAGTCTTTGGACCCCTACACCAAAGCATGAA 837
*****

```

```

      C E V S K N A S R I T S L L A Y R A Y E
DSS   TGCCATGTGTCTAAGAACCCAGTAGGATTACGTCCCTCCTGGCCCTACAGACCTATGAG 900
Lewis TGCCATGTGTCTAAGAACCCAGTAGGATTACGTCCCTCCTGGCCCTACAGACCTATGAG 897
      .....
      ↓
      L T Q Y Y F Y E Y G F D E V R R R F R H
DSS   CTCACTCAGTATTATTTTTATGASTATGGCTTTGATGAAGTAAAGACCGAGACCAAGACAT 960
Lewis CTCACTCAGTATTATTTTTATGASTATGGCTTTGATGAAGTAAAGACCGAGACCAAGACAT 957
      .....
      V C P Y A V V S F T Y K D D V Q T P K F
DSS   GTTTGTCCATATGCAGTTGTGTCTTTACTTACAAGATGATGTACAAACTCCAAAGTTT 1020
Lewis GTTTGTCCATATGCAGTTGTGTCTTTACTTACAAGATGATGTACAAACTCCAAAGTTT 1017
      .....
      ↓           ↓
      V S L R S N S F N A D R N I D K F N Y T
DSS   GTGTCTTTGAGATCTAACAGCTTTAATGCAGATAGAAACATAGATAAGTTTAACTATAAC 1080
Lewis GTGTCTTTGAGATCTAACAGCTTTAATGCAGATAGAAACATAGATAAGTTTAACTATAAC 1077
      .....
      L M K G Q L L N K G K L L C Y I S L R S
DSS   TTATGSAAGGACAACCTTTTAAATAAAGGAAAGCTTCTGTGTTATATTTCTTTGAGGTCG 1140
Lewis TTATGSAAGGACAACCTTTTAAATAAAGGAAAGCTTCTGTGTTATATTTCTTTGAGGTCG 1137
      .....
      ↓
      A N R A F L P V K L P E K L D V E T V M
DSS   GCCAATCGTGCCCTTTTACCTGTAAAGCTTCCCGAGAAGTTAGATGTTGAAACAGTTATG 1200
Lewis GCCAATCGTGCCCTTTTACCTGTAAAGCTTCCCGAGAAGTTAGATGTTGAAACAGTTATG 1197
      .....
      S I D C L K Q K I P S S F F H K D T Y V
DSS   AGTATTGATGTTTGAACAGAAAAATTCCTTCTTCATTTTTTCATAAAGACACATACGTG 1260
Lewis AGTATTGATGTTTGAACAGAAAAATTCCTTCTTCATTTTTTCATAAAGACACATACGTG 1257
      .....
      ↓
      G P N E V L K N G M Y C S L Y E V V E K
DSS   GGTCCATGAAGTTTTAAAGAAATGGGATGATTTGTAGCCCTTATGAAGTTGTAGAAAAG 1320
Lewis GGTCCATGAAGTTTTAAAGAAATGGGATGATTTGTAGCCCTTATGAAGTTGTAGAAAAG 1317
      .....
      ↓
      T R I G S N M E C L L Q K L E K E K L V
DSS   ACAAGAATTGGAAGTAAACATGGAGTGTGCTGCAAAAACGGAGAAAGAGAAAACCTGTT 1380
Lewis ACAAGAATTGGAAGTAAACATGGAGTGTGCTGCAAAAACGGAGAAAGAGAAAACCTGTT 1377
      .....
      L V K P L G D R G Y L F L L S P F Q M V
DSS   CTTGTTAAACCTTTAGGAGACCGAGGATACCTTTTCTTCTTCTCCTTTCCAGATGGTT 1440
Lewis CTTGTTAAACCTTTAGGAGACCGAGGATACCTTTTCTTCTTCTCCTTTCCAGATGGTT 1437
      .....
      ↓
      S S Y D H Q T G K S R I L H A L F L F Q
DSS   TCTTCATATGACCATCAGACTGGCAAGTCAOGAATCCTGCATGCTTTGTTTCTGTTTCAA 1500
Lewis TCTTCATATGACCATCAGACTGGCAAGTCAOGAATCCTGCATGCTTTGTTTCTGTTTCAA 1497
      .....
      ↓
      E P R C L I V A Q K S V T N T T P L E K
DSS   GAACCTAGATGCCCTAATTGTCCACAAAAAAGTGAACGAATACAACCCCACTGGAGAAA 1560
Lewis GAACCTAGATGCCCTAATTGTCCACAAAAAAGTGAACGAATACAACCCCACTGGAGAAA 1557
      .....
      H E N L P D I L K I T Q P L Q F S L I Q
DSS   CATGAGAACTTACCAGATATATTAATAAATAACTCAGTTTTTACAGTTTTCTTTGATTCAA 1620
Lewis CATGAGAACTTACCAGATATATTAATAAATAACTCAGTTTTTACAGTTTTCTTTGATTCAA 1617
      .....
      C R K E F K T I N T I N F H S V V E K Y
DSS   TGTAGAAAAGAATTCAAAACATAAACACTATAAAATTTTCATTCOGTTGTTGAAAAGTAT 1680
Lewis TGTAGAAAAGAATTCAAAACATAAACACTATAAAATTTTCATTCOGTTGTTGAAAAGTAT 1677
      .....
      V S E F F K R G F G S G K R E F F M F S
DSS   GTAAGTGAATTTTTAAGCGAGGTTTTGGTTCCGGTAAGCGAGAGTTTTTATGTTTTCA 1740
Lewis GTAAGTGAATTTTTAAGCGAGGTTTTGGTTCCGGTAAGCGAGAGTTTTTATGTTTTCA 1737
      .....

```



Y D S R L D D R K F L Y S A P R N K S H  
 DSS TATGATTCAAGATTAGATGATAGAAAATTCCTGTACTCAGCACCAAGAAATAAATCCCAT 1800  
 Lewis TATGATTCCAGATTAGATGATAGAAAATTCCTGTACTCAGCACCAAGAAATAAATCCCAT 1797  
 .....  
 I D D C L H T Y I Y Q P E M Y Q L P I F  
 DSS AITGATGACTGTTTACATACCTACATTATCAGCCAGAAATGTATCAGTTACCTATTTTT 1860  
 Lewis AITGATGACTGTTTACATACCTACATTATCAGCCAGAAATGTATCAGTTACCTATTTTT 1857  
 .....  
 K L K E L F E E N W R R Q Q F S P L S D  
 DSS AAATTAAGAGATTATTTGAAGAAAATGGAGACGTCAACAATTTAGTCCACTTTTCAGAT 1920  
 Lewis AAATTAAGAGATTATTTGAAGAAAATGGAGACGTCAACAATTTAGTCCACTTTTCAGAT 1917  
 .....  
 Y E G Q E E E L N G S K M K F G K R N N  
 DSS TATGAAGGTCAGAGAGAAGAACTGAATGGTTCAAAAATGAAATTTGGAAAACGGAAATAAC 1980  
 Lewis TATGAAGGTCAGAGAGAAGAACTGAATGGTTCAAAAATGAAATTTGGAAAACGGAAATAAC 1977  
 .....  
 S R G E T T E P G Q Q K S S E S L D Y D  
 DSS TCAAGGGGTGAACACTGAACTGGACAGCAGAAAGTCATCCCAATTCATTGGATTATGAT 2040  
 Lewis TCAAGGGGTGAACACTGAACTGGACAGCAGAAAGTCATCCCAATTCATTGGATTATGAT 2037  
 .....  
 K D R V K E L I N L I Q C T K K N V G G  
 DSS AAGGATAGAGTCAAGAAATTGATCAATTTAATTCAGTGTACCAAAAAAATGTGGGTGGG 2100  
 Lewis AAGGATAGAGTCAAGAAATTGATCAATTTAATTCAGTGTACCAAAAAAATGTGGGTGGG 2097  
 .....  
 D P D T E D T K S K N V L K R K L E D L  
 DSS GATCCAGATACAGAGATACAAAAGCAAAAATGCTTGAAGAGGAAGCTTGAAGATCTA 2160  
 Lewis GATCCAGATACAGAGATACAAAAGCAAAAATGCTTGAAGAGGAAGCTTGAAGATCTA 2157  
 .....  
 P E N M R K F A K T S N S S E N Y H P Y  
 DSS CCTGAAAACATGAGGAAGTTTGCCAAAACCAAGTAACCTGCTGAGAACTACCATCCATAT 2220  
 Lewis CCTGAAAACATGAGGAAGTTTGCCAAAACCAAGTAACCTGCTGAGAACTACCATCCATAT 2217  
 .....  
 I  
 E E P P Q S V G L L G H D P N L R L Q Q  
 DSS GAAGAACCTCCACAGTCTGTGGCTTACTTGGACATGATCCTAACTTGAGACTGCAGCAG 2280  
 Lewis GAAGAACCTCCACAGTCTGTGGCTTACTTGGACATGATCCTAACTTGAGACTGCAGCAG 2277  
 .....  
 E D A C S T G D I H K L Y N W I S E T L  
 DSS GAAGATGCATGCAGTACTGGAGACATCCACAAGCTTTATAACTGGATATCGGAAACACTA 2340  
 Lewis GAAGATGCATGCAGTACTGGAGACATCCACAAGCTTTATAACTGGATATCGGAAACACTA 2337  
 .....  
 A N A R H S D A F L T E T V N K A L G L  
 DSS GCAAAATGCAAGCACTCCGATGCATTCTCACGGAGACAGTCAACAAGCCCTTAGGGTTG 2400  
 Lewis GCAAAATGCAAGCACTCCGATGCATTCTCACGGAGACAGTCAACAAGCCCTTAGGGTTG 2397  
 .....  
 S S S G T Y E E L K Q K C D Y E L N P T  
 DSS AGTAGCAGTGGTACCTATGAGGAGCTAAAGCAAAAGTGTGATTATGAGCTGAACCCGACT 2460  
 Lewis AGTAGCAGTGGTACCTATGAGGAGCTAAAGCAAAAGTGTGATTATGAGCTGAACCCGACT 2457  
 .....  
 L D K K E C E Q P A C T K I E N V H F K  
 DSS TTAGATAAAAAGAGTGTGAGCAGCCTGCTTGTACAAAAATGAAAATGTGCACTTAAG 2520  
 Lewis TTAGATAAAAAGAGTGTGAGCAGCCTGCTTGTACAAAAATGAAAATGTGCACTTAAG 2517  
 .....  
 D A Q S P V L E V D A A S G K Y P P L L  
 DSS GATGCTCAGAGCCAGTGTAGAGGTTGATGCAGCATCCGGAAAAGTATCCTCCTCTTCTA 2580  
 Lewis GATGCTCAGAGCCAGTGTAGAGGTTGATGCAGCATCCGGAAAAGTATCCTCCTCTTCTA 2577  
 .....  
 I  
 S S S E D P N L I N V N H F E E C S L C  
 DSS TCCAGCAGTGAAGATCCAAATTTAATTAATGTCAATCATTTTGAAGAGTGCAGTCTCTGT 2640  
 Lewis TCCAGCAGTGAAGATCCAAATTTAATTAATGTCAATCATTTTGAAGAGTGCAGTCTCTGT 2637  
 .....  
 P T V S I E N G L L R Q H S K S N D D E  
 DSS CCCACTGTTTCCATTGAGCATGGACTCCTTAGACAACATTCTAAGTCAAAATGATGATGAA 2700  
 Lewis CCCACTGTTTCCATTGAGCATGGACTCCTTAGACAACATTCTAAGTCAAAATGATGATGAA 2697  
 .....

```

      E T E I H N K L I P I T G G N A G S P E
DSS      GAGACAGAAATACACTGGAAATTGATTCCAATTACAGGAGGGAATGCAGGAAGCCAGAA 2760
Lewis    GAGACAGAAATACACTGGAAATTGATTCCAATTACAGGAGGGAATGCAGGAAGCCAGAA 2757
      ..*.

      D Q H G K H G E K H T P G M K S P G E Q
DSS      GACCAGCATGGGAACATGGTGAGAAACACACACCAGGAATGAAATCACCAGGAGAACAG 2820
Lewis    GACCAGCATGGGAACATGGTGAGAAACACACACCAGGAATGAAATCACCAGGAGAACAG 2817
      ..*.

      L V C P P P A E A F P N D P R V I N R E
DSS      CTGGTGTGTCGGCCACCAGCGGAAGCTTTTCTAATGATCCCCGGTCATCAATAGAGAA 2880
Lewis    CTGGTGTGTCGGCCACCAGCGGAAGCTTTTCTAATGATCCCCGGTCATCAATAGAGAA 2877
      ..*.

      R S C D Y Q F P S S P A T D T V K G P T
DSS      AGAAGCTGTGATTACAGTTTCCATCCTCTCCGGCTACAGACACTGTAAAAGGTCGCCACC 2940
Lewis    AGAAGCTGTGATTACAGTTTCCATCCTCTCCGGCTACAGACACTGTAAAAGGTCGCCACT 2937
      ..*.

      E E E D T V A G Q A M T V E E Q C V F A
DSS      GAGGAGGAGGACTGTAGCAGGTCAGGCGATGACAGTGGAAAGAGCAGTGTGTTCCAGCA 3000
Lewis    GAGGAGGAGGACTGTAGCAGGTCAGGCGATGACAGTGGAAAGAGCAGTGTGTTCCAGCA 2997
      ..*.

      A E L P A V S E T T E S T V L G E F H L
DSS      GCAGAGCTTCTCCAGTGAGCGAGACTACAGAGAGTACAGTGTAGGAGAGTTCCATCTC 3060
Lewis    GCAGAGCTTCTCCAGTGAGCGAGACTACAGAGAGTACAGTGTAGGAGAGTTCCATCTC 3057
      ..*.

      F S R K I E E I L K Q K N V S Y V S S I
DSS      TTCTCTAGAAAGATAGAAGAGATTTTGAAGCAGAAGAATGTTTCATATGTTAGTTCAATT 3120
Lewis    TTCTCTAGAAAGATAGAAGAGATTTTGAAGCAGAAGAATGTTTCATATGTTAGTTCAATT 3117
      ..*.

      S T P L F S A Q E K M N R L S E F I Y S
DSS      TCCACACCTCTCTTTTCAGCACAGAGAAGATGAATCGCCTTCTGAGTTCATATATTCT 3180
Lewis    TCCACACCTCTCTTTTCAGCACAGAGAAGATGAATCGCCTTCTGAGTTCATATATTCT 3177
      ..*.

      K T S K A G V Q E F V D G L H E K L N T
DSS      AAGACTTCTAAAGCTGGTGTACAGGAATTTGTAGATGGTTTGCATGAAAACTAAATACT 3240
Lewis    AAGACTTCTAAAGCTGGTGTACAGGAATTTGTAGATGGTTTGCATGAAAACTAAATACT 3237
      ..*.

      I I I K A S A K G V N L P P G V S P N H
DSS      ATTATTATTAAGCATCAGCTAAGGGTGTGAATTTGCCACCAGGAGTAAAGCCCTAATCAC 3300
Lewis    ATTATTATTAAGCATCAGCTAAGGGTGTGAATTTGCCACCAGGAGTAAAGCCCTAATCAC 3297
      ..*.

      S H T T T T L S S L G R H V V S I S S S
DSS      TCTCATACTACGACAACATTGAGTTCCCTGGGAGGCATGTTGTATCAATTTCTCAAGT 3360
Lewis    TCTCATACTACGACAACATTGAGTTCCCTGGGAGGCATGTTGTATCAATTTCTCAAGT 3357
      ..*.

      D F N S K D L F E P L C S E H L K D N S
DSS      GACTTCAACAGTAAAGACCTTTTTGAGCCACTCTGTTCTGAACATTTAAAAGATAACAGC 3420
Lewis    GACTTCAACAGTAAAGACCTTTTTGAGCCACTCTGTTCTGAACATTTAAAAGATAACAGC 3417
      ..*.

      S N E Q Y S S S M E V E I N Q P H E C K
DSS      TCTAATGAACAGTATTCTCTTCAATGGAAGTAGAAAATTAATCAGCCGACCACTGCAAA 3480
Lewis    TCTAATGAACAGTATTCTCTTCAATGGAAGTAGAAAATTAATCAGCCGACCACTGCAAA 3477
      ..*.

      E L M L T S D H T V P G D T V L E P T E
DSS      GAGTTAATGTTGACTTCTGATCACACTGTACTGGTGATACTGTCTGGAAACCCACAGAA 3540
Lewis    GAGTTAATGTTGACTTCTGATCACACTGTACTGGTGATACTGTCTGGAAACCCACAGAA 3537
      ..*.

      K E I T K S P S D I T I S A Q P A L S N
DSS      AAAGAAATAACAAAATCACCAGGATATAACCAATTTCTGCACAACCACTTTCAAAT 3600
Lewis    AAAGAAATAACAAAATCACCAGGATATAACCAATTTCTGCACAACCACTTTCAAAT 3597
      ..*.

      F I S Q L E P E V F N S L V K I M K D V
DSS      TTTATAAGCCAGTTAGAACCCTGAAGTATTTAATAGTTTAAATCATGAAAGATGTC 3660
Lewis    TTTATAAGCCAGTTAGAACCCTGAAGTATTTAATAGTTTAAATCATGAAAGATGTC 3657
      ..*.

```

Q K N T V K F Y I H E E E E S V L C K E  
 DSS CAGAAAAACTGTGAAATTTTACATTCATGAAGAAGAGGAGGTGTGCTTTGCCAAAGAA 3720  
 Lewis CAGAAAAACTGTGAAATTTTACATTCATGAAGAAGAGGAGGTGTGCTTTGCCAAAGAA 3717  
 \*\*\*\*\*  
 ↓  
 I K E Y L T K L G N T E C H P D Q F L E  
 DSS ATAAAGGAGTATCTTACCAAATTAGGCAATACAGAATGTCATCCAGATCAGTTTTTAGAG 3780  
 Lewis ATAAAGGAGTATCTTACCAAATTAGGCAATACAGAATGTCATCCAGATCAGTTTTTAGAG 3777  
 \*\*\*\*\*  
 R R S N L D K L L I I I Q N E D I A G F  
 DSS AGAAGATCAAACCTGGATAAACTATTGATTATTATTCAAATGAAGACATTGCAGGTTTC 3840  
 Lewis AGAAGATCAAACCTGGATAAACTATTGATTATTATTCAAATGAAGACATTGCAGGTTTC 3837  
 \*\*\*\*\*  
 ↓  
 I H K V P G L V T L K K L P C V S F A G  
 DSS ATTACAMGGTACCTGGCTTGGTGACTTAAAGAAGCTCCCATGTGTAGTTTTGCCGGT 3900  
 Lewis ATTACAMGGTACCTGGCTTGGTGACTTAAAGAAGCTCCCATGTGTAGTTTTGCCGGT 3897  
 \*\*\*\*\*  
 V D S L D D V K N H T Y N E L F V S G G  
 DSS GTTGATAGCCTTGATGATGTTAAAAATCATACATACAACGAGTTATTGTATCTGGTGGC 3960  
 Lewis GTTGATAGCCTTGATGATGTTAAAAATCATACATACAACGAGTTATTGTATCTGGTGGC 3957  
 \*\*\*\*\*  
 ↓  
 F I V S D E S V L N P E V V T I E S L K  
 DSS TTTATTGTGTCTGATGAATCAGTTCTAAATCCAGAAGTTGTCCAAATGAGAGCCTTAAA 4020  
 Lewis TTTATTGTGTCTGATGAATCAGTTCTAAATCCAGAAGTTGTCCAAATGAGAGCCTTAAA 4017  
 \*\*\*\*\*  
 N F L T F L E E L S T P E G K W Q N K I  
 DSS AATTTTTGACATTCTTGAAGAAGTTAGTACTCCAGAGGGGAAATGGCAATGGAAAAATC 4080  
 Lewis AATTTTTGACATTCTTGAAGAAGTTAGTACTCCAGAGGGGAAATGGCAATGGAAAAATC 4077  
 \*\*\*\*\*  
 ↓  
 H C K F Q K K L K E L A L L E N D E K D  
 DSS CACTGTAAATCCAGAAGAACTAAAGGAAGCTGGCTCTTTTAGAAAACGATGAAAAGGAT 4140  
 Lewis CACTGTAAATCCAGAAGAACTAAAGGAAGCTGGCTCTTTTAGAAAACGATGAAAAGGAT 4137  
 \*\*\*\*\*  
 E E D M S L D S G D E I S H I E V F S N  
 DSS GAAGAGGATATGCTCTGGATTGAGGGGATGAAATCTCACATATAGAAGTATTCAGCAAT 4200  
 Lewis GAAGAGGATATGCTCTGGATTGAGGGGATGAAATCTCACATATAGAAGTATTCAGCAAT 4197  
 \*\*\*\*\*  
 V H S E I L A R E T K G S S G T D Q K K  
 DSS GTTCATTGAGAAATATTGGCGAGAGAGACCAAGGATCAAGTGGAAACAGATCAAAAAAAG 4260  
 Lewis GTTCATTGAGAAATATTGGCGAGAGAGACCAAGGATCAAGTGGAAACAGATCAAAAAAAG 4257  
 \*\*\*\*\*  
 N I Q I E L Q S S L D V Q T S L L E D Q  
 DSS AATATTGAGATTGAATTGCAATCATCTCTGATGTGCAAAACGATTTATTAGAAGATCAG 4320  
 Lewis AATATTGAGATTGAATTGCAATCATCTCTGATGTGCAAAACGATTTATTAGAAGATCAG 4317  
 \*\*\*\*\*  
 T Y L I D C D E R A P I D R V R S E G E  
 DSS ACTTATTTAATTGATTGTGACGAAAGAGCTCCTATTGATAGAGTACGCTCTGAAGGAGAG 4380  
 Lewis ACTTATTTAATTGATTGTGACGAAAGAGCTCCTATTGATAGAGTACGCTCTGAAGGAGAG 4377  
 \*\*\*\*\*  
 N S N S A E Q D A Y S D F Q A Y Q N Q L  
 DSS AACAGCAATTCAGCAGAGCAAGATGCGTATAGCGACTTTCAGGCTTACCAAATCAATTA 4440  
 Lewis AACAGCAATTCAGCAGAGCAAGATGCGTATAGCGACTTTCAGGCTTACCAAATCAATTA 4437  
 \*\*\*\*\*  
 K M S H Q F S H F N V L T R Q T F L G T  
 DSS AAAATGTCCATCAGTTTAGTCATTTAATGTTCTCAGGCATCAGACGTTTCTGGGGACA 4500  
 Lewis AAAATGTCCATCAGTTTAGTCATTTAATGTTCTCAGGCATCAGACGTTTCTGGGGACA 4497  
 \*\*\*\*\*  
 P Y A L S S T Q S Q E N E N Y F L S A Y  
 DSS CCATATGCCCTTTCATCAACTCAGTCTCAAGAAAATGAAAATTACTTTTTATCTGCTTAT 4560  
 Lewis CCATATGCCCTTTCATCAACTCAGTCTCAAGAAAATGAAAATTACTTTTTATCTGCTTAT 4557  
 \*\*\*\*\*  
 K N L D T E K S P L S -  
 DSS AAAAATTTGGATACAGAGAAATCTCCACTAAGTTAA 4596  
 Lewis AAAAATTTGGATACAGAGAAATCTCCACTAAGTTAA 4593  
 \*\*\*\*\*



Footnote to Supplement S3 (IV-2): \* indicates nucleotide identity. The amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs and/or cDNAs from the kidneys of DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced. ↓ marks the last nucleotide of each exon. The nucleotides in light grey are silent mutations. An absence of three nucleotides GGC at #73-75 causes a deletion of a Glycine at #25 in Lewis amino acid sequence compared with DSS. The C16S.L9 congenic strain carries the same Glycine deletion as that of Lewis (data not shown).



```

          ↓
          P D Q Q H L E E A I N I I Q G I V A E I
DSS      CCAGACCAGCAGCACCTGGAAGAAGCTATAAACATCATTTCAGGGAATTGTGGCAGAAATC 900
Lewis    CCAGACCAGCAGCACCTGGAAGAAGCTATAAACATCATTTCAGGGAATTGTGGCAGAAATC 900
          .....
          N T K T G E S E C R Y Y K E R L L Y L E
DSS      AACACCAAGACTGGGGAATCGGAATGCCGTTATTACAAAGAGCGGCTTCTTTACTTGGAA 960
Lewis    AACACCAAGACTGGGGAATCGGAATGCCGTTATTACAAAGAGCGGCTTCTTTACTTGGAA 960
          .....
          E G Q K D S L I D S S R V L C C H G E L
DSS      GAAGGCCAGAAAGATTCCCTGATTGACAGCTCAAGGGTCTGTGTTGTTCATGGAGAGCTG 1020
Lewis    GAAGGCCAGAAAGATTCCCTGATTGACAGCTCAAGGGTCTGTGTTGTTCATGGAGAGCTG 1020
          .....
          ↓
          K N N R G V K L E V F L F Q E V L V I T
DSS      AAAAATAACCGGGTGTGAAACTCCATGTTTTCTGTTCCAAGAAAGTGTGGTGATTACT 1080
Lewis    AAAAATAACCGGGTGTGAAACTCCATGTTTTCTGTTCCAAGAAAGTGTGGTGATTACT 1080
          .....
          R A V T H N E Q L C Y Q L Y R Q P I P V
DSS      CGAGCTGTCACGCACAATGAGCAACTCTGCTATCAGTTGTACCGGCAGCCCATCCCTGTG 1140
Lewis    CGAGCTGTCACGCACAATGAGCAACTCTGCTATCAGTTGTACCGGCAGCCCATCCCTGTG 1140
          .....
          K D L T L E D L Q D G E V R L G G S L R
DSS      AAGGACCTCACTCTGGGAGACCTGCAGGATGGAGAAGTGGCGCTGGGTGGCTCCCTGCCT 1200
Lewis    AAGGACCTCACTCTGGGAGACCTGCAGGATGGAGAAGTGGCGCTGGGTGGCTCCCTGCCT 1200
          .....
          ↓
          G A F S N N E R I K N F F R V S F K N G
DSS      GGGCCCTCAGCAACAATGAGAGAATTA AAAACTTCTTCAGAGTCAGTTTCAAGAACGGA 1260
Lewis    GGGCCCTCAGCAACAATGAGAGAATTA AAAACTTCTTCAGAGTCAGTTTCAAGAACGGA 1260
          .....
          S Q S Q T H S L Q A N D T F N K Q Q W L
DSS      TCCCAAAGTCAGACCCACTCACTGCAAGCCAACGACACCTTCAACAAACAACAGTGGCTC 1320
Lewis    TCCCAAAGTCAGACCCACTCACTGCAAGCCAACGACACCTTCAACAAACAACAGTGGCTC 1320
          .....
          N C I R Q A K E T V L S A A G Q A G L L
DSS      AACTGTATCCGTCAGGCCAAGAAACGGTTCTGTCTGCTGCCGGGCAGGCTGGCTTGCTT 1380
Lewis    AACTGTATCCGTCAGGCCAAGAAACGGTTCTGTCTGCTGCCGGGCAGGCTGGCTTGCTT 1380
          .....
          D S E S L S Q S P G T E N R E L R G E T
DSS      GACTCCGAGAGCCTGTCCAGAGTCTCTGGCACTGAGAACAGGGAGCTCGGGGAGAAACA 1440
Lewis    GACTCCGAGAGCCTGTCCAGAGTCTCTGGCACTGAGAACAGGGAGCTCGGGGAGAAACA 1440
          .....
          K L E Q M D Q S D S E S D C S M D T S E
DSS      AAACCTTGAGCAGATGGACCAATCGGACAGTGAGTCCGACTGCAGTATGGACACAAGCGAG 1500
Lewis    AAACCTTGAGCAGATGGACCAATCGGACAGTGAGTCCGACTGCAGTATGGACACAAGCGAG 1500
          .....
          V S L E C E R M E Q T D A S C A N S R P
DSS      GTCAGCCTCGAATGCGAGCGGATGGAACAGACAGACGCTTCTGTGCAAAACAGTAGGCC 1560
Lewis    GTCAGCCTCGAATGCGAGCGGATGGAACAGACAGACGCTTCTGTGCAAAACAGTAGGCC 1560
          .....
          E E N V -
DSS      GAGGAGAACGTCTGA 1575
Lewis    GAGGAGAACGTCTGA 1575
          .....

```

Footnote to Supplement S4 (IV-2): \* indicates nucleotide identity. The amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs and/or cDNAs from the lung of DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced. When a nucleotide difference was seen (indicated by shade), it was re-PCR'd and sequence-confirmed. ↓ marks the last nucleotide of each exon.

Supplement S5 (IV-2). Coding sequence alignment of coiled-coil domain containing 66 (Ccdc66) between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats

```

          ↓
M N L G D G L K L E T E L L D G K T K L
DSS ATGAACCTGGGAGATGGTTTAAAGCTTGAAACGGGAATTATTGGATGGAAAGACCAAGCTA 60
Lewis ATGAACCTGGGAGATGGTTTAAAGCTTGAAACGGGAATTATTGGATGGAAAGACCAAGCTA 60
*****

          ↓
          ↓
I L S P Y E H K S K V S V K M G N K I K
DSS ATACTGTCTCCGTATGAGCATAAATCAAAGTTTCTGTGAAGATGGGAAATAAGATCAAG 120
Lewis ATACTGTCTCCGTATGAGCATAAATCAAAGTTTCTGTGAAGATGGGAAATAAGATCAAG 120
*****

I A K Y S L R T K Q T G H T L K S T Q N
DSS ATTGCAAAATATTCTTTAAGAACAACAGACTGGACATACTTTAAAGTCAACACAAAAT 180
Lewis ATTGCAAAATATTCTTTAAGAACAACAGACTGGACATACTTTAAAGTCAACACAAAAT 180
*****

T Y I G S E N L S Q K K I S T S D T S Q
DSS ACTTACATTGGGAGTGAAMATCTTTCTCAAAGAAGATCTCTACTTCAGACACTTCACAA 240
Lewis ACTTACATTGGGAGTGAAMATCTTTCTCAAAGAAGATCTCTACTTCAGACACTTCACAA 240
*****

A K R E N S R L T F S S P S T D L C K Q
DSS GCAAAACGTGAAACAGTAGACTGACATTTTCTTCAACCCAGTACGGATTATGTAAGCAG 300
Lewis GCAAAACGTGAAACAGTAGACTGACATTTTCTTCAACCCAGTACGGATTATGTAAGCAG 300
*****

Y S E K D C L R V Q K E I S P T A S S I
DSS TATTCAGAAAAGACTGTCTCCGTGTTCAAAGGAGATTTCACCTACAGCCTCCAGTATA 360
Lewis TATTCAGAAAAGACTGTCTCCGTGTTCAAAGGAGATTTCACCTACAGCCTCCAGTATA 360
*****

R K T V N T S T D T D P A A K Q K P C R
DSS CGGAAGACTGTAACACCAGCACAGATACCGACCCAGCAGCTAAGCAGAAAGCCGTGCAGA 420
Lewis CGGAAGACTGTAACACCAGCACAGATACCGACCCAGCAGCTAAGCAGAAAGCCGTGCAGA 420
*****

K P T A A E G M G S G L V C L T Q D Q L
DSS AAGCCCACCGCAGCGGAAGGCATGGGCGAGCGGCTTGGTGTGTCTCACACAAGACCAGCTG 480
Lewis AAGCCCACCGCAGCGGAAGGCATGGGCGAGCGGCTTGGTGTGTCTCACACAAGACCAGCTG 480
*****

R Q I L M L S V N Q G N G S M S L P E N
DSS CGGCAGATCTTGATGCTCAGTGTGAACCCAGGGAAATGGATCCATGTCCCTCCCTGAGAAC 540
Lewis CGGCAGATCTTGATGCTCAGTGTGAACCCAGGGAAATGGATCCATGTCCCTCCCTGAGAAC 540
*****

          ↓
G E E V T S Q D S L H L I S I P S Q P K
DSS GGGGAGGAGGTAACAAGTCAAGATAGTTTACATTTAATCAGTATTCTAGTCAGCCAAAG 600
Lewis GGGGAGGAGGTAACAAGTCAAGATAGTTTACATTTAATCAGTATTCTAGTCAGCCAAAG 600
*****

E V S V T G L L Q K T E A V S P V A R E
DSS GAAGTGAGTGTACAGGATTACTGCAGAAAACGGAGGCCGTTTCCCCCGTCCGACGTGAA 660
Lewis GAAGTGAGTGTACAGGATTACTGCAGAAAACGGAGGCCGTTTCCCCCGTCCGACGTGAA 660
*****

          ↓
N E P V P Q R A Q A A S Q Q C E Q K A T
DSS AATGAGCCTGTCCCCCAGAGAGCTCAAGCGGCATCTCAGCAGTCCGAGCAGAAAGCCACC 720
Lewis AATGAGCCTGTCCCCCAGAGAGCTCAAGCGGCATCTCAGCAGTCCGAGCAGAAAGCCACC 720
*****

V E S E W K P A D I F S T L G E R E R D
DSS GTAGAGAGCGAATGGAAAACAGCCGACATATTCACTACTCTGGGGGAAAGGGAAACGTGAT 780
Lewis GTAGAGAGCGAATGGAAAACAGCCGACATATTCACTACTCTGGGGGAAAGGGAAACGTGAT 780
*****

          ↓
R S L L E A R R A Q W K K E L D E Q V A
DSS AGAAGTTTGTGGAAAGCAAGAAGAGGCCAGTGGAAAAAAGAGCTAGACGAACAGGTTGCT 840
Lewis AGAAGTTTGTGGAAAGCAAGAAGAGGCCAGTGGAAAAAAGAGCTAGACGAACAGGTTGCT 840
*****

L K K K E K E A S Q K N P D P W K P S E
DSS TTAAGAAGAAAGAAAAGAAGCTTCTCAAATAATGGCCTGATCCTTGGAAACCGTCTGAA 900
Lewis TTAAGAAGAAAGAAAAGAAGCTTCTCAAATAATGGCCTGATCCTTGGAAACCGTCTGAA 900
*****

```



```

          I L C E K L Q V L E R S K E A G L L E S
DSS      ATACTGTGTGAGAAGCTTCAGGTCCTTGAGCGATCTAAGGAAGCAGGGCTGTTGGAGTCC 960
Lewis    ATACTGTGTGAGAAGCTTCAGGTCCTTGAGCGATCTAAGGAAGCAGGGCTGTTGGAGTCC 960
          *
          P C I T V K Q E Q Q R K N I E E L N K Q
DSS      CCTTGCATCACTGTTAAACAGGAGCAGCAGAGAAAATGGATTGAAGAGTTGAATAAGCAA 1020
Lewis    CCTTGCATCACTGTTAAACAGGAGCAGCAGAGAAAATGGATTGAAGAGTTGAATAAGCAA 1020
          *
          V E D D Q Q R K A E E K L I Y S K G E E
DSS      GTAGAAGATGACCAAGAAAAGCAGAAAAGAAAAGTATATATTCAAAGGGTGAGGAG 1080
Lewis    GTAGAAGATGACCAAGAAAAGCAGAAAAGAAAAGTATATATTCAAAGGGTGAGGAG 1080
          *
          H D R W A V H F D S F K S H P G S Q S R
DSS      CATGACAGATGGCCAGTGCATTTTGATTCAATTCAGAGTCATCCTGGTTCAGTCTCGA 1140
Lewis    CATGACAGATGGCCAGTGCATTTTGATTCAATTCAGAGTCATCCTGGTTCAGTCTCGA 1140
          *
          L S S Q L T P Q H L E S L C V S P D T Q
DSS      CTGTCTCTCAGCTAACACCCCAACACCTGGAGTCACTCTGCGTGTCTCCCGATACTAG 1200
Lewis    CTGTCTCTCAGCTAACACCCCAACACCTGGAGTCACTCTGCGTGTCTCCCGATACTAG 1200
          *
          E L A D V S S V D T P P P A V Q V K P S
DSS      GAGCTGGCTGATGTTCAGCAGTGTGACACACCTCCACCTGCAGTCCAGGTGAAGCCTTCA 1260
Lewis    GAGCTGGCTGATGTTCAGCAGTGTGACACACCTCCACCTGCAGTCCAGGTGAAGCCTTCA 1260
          *
          E K E Q R R A R P V M D M S V S H G Q K T
DSS      GAGAAAGAACAANGAGCCAGGCCTGTATGGATATGTCTGTGTACACCGGTGAGAAAACA 1320
Lewis    GAGAAAGAACAANGAGCCAGGCCTGTATGGATATGTCTGTGTACACCGGTGAGAAAACA 1320
          *
          N F L R S M T A L L D P A Q I E E R E R
DSS      AACTTTCCTCCGTTTCGATGACTGCCTCTTAGATCCAGCACAGATTGAGGAGCGGGAAAAGA 1380
Lewis    AACTTTCCTCCGTTTCGATGACTGCCTCTTAGATCCAGCACAGATTGAGGAGCGGGAAAAGA 1380
          *
          R R Q K Q L E H Q K A I T A Q V E E N R
DSS      CGCCGACAAAACAACCTAGAACACCAGAAAGCAATCACGGCTCAGGTAGAAGAGAACCAGC 1440
Lewis    CGCCGACAAAACAACCTAGAACACCAGAAAGCAATCACGGCTCAGGTAGAAGAGAACCAGC 1440
          *
          R K K R L E E E Q R R K E E Q E E E L R
DSS      AGGAAGAAGCGGCTGGAGGAAGAACAGAGAAGGAAGGAGGAGCAGGAGGAGGAGCTGCGC 1500
Lewis    AGGAAGAAGCGGCTGGAGGAAGAACAGAGAAGGAAGGAGGAGCAGGAGGAGGAGCTGCGC 1500
          *
          L A R E R E E M Q R Q Y E E D I L K Q K
DSS      TTGGCAAGGGAGCGGGAGGAGATGCAGAGGCAGTACGAAGAGGACATTCTGAAGCAGAAA 1560
Lewis    TTGGCAAGGGAGCGGGAGGAGATGCAGAGGCAGTACGAAGAGGACATTCTGAAGCAGAAA 1560
          *
          H K E E I M T L K T N E L F H T M Q R A
DSS      CACAAAGAAGAAATCATGACTCTAAAGACAAATGAGCTCTTCCACACAATGCAGCGAGCG 1620
Lewis    CACAAAGAAGAAATCATGACTCTAAAGACAAATGAGCTCTTCCACACAATGCAGCGAGCG 1620
          *
          Q E L A Q R L K Q E Q R I R E L T Q K G
DSS      CAGGAGTTGGCACAGAGGCTCAAACAGGAGCAGAGGATCCGAGAAGTACTGACTCAGAAGGGG 1680
Lewis    CAGGAGTTGGCACAGAGGCTCAAACAGGAGCAGAGGATCCGAGAAGTACTGACTCAGAAGGGG 1680
          *
          H D T S R L I Q N L G V D A A H V D C K
DSS      CATGATACATCCAGGCTGATTCAAAATCTCGGTGTTGACCGCAGCACACGTGGACTGTAAG 1740
Lewis    CATGATACATCCAGGCTGATTCAAAATCTCGGTGTTGACCGCAGCACACGTGGACTGTAAG 1740
          *
          A S T P V S S S R D T E E A A N D T R A
DSS      GCATCCACTCCCGTCTCCAGTTCACGAGACACCGAGGAGGCTGCTAATGACACACGTGCA 1800
Lewis    GCATCCACTCCCGTCTCCAGTTCACGAGACACCGAGGAGGCTGCTAATGACACACGTGCA 1800
          *

```

```

          A A T S T A S P K K D T G V Q T D D V N
DSS      GCTGCCACTTCAACAGCCTCTCCCAAGAAGGACACTGGCGTGCAGACAGATGACGTAAC 1860
Lewis    GCTGCCACTTCAACAGCCTCTCCCAAGAAGGACACTGGCGTGCAGACAGATGACGTAAC 1860
          *
          L G I F N D G L P H C G S V T E W G V R
DSS      TTAGGAATTTTCAATGATGGGCTACCCACTGTGGGTCAGTAACAGAGTGGGGAGTCAGA 1920
Lewis    TTAGGAATTTTCAATGATGGGCTACCCACTGTGGGTCAGTAACAGAGTGGGGAGTCAGA 1920
          *
          N L S S P E I S A E F S G Q T G I R K E
DSS      AACCTTCTTCTCCAGAGATTCTGCAGAATTCAGTGGACAGACTGGCATTAGGAAAGAG 1980
Lewis    AACCTTCTTCTCCAGAGATTCTGCAGAATTCAGTGGACAGACTGGCATTAGGAAAGAG 1980
          *
          K Q E L S M D K G T H L D K E N S W Y N
DSS      AAACAGGAACCTAAGTATGGATAAAGGCACTCATTAGACAAAGAGAACAGCTGGTATAAC 2040
Lewis    AAACAGGAACCTAAGTATGGATAAAGGCACTCATTAGACAAAGAGAACAGCTGGTATAAC 2040
          *
          N R C T Q H R R T E K Q T K L V K K C P
DSS      AACCGGTGCACTCAGCATAGGAGAACAGAGAAACAACAAACTCGTGAAGAAATGTCCT 2100
Lewis    AACCGGTGCACTCAGCATAGGAGAACAGAGAAACAACAAACTCGTGAAGAAATGTCCT 2100
          *
          K K P A W N I N K P L K R Y V P A S A K
DSS      AAGAAGCCTGCCTGGAATATAAATAAGCCTCTCAAAAGGTATGTTCTGCATCAGCGAAG 2160
Lewis    AAGAAGCCTGCCTGGAATATAAATAAGCCTCTCAAAAGGTATGTTCTGCATCAGCGAAG 2160
          *
          Y P A H L Q K E K E E R K V R R Q M E L
DSS      TACCCTGCACATCTCCAGAAGGAGAAAGAGGAAAGAAAAGTAAGAAGGCAGATGGAGCTG 2220
Lewis    TACCCTGCACATCTCCAGAAGGAGAAAGAGGAAAGAAAAGTAAGAAGGCAGATGGAGCTG 2220
          *
          L H L V Q R N D P E T L S Q N N G A S P
DSS      CTTCACTTAGTGCAGAGAAACGATCCTGAGACTCTCTCCAAAACAACGGCGCTTCACCA 2280
Lewis    CTTCACTTAGTGCAGAGAAACGATCCTGAGACTCTCTCCAAAACAACGGCGCTTCACCA 2280
          *
          D I F V S S H R E A E S E M R L H L L K
DSS      GACATTTTGTTCATCTCACCAGAAAGCTGAGTCAGAAATGAGGTTGCATCTTCTCAA 2340
Lewis    GACATTTTGTTCATCTCACCAGAAAGCTGAGTCAGAAATGAGGTTGCATCTTCTCAA 2340
          *
          K C K A P L F Q C F R I H S N P N P C F
DSS      AAGTGTAAGCTCCTTTATTTTCAGTGTTCAGAAATCACAGTAACCCAAATCCTTGT 2400
Lewis    AAGTGTAAGCTCCTTTATTTTCAGTGTTCAGAAATCACAGTAACCCAAATCCTTGT 2400
          *
          Q K A M V H L K L V T E N M S E V R G R
DSS      CAGAAGGCCATGGTTCATCTAAAGTTGGTTACAGAAAATATGTCAGAGGTCAGAGGAAGA 2460
Lewis    CAGAAGGCCATGGTTCATCTAAAGTTGGTTACAGAAAATATGTCAGAGGTCAGAGGAAGA 2460
          *
          Q P C L L Y E L C A V A S C G L L Q K Q
DSS      CAGCCATGCTTGTGTATGAACGTGTGTGCTGTAGCCAGCTGTGGTCTTCTCCAGAAACA 2520
Lewis    CAGCCATGCTTGTGTATGAACGTGTGTGCTGTAGCCAGCTGTGGTCTTCTCCAGAAACA 2520
          *
          K E L E T N L I P L T A N Q E D N F S S
DSS      AAGAGTTGGAACGAATCTCATACCCCTTAAGTGCACAAACCAAGAAGATAATTTAGTTCT 2580
Lewis    AAGAGTTGGAACGAATCTCATACCCCTTAAGTGCACAAACCAAGAAGATAATTTAGTTCT 2580
          *
          S F -
DSS      TCGTTTTAA 2589
Lewis    TCGTTTTAA 2589
          *****

```

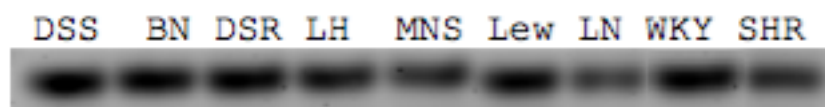
Footnote to Supplement S5 (IV-2): \* indicates nucleotide identity. The amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs and cDNA from thymus of DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced. ↓ marks the last nucleotide of each exon.

**Supplement S6 (IV-2). Survey of nucleotide variations in non-coding regions of the genes in genome block 1 in the *CI6QTL*-residing interval and their verifications by independent sequencings of PCR-amplified segments containing them.**

Genomic position	Gene Position	Our database		Public RGD database		Verification NE (Non Existent)
		DSS	Lewis	DSS	Lewis	
2 472 048	<i>Asb14</i> -5'UTR	c	t	c	cctttt	NE
2 489 878	<i>Asb14</i> -5'UTR	tg(n=24)	tg(n=22)	tg(n=24)	tg(n=22)	NE
2 489 911	<i>Asb14</i> -5'UTR	c	t			NE
2 490 521	<i>Asb14</i> -5'UTR	ca(n=10)	ca(n=11)			NE
2 505 527	<i>Asb14</i> -5'UTR	c	g			NE
2 506 511	<i>Asb14</i> -5'UTR	ct(n=24)	ct(n=23)			NE
2 507 573	<i>Asb14</i> -5'UTR	ctt	ct			NE
2 507 574	<i>Asb14</i> -5'UTR	tatca	t			NE
2 507 577	<i>Asb14</i> -5'UTR			ct(n=36)	c	NE
2 511 278	<i>Asb14</i> -5'UTR	ca(n=24)	ca(n=23)			NE
2 511 285	<i>Asb14</i> -5'UTR			del	ac	?
2 522 153	<i>Asb14</i> -intron 4	ga	gAa			NE
2 524 231	<i>Asb14</i> -intron 5	ct(n=24)	ct(n=45)			NE
2 560 571	<i>App1</i> -intron 10	ca(n=22)	ca(n=19)			NE
2 564 109	<i>App1</i> -intron 7	gc	g			NE
2 569 931	<i>App1</i> -intron			c	a(n=13)	NE
2 592 400	<i>App1</i> -intron 2	ag	a			NE
2 595 452	<i>App1</i> -3'UTR	t	c			NE
2 595 454	<i>App1</i> -3'UTR	ca(n=10)	ca(n=11)			NE
2 608 266	<i>Hesx1</i>	ct(n=24)	ct(n=23)	-		NE
2 648 114	<i>IL17rd</i> -intron 1	t	g			NE
2 651 967	<i>IL17rd</i> -intron 1	cgtagt	cgt			NE
2 654 461	<i>IL17rd</i> -intron 1	gc	g			NE
2 660 990	<i>IL17rd</i> -intron 1			caaa	c	?
2 669 730	<i>IL17rd</i> -intron 1	c	g			NE
2 669 915	<i>IL17rd</i> -intron 1	c	g			NE
2 674 130	<i>IL17rd</i> -intron			a	at	?
2 686 449	<i>IL17rd</i> -intron			c	cca	?
2 686 757	<i>IL17rd</i> -intron			at	a	?

Footnote to supplement IV-6: Genome block 1 is defined in Table 1. ? indicates its status not determined. *App1*, adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1; *Asb14*, ankyrin repeat and SOCS box-containing 14; *Hesx1*, HESX homeobox 1; *IL17rd*, interleukin 17 receptor. UTR, untranslated region.

**Supplement S7 (IV-2). Detection of the 3 base-pair deletion as a length polymorphism in *retinoblastoma-associated protein 140 (Rap140)/ family with sequence similarity 208 member A (Fam208a)*.** Primers used for PCR on genomic DNAs to detect the deletion are forward 5' ATGGCGACTGCTGCCGGAGACG 3' and reverse 5' GCTCCGCGGTGGAGAAGACGC 3'. BN, Brown Norway; DSR, Dahl salt-resistant rat; DSS, Dahl salt-sensitive rat; Lew, Lewis; LH, Lyon hypertensive rat; LN, Lyon normotensive rat; MNS, Milan normotensive rat; SHR, Spontaneously hypertensive rat; WKY, Wista Kyoto rat. The results are DSS=BN= DSR=LH=MNS >Lewis=LN=WKY=SHR.





**Supplement S8 (IV-2).** Nucleotide variations found in the 5'UTR and 3'UTR regions of genes in genome block 2 in the *C16QTL*-containing interval that are common between our data base and the public data base of total genome sequencing.

Gene	5'UTR		3'UTR	
	SNP Position in genome	Mutation detected Lewis/ DSS	SNP Position in genomic	Mutation detected Lewis/ DSS
<i>Arhgef3</i>			148	T/C
			198	G/A
			2034	T(n=10)/ T(n=11)
			2967	CA(n=28)/ CA(n=25)
			3022	GAGG/ del
	-910	CTGT/ del	3365	T/C
	-2564	A/G	3562	T(n=13)CT(n=12)/ T(n=15)
	-2640	GT(n=12)/ GT(n=25)	3905	A/T
			4408	CTT/C
			4585	A/G
<i>Fam208a/ Rap140</i>	-852	A/ C	21	A(n=11)/A(n=10)
	-2073	GTCT(n=5)/GTCT(n=6)	1021	AT(10),AT(8),AT(9)/AT(12)
	-3126	T/C	1362	T/ G
	-3441	T/G		
	-3609	del/ AGAGAGA		
	-3910	A(n=8)/ A(n=9)		
	-4219	A/C		
	-4289	T/C		
<i>Ccdc66</i>	-200	A/G	117	TA(10),TA(8),TA(9)/ TA(12)
	-412	G/C	1108	T(n=11)/ T(n=10)
	-417	A/C		
	-418	A/T		
	-2129	T/C		
	-2143	A/G		
	-2341	A/G		
	-2437	T/C		
	-2556	A/C		
	-2605	CA/C		
	-2852	T(n=12)/ T(n=13)		
	-3337	C/T		
	-3525	CAA/ del		
	-3660	T/C		
	-3721	T/C		
	-4007	C/T		
	-4034	C/T		
	-4345	A(n=8)/ A(n=7)		
	-4403	G/A		
	-4473	G/A		
-4685	C/T			
-4930	G/A			

Footnote to supplement S8 (IV-2): Gene locations on Chromosome 16 are indicated on the map in Figure 1 (IV-2). The position of a SNP in 5'UTR is referred to from the ATG initiation codon and that in 3'UTR from the stop codon of the gene (within 5Kb). Heterozygous mutations found in the public data base are not included. No mutations were found in 5'UTR or 3'UTR of the other genes contained in the block 1. *Arhgef*, Rho guanine nucleotide exchange factor (Gef) 3; *Ccdc66*, coiled-coil domain containing 66; *Fam208a/Rap140*, family with sequence similarity 208, member A.

**Supplement S9 (IV-2).** Comparisons of expressions for 3 genes in the *C16QTL* -lodging interval by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) in kidneys.

Genes	Mean R	Ratio of mean R DSS/ mean R C16S.L9	<i>p</i>	Primers
<i>Rap140/Fam208a</i>	4.21x10 <sup>-6</sup> ± 3.14x10 <sup>-6</sup> (DSS)/ 6.48x10 <sup>-6</sup> ± 4.82x10 <sup>-6</sup> (C16S.L9)	0.649	0.63	Fwd: 5'- AGCCCAGTGCTAGAGGTTGA -'3 Fwd: 5'- TCAATGGAAACAGTGGGACA -'3
<i>Ccdc66</i>	6.00x10 <sup>-8</sup> ± 9.00x10 <sup>-9</sup> (DSS)/ 8.40x10 <sup>-8</sup> ± 2.20x10 <sup>-9</sup> (C16S.L9)	0.714	0.83	Fwd: 5'- TCTCAAAAATGGCCTGATCC -'3 Fwd: 5'- ACAGTGATGCAAGGGGACTC-'3
<i>Arhgef3</i>	3.81x10 <sup>-2</sup> ± 3.61x10 <sup>-3</sup> (DSS)/ 4.65x10 <sup>-2</sup> ± 3.61x10 <sup>-3</sup> (C16S.L9)	0.819	0.62	Fwd: 5'- GTCAGTCAGGTGCTCACAGC -'3 Fwd: 5'- GAGTTTCAGCATGGGGTCAT -'3

Footnote to Supplement S9 (IV-2): R represents the ratio of the expression of the gene target relative to that of the *Gapdh* reference. R is the average value of triplicates from 1 rat. Mean R is the average value of R from 3 rats of the same strain. DSS, Dahl salt-sensitive rats. C16S.L9 is a congenic strain. ± refers to SEM. *P*, *t*-test. Kidney RNA samples were treated with DNase before qRT-PCR. ***Arhgef3***, *Rho* guanine nucleotide exchange factor (*GEF*) 3; ***Ccdc66***, coiled-coil domain containing 66; ***Rap140***, retinoblastoma-associated protein 140/ family with sequence similarity 208, member A (***Fam208a***).

## **CHAPITRE V**

## **DISCUSSION**

## V-1 Révélations majeures

Les révélations majeures issues de l'ensemble de ces données sont que les 28 QTLs impliqués dans l'HTA que nous avons découverts sont organisés en trois modules épistatiques vis à vis du type d'interaction, additivité ou épistasie, qu'ils entretiennent entre eux. Ainsi, un nouveau concept génétique à l'origine de la régulation de la PA émerge: la modularisation des QTLs. Les EM1 et EM2 représentent les unités fonctionnelles principales via lesquelles les QTLs exercent leurs effets. Une hiérarchie régissant l'ordre d'action de ces QTLs au sein des modules épistatiques existe expliquant le mode de fonctionnement de ces derniers pour mener au développement de l'HTA chez le modèle de rat SS/Jr. L'identification de gènes candidats pour ces QTLs nous permettrait d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires régulant la PA. Dans ce contexte, l'identification du gène *Rap140/Fam208a* (contenu dans EM1) comme gène candidat pour un QTL situé sur le chromosome 16 et son action probable sur *Slc7a12*, qui pourrait jouer un rôle direct sur la PA, nous permet de dévoiler une partie de la cascade régulatrice représentée par EM1 et ainsi de comprendre davantage l'architecture génétique complexe gouvernant l'homéostasie de la PA.

## V-2 L'héritabilité manquante

Les études de GWAS n'ont détecté jusqu'à présent que le quart, soit 28 des 116 QTLs environ qui sont sensés exister chez l'humain selon une estimation du *International Consortium for Blood Pressure* (ICBP, 2011). L'ensemble de ces QTLs représente moins de 3% de la variance de la PA dans la population (Deng, A. Y., 2015, Krzesinski J-M. *et al*, 2012). À quoi attribuer alors l'héritabilité manquante? Plusieurs postulats concernant cette dernière ont été émis.

Selon E.E.Eichler, l'héritabilité manquante impliquerait les rares et larges variants telles que les duplications, délétions, inversions qu'on a encore du mal à apprivoiser et qui seraient sous pression de la sélection et affecteraient la transcription de certains gènes.

Les polymorphismes de duplications ou variations du nombre de copies (*Copy Number Variation*, CNV ou *Copy Number Polymorphism*, CNP) joueraient un rôle encore sous-estimé dans ce phénomène dû à leur nature répétitive qui les rend moins accessibles aux technologies de génomiques et génétiques modernes. Ces CNVs correspondent à des segments d'ADN de plus d'un Kb dont le nombre de copies varie d'un individu à l'autre (insertions, délétions, duplications). Il s'agit de marqueurs génétiques pouvant également servir dans l'étude des traits complexes qui ont souvent été associés, entre autres, avec l'interaction environnementale. Ces derniers seraient sujets à l'évolution rapide et adaptative chez l'Homme et le singe (Eichler E.E. *et al*, 2010).

D'autres postulent que l'environnement jouerait un rôle plus important que l'on imagine or il est difficile de quantifier la composante environnementale dans les traits complexes, d'autant plus que celle-ci diffère d'un individu à l'autre. Pourtant, il semble que cette dernière jouerait un rôle prépondérant dans le développement de l'HTA et que les interactions entre les gènes et l'environnement ne peuvent pas être laissées pour compte dans l'étude de cette pathologie. Pour G. Gibson, l'influence de l'environnement sur le transcriptome et le métabolome serait la majeure cause d'héritabilité manquante (Eichler E.E. *et al*, 2010, Ehret G.B. *et al*, 2010, Nemos C. *et al*, 2008).

A. Kong explique ce phénomène par l'origine parentale de l'allèle transmise. En effet, des variants ont été associés à un risque dans certains types de cancers et dans les diabètes de type I et II uniquement lorsqu'ils sont hérités d'un parent spécifique. Ces variants, plus difficiles à découvrir, peuvent être sous-estimés dans les modèles ne prenant pas en compte l'origine parentale (Kong A. *et al*, 2009, Eichler E.E. *et al*, 2010).

L'épigénétique, qui passe par l'empreinte parentale, doit vraisemblablement agir sur le déterminisme génétique des maladies complexes via méthylation de l'ADN et modifications des histones. Ces modifications, transmises de génération en génération, expliqueraient la façon dont l'environnement et le vieillissement agissent sur la PA (Eichler E.E. *et al*, 2010, Krzesinski J-M. *et al*, 2012).

Enfin J.H. Moore suggère que la découverte de variants modifiant l'expression des micro-ARNs non codants, procurant un nouveau mécanisme de régulation traductionnelle ajoute une épaisseur de complexité à l'architecture des traits (déjà) complexes. Des interactions entre variants dans les séquences qui régulent l'expression des micro ARNs et les ARNm pourraient avoir un impact important sur l'expression protéique (Krzesinski J-M. *et al*, 2012, Eichler E.E. *et al.*, 2010).

De plus, d'autres types d'interactions biomoléculaires qui dépendent de variations génétiques multiples pourraient venir complexifier la relation entre le génotype et le phénotype. La théorie de l'additivité des effets génétiques d'une multitude de variants ne permet alors plus d'expliquer les variations phénotypiques. Ainsi, la croyance empirique selon laquelle l'héritabilité manquante reflète la variance due à des variants encore inconnue n'est plus justifiée. Ceci est en accord avec les résultats obtenus jusqu'à présent avec les GWAS (Eichler E. E. *et al*, 2010).

Ce concept d'interactions ne date pas d'hier, Bateson, en 1909, est le premier à avoir introduit le concept d'épistasie qu'il décrit comme une interaction intergénique où un gène vient masquer/inhiber les effets d'un autre gène. Cette définition s'est vue par la suite élargie avec la complexité des réseaux génétiques et des systèmes biologiques. Ainsi, selon ce raisonnement, l'héritabilité manquante ne serait pas due à l'existence d'autres variants communs ni d'autres variants plus rares, mais serait plutôt issue de rares combinaisons/interactions de variants communs (Eichler E. E. *et al*, 2010).

Résoudre le problème de l'héritabilité ne peut pas reposer uniquement sur les technologies à haut débit, ni sur des techniques statistiques et informatiques de pointe mais nécessite une nouvelle façon d'appréhender l'architecture génétique complexe (Eichler E. E. *et al*, 2010). D'où l'importance de nos travaux présentés ci-dessus.

## **V-3. Des avancées dans l'architecture génétique régissant la régulation de la PA**

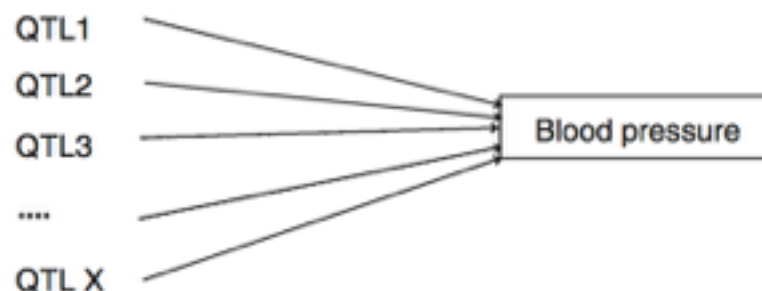
L'article « *Modularization and epistatic hierarchy determine homeostatic actions of multiple blood pressure quantitative trait loci* », publié en 2013, nous a permis de déterminer une modularisation des QTLs impliqués dans les variations de la PA en fonction de leurs relations épistatiques *versus* additives via la création de doubles souches congéniques de rats. Ce nouveau paradigme du déterminisme génétique de l'HTA essentielle vient s'ajouter et compléter ainsi la théorie de l'additivité précédemment émise. Cette modularisation sous tend l'existence de voies/cascades partagées par plusieurs QTLs qui mènent ainsi synergiquement au maintien d'une PA normale ou au développement de l'HTA lorsque des mutations habitent ces QTLs. De ce nouveau concept émerge la mise en place d'une hiérarchie génétique régissant l'organisation et le fonctionnement de ces QTLs entre eux pour assurer l'homéostasie de la PA.

### **V-3.1. Évidence épistatique versus théorie de l'additivité**

Jusqu'à récemment, la doctrine admise concernant l'origine polygénique de l'HTA était basée sur l'accumulation de plusieurs QTLs ayant chacun un effet minime sur le phénotype final. Dans ce contexte, chaque QTL agirait en parallèle sur la PA et un ensemble de nombreux



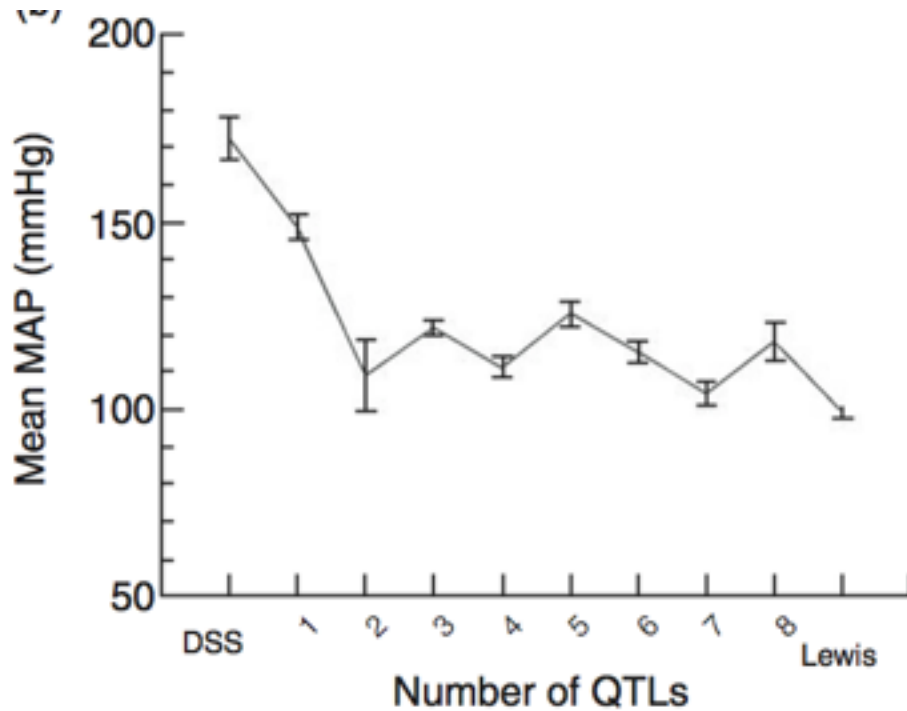
QTLs montreraient une corrélation linéaire (**Figure 10**). L'accumulation d'une multitude de QTLs permettrait de franchir un seuil menant au développement de l'HTA.



**Figure 10: Schéma représentant les effets parallèles des QTLs qui ensemble mèneraient au développement de l'HTA**  
(extrait de Deng A.Y., 2015).

Or, la somme des effets sur la PA de l'ensemble des QTLs que notre équipe a trouvés chez le rat jusqu'à présent est équivalente à 468 mm Hg. Cette dernière surpasse de beaucoup la PA observée chez la souche hypertendue SS/Jr qui est de 177 mm Hg. Ce fait vient alors réfuter, du moins en partie, l'hypothèse de l'additivité des QTLs.

Afin de déterminer le mécanisme selon lequel les QTLs agissent ensemble pour réguler l'homéostasie de la PA, nous avons donc adopté la stratégie des doubles congéniques. De cette façon, il est possible de comparer l'effet des allèles LEW qui diminuent la PA dans le fond génétique SS/Jr en ajoutant plusieurs QTLs, un à la fois (**Figure 11**).



**Figure 11 : Graphe montrant la corrélation non linéaire entre le nombre de QTLs contenus par souches doubles ou multiples congéniques et l'effet sur la PA.**

Les souches parentales SS/Jr et LEW représentent les références en terme de valeur de PA et se situent aux deux extrêmes de l'axe des abscisses. Celles-ci présentent une pression artérielle moyenne (MAP), indiquée en coordonnées, d'environ 175 et 100 mm Hg, respectivement. Les chiffres en abscisses (1 à 8) correspondent aux nombre de QTLs dont les allèles SS/Jr ont été substitués par celles de LEW diminuant la PA (extraite de Deng AY., 2015).

La **figure 11**, basée sur des données expérimentales démontre l'existence d'un effet plafond. Nos résultats ont indiqué que la combinaison des C10QTL1 et C10QTL2 montre un effet additif sur la PA, en accord avec l'hypothèse d'additivité des QTLs. Cela dit, au-delà de deux QTLs combinés, nous n'observons pas de diminution accentuée de la PA, comme si un seuil était atteint avec deux QTLs. Cette absence de colinéarité indiquent que les QTLs n'agissent pas uniquement entre eux de façon additive mais qu'ils interagissent selon une voie plus complexe.

## V-3.2 Le concept d'épistasie

Le nombre élevé de *Loci* de susceptibilité, une pénétrance incomplète et l'influence environnementale sont autant de facteurs limitants dans l'identification de QTLs impliqués dans la régulation des traits complexes. L'existence d'interactions épistatiques entre deux loci vient alors accroître la sophistication du mécanisme à l'origine de l'homéostasie de la PA (Cordell H. J., *et al*, 2002).

### V-3.2.1 Définitions

L'épistasie (du grec qui signifie « blocage ») est un concept empirique définie pour la première fois, en génétique mendélienne, par Bateson, en 1909, et se réfère au phénomène selon lequel les allèles d'un gène masquent les effets phénotypiques des allèles d'un autre gène, pouvant être comparé à la notion de dominance entre les allèles d'un même gène (Bateson W., 1909). Cependant, ce terme s'est vu attribuer différentes définitions souvent plus élargies au cours du temps pouvant créer la confusion dans la communauté scientifique. Fisher en 1918 utilisa un dérivé du terme: « *epistacy* » pour désigner toute déviation statistique des effets phénotypiques de deux loci par rapport au dogme de l'additivité (Fisher R.A., 1918, Phillips P.C., 2008, Cordell, H. J., *et al*, 2002). Cependant la définition de Fisher s'est vue attribuée le terme d'épistasie et est notamment utilisée en génétique des populations. Étant donné le caractère mendélien des QTLs, nous nous sommes fondés ici sur la définition originale de Bateson pour réaliser nos travaux sur les interactions épistatiques. Or, il est important de noter que l'épistasie observée lors de la ségrégation issue d'un croisement spécifique (plantes, animaux) ne se retrouvera pas forcément au sens statistique et la réciproque est également vraie: l'absence de détection d'épistasie au sens statistique ne signifie pas qu'il n'existe pas d'interaction entre loci au sens génétique strict (Phillips P.C., 2008).

### V-3.2.2 Impact fonctionnel *versus* statistique des QTLs

Il est important de préciser ici que nos résultats reposent sur une interprétation biologique des QTLs, soit sur leur impact fonctionnel auquel s'oppose une interprétation statistique. En effet, des travaux ont démontré qu'en termes statistiques, un QTL peut être interprété en pourcentage de la variance totale de PA dans la population hétérogène étudiée. L'épistasie statistique correspond alors à la variance de l'interaction qui résulte de la combinaison de QTLs et qui n'est pas équivalente au cumul de leur effets indépendants (Wei W.-H. *et al*, 2014). Cependant cette valeur ne peut pas prédire l'impact fonctionnel réel d'un QTL sur la PA, qui ne peut être mis en évidence au niveau biologique que lorsque le QTL est isolé dans un fond génétique homogène. L'épistasie fonctionnelle ou plus spécifiquement compositionnelle se réfère à l'observation de l'effet d'un variant spécifique qui dépend du génotype d'un autre variant, elle mesure les effets de substitution allélique dans un fond génétique spécifique, fixé, là où l'épistasie statistique mesure l'effet moyen de la substitution allélique dans le fond génétique moyen de la population (Wei W.-H. *et al*, 2014, Phillips, P.C., 2008). Ainsi l'effet fonctionnel d'un QTL individuel est souvent sous-estimé par la valeur du pourcentage de la variance totale de celui-ci. Par exemple, C16QTL est responsable de 6,7% de la variance statistique totale, or ce dernier est capable de faire varier la PA de 33% vis à vis de la différence phénotypique entre les souches parentales SS/Jr et LEW (Deng AY., 2015).

L'hétérogénéité génétique de la population humaine peut expliquer l'absence de détection de QTLs ayant des effets majeurs sur le phénotype, comme nous l'avons mis en évidence avec nos données expérimentales. En effet, dans un fond génétique hétérogène (génération F2, non congénique), C8QTL1 montrait un effet mineur (7.5%) contrairement aux souches congéniques homogènes (48%) (Deng AY., 2015).

Si les études d'association chez l'humain ont mis en évidence des interactions épistatiques statistiques entre QTLs impliqués dans les traits complexes, nous avons fourni la preuve fonctionnelle de l'existence de cette épistasie. Ces études fonctionnelles nous ont d'ailleurs mené à démêler l'organisation architecturale des QTLs impliqués dans la régulation de la PA.

### V-3.2.3 Méthodes d'étude de l'épistasie

La première démonstration d'une telle interaction épistatique entre les QTLs influençant la PA vint d'une analyse statistique réalisée à partir d'analyse de liaison dans une population F2 (non congénique) issue du croisement entre SS/Jr et MNS, chez laquelle les allèles normotendus codant pour l'*Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)* semblaient inhiber celles codant pour le *Natriuretic peptide receptor 1 (Npr1)* (Deng Y. et al, 1992 et 2007 (c)). Depuis, des modèles mathématiques sophistiqués et des outils statistiques ont été utilisés pour analyser les interactions épistatiques dans plusieurs traits complexes. Ces méthodes varient en fonction qu'il s'agisse d'études d'association ou d'analyses de liaison et peuvent ainsi être réalisées chez l'Homme (Flint J. et al, 2005, Cordell, H. J. et al, 2002). Cependant, l'analyse moléculaire fonctionnelle plutôt que statistique semble plus appropriée pour déterminer la vraie nature biologique de ces interactions (Cordell, H. J., et al, 2002).

Ainsi, la première preuve fonctionnelle d'épistasie entre les QTLs impliqués dans la PA a été obtenue grâce à la création de doubles congéniques. Basée sur la définition de Bateson: si l'effet de deux QTLs combinés est moindre que l'effet prédit par l'addition de ces QTLs, alors les deux QTLs interagissent épistatiquement entre eux (Rapp JP. et al, 1998). Via cette méthode, *Ace* fut réfuté comme gène candidat malgré la forte évidence statistique des résultats précédents, présentant alors l'interaction épistatique entre *Ace* et *Npr1* comme un artéfact (Deng AY., 2007).

### V-3.2.4 Interprétation de l'épistasie

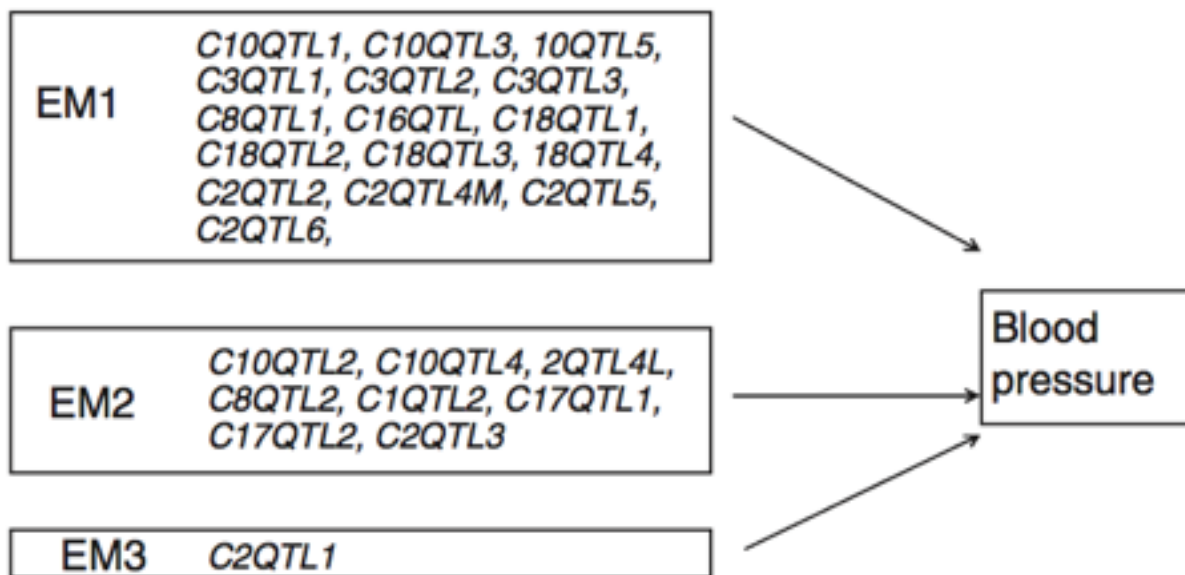
Lorsque des interactions épistatiques sont identifiées entre deux QTLs, cela indique que ces derniers participent à la même cascade de signalisation impliquée dans le phénotype en question. Ainsi, des gènes qui jusqu'à présent n'étaient pas connus pour leurs rôles dans la régulation de la PA, apparaissent comme des candidats potentiels puisqu'ils exercent un effet sur un autre gène connu pour être impliqué dans l'HTA ou bien parce qu'ils subissent l'action de ce gène. Les protéines codées par ces gènes interagissent alors dans une même voie

biologique (Rapp JP. *et al*, 1998, Cordell, H. J., *et al*, 2002). Cela dit, la création de souches congéniques et doubles congéniques permet de lever le jour sur des éléments génétiques qu'ils soient indifféremment connus ou inconnus pour leur rôle dans la PA et impliqués dans une même voie menant à la régulation de la PA.

Finalement, nous avons montré expérimentalement ici que l'épistasie est le mécanisme indispensable sur lequel s'érige la modularisation des QTLs.

## V-4. La modularisation épistatique des QTLs

Basées sur ces relations épistatiques *versus* additives entre les QTLs impliqués dans l'HTA découverts jusqu'à présent chez les rats SS/Jr, nous avons catégorisé les QTLs en blocs/modules épistatiques (EMs) où les QTLs appartenant à un même EM sont épistatiques entre eux et participent à la même voie/cascade de régulation de la PA. Les QTLs d'un EM agissent de façon additive avec les QTLs d'un autre EM et correspondent à deux voies différentes qui régulent en parallèle la PA (**Figure 12**).

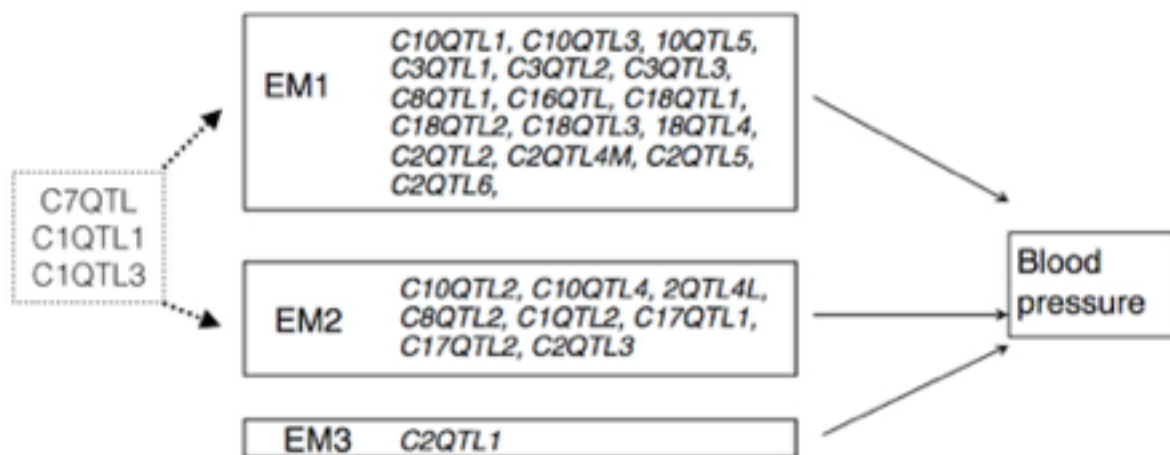


**Figure 12: Modularisation des QTLs influençant la PA en blocs épistatiques**

(extraite de Deng AY., 2015).

La **figure 12** résume la modularisation de 25 QTLs en EMs, basée sur leur interactions ou manque d'interactions épistatiques. Trois modules: EM1, EM2 et EM3 regroupant 16, 8 et 1 QTLs, respectivement, déterminent trois voies de régulation qui mènent parallèlement à l'homéostasie de la PA, ou, lorsque ces cascades sont affectées, au développement de l'HTA. Ces résultats venant contredire la simple théorie de l'additivité des QTLs.

Il est intéressant de préciser ici que C2QTL1 possède des effets additifs à la fois avec les QTLs appartenant au EM1 et à ceux appartenant au EM2. Pour cette raison il a été classé dans un troisième EM, le EM3. Quant aux C7QTL, C1QTL1 et C1QTL3, ces derniers entretiennent des relations épistatiques à la fois avec les QTLs appartenant au EM1 et à ceux appartenant au EM2, suggérant que ces 3 QTLs auraient des effets pléiotropiques, soient ayant différents effets phénotypiques, agissant dans deux voies de régulation à la fois. Ne présentant pas d'effet additif avec les autres QTLs, ils pourraient appartenir soit à EM1, soit à EM2 (**Figure 13**).



**Figure 13: Schéma des effets pléiotropiques (en pointillés) des C7QTL, C1QTL1 et C1QTL3 (extraite et modifiée de Deng AY., 2015).**

## V-4.1 Interprétation de la modularisation des QTLs

Ainsi, la modularisation épistatique explique le manque de linéarité observée dans la corrélation génétique montré dans la **figure 11**. Un EM correspondant à une voie de régulation, tous les QTLs du EM participent au même phénotype final via une suite d'interactions entre eux. Ainsi les effets de plusieurs QTLs appartenant au même EM ne peuvent pas excéder ceux d'un seul QTL, compromettant ici la théorie de l'additivité des QTLs. D'où l'existence d'un seuil à l'origine de la redondance de l'effet des QTLs. Ce fait est également illustré par l'effet individuel des 28 QTLs que nous avons découverts chez SS/Jr qui représente au moins 30% de la différence de PA observée entre SS/Jr et LEW. L'épistasie constitue donc un élément fondamentale, expliquant le rôle joué par les autres QTLs dont l'impact sur la PA est moins important et la modularisation, outre expliquer la redondance de l'effet des QTLs, permet de déterminer combien de QTLs fonctionnent ensemble dans une même voie régulatrice.

Le dogme de l'additivité s'applique alors entre différents modules épistatiques puisque plusieurs EMs/voies de régulation agiraient en parallèle pour mener au phénotype final.

## V-4.2 L'aspect novateur de nos travaux

Depuis plus de 20 ans, les études menant à la découverte de nombreux QTLs pour la pression artérielle se sont succédées. Celles-ci comptent en grande partie les travaux des laboratoires des Drs Rapp J.R. et Deng A.Y mais également d'autres équipes telles que celles de Samani N.J ayant identifié deux QTLs sur le chromosome 1 de parts et d'autres du locus Sa, gène candidat pour l'HTA, par exemple (Frantz S. *et al.*, 2001), de Joe B. qui ont démontré la présence d'un QTL sur le chromosome 10 pour lequel trois gènes seraient potentiellement candidats d'après des analyses d'expression et de séquençage (Saad.Y. *et al.*, 2007) et les membres du laboratoire de Cicila G.T. qui ont découvert deux QTLs sur le chromosome 3 d'environ 1 Mb chacun (Lee *et al.*, 2006). L'équipe de Roman R.J. a quand à elle montré que le



transfert des allèles SR/Jr du gène de la rénine dans la souche SS/Jr via réalisation de congéniques entraîne l'augmentation de l'activité de rénine plasmatique ainsi que la sévérité de l'hypertension et des atteintes rénales (Jiang J. *et al.*, 1997).

En ce qui concerne les études d'épistasie, Rapp J.R. a mis en évidence l'existence d'une interaction entre deux QTLs pour la PA situés sur le chromosome 5 murin. La présence des allèles Lewis pour ces deux QTLs est indispensable pour faire diminuer la PA de la souche congénique par rapport à la souche parentale SS/Jr (Garrett M.R. *et al.*, 2002). L'équipe de Saruta T. a également utilisé l'épistasie statistique déterminée par analyse de liaison pour cartographier des QTLs à proximité du gène Sa sur le chromosome 1 des rats SHR (Ohno Y. *et al.*, 2000). Monti J. *et al.*, via la réalisation de doubles congéniques ont montré qu'il existe une interaction entre un QTL pour la PAS sur le chromosome 1 et un sur le chromosome 10, en utilisant cette fois le modèle normotendu WKY (Monti J. *et al.*, 2003).

Plus récemment, selon le même principe, utilisant également les souches SS/Jr et Lewis, Bina J. *et al.*, ont démontré l'existence de relations épistatiques entre deux *loci* comprenant chacun de nombreux variants génétiques, situés sur le chromosome 5 du rat (Pillai R. *et al.*, 2013). D'autres travaux ont montré une action synergique entre des QTLs situés sur les chromosomes 2 et 3 de souches congéniques issues de croisement entre SHRSP et WKY. Cette interaction menant à une réduction significative des PAS, PAD et PP au même niveau que les rats normotendus WKY, contrairement aux QTLs isolés dans les simples congéniques (Koh-Tan, H. H. C. *et al.*, 2013). Van Dijk S. J. *et al.* ont utilisé la technique de double congénique pour apporter la preuve fonctionnelle d'une interaction entre deux QTLs impliqués dans les dommages rénaux dus à l'HTA chez le modèle FHH (Van Dijk S. J. *et al.*, 2006 et 2005). On pourrait en citer ainsi beaucoup d'autres. De même, des couples de variants chez certaines populations humaines sont associés avec un risque d'HTA accru, démontrant l'évidence de relations épistatiques statistiques entre loci pour la PA (Ndiaye N. C. *et al.*, 2013, Kumar R. *et al.*, 2012).

Nos travaux, comparés à ceux des autres chercheurs, présentent donc l'originalité de regrouper l'ensemble conséquent de QTLs que nous avons découvert en voies régulatrices/

modules épistatiques. Cette modularisation des QTLs de la PA est un concept novateur permettant d'approfondir notre compréhension de la régulation fonctionnelle de la PA.

Outre l'effet redondant des QTLs expliqué par cette modularisation, nous avons vu que la souche hypertendue, de même que celle normotendue possèdent chacune des QTLs capables de faire augmenter la PA ainsi que des QTLs faisant diminuer la PA. Or, l'existence de phénotypes opposés entre QTLs épistatiques nous a permis de déterminer l'ordre hiérarchique selon lequel ces QTLs agissent dans une cascade régulatrice pour mener à la régulation de la PA chez notre modèle.

## **V-5. Hiérarchie génétique**

### **V-5.1. Le pouvoir de nos données expérimentales**

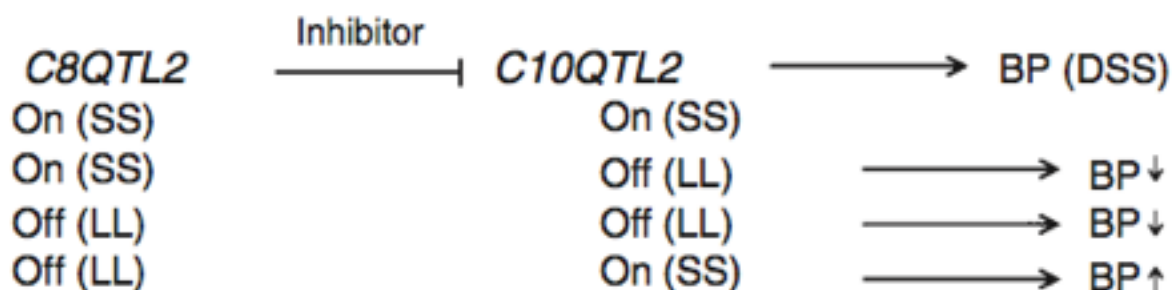
Nos données nous ont mené à identifier plusieurs QTLs possédant des mutations entre les souches hypertendues et normotendues qui seraient chacune en partie responsable du phénotype d'HTA chez SS/Jr. Ces QTLs fonctionnant via une même voie de régulation au sein d'un même EM, il est alors légitime de se demander dans quel ordre agissent ces gènes, lequel agit en amont et lequel agit en aval de la cascade?

Les résultats d'épistasie constituent alors un outil puissant permettant d'ériger une hiérarchie génétique entre les QTLs d'une voie de régulation, et ceci sans connaissances requises sur la totalité des gènes qui constituent la cascade en question, ni sur l'identité de leurs produits. Il est toutefois important de noter qu'afin qu'une hiérarchie puisse être établit entre deux QTLs, ces derniers doivent présenter des effets inverses sur la PA.

Ceci étant dit, considérant deux QTLs dont les effets sur la PA sont opposés, soit l'un augmentant la PA (« + QTL ») et l'autre la diminuant (« - QTL »). Une relation hiérarchique peut alors être établie entre ces QTLs. En effet, si la double congénique montre des effets

semblables à la souche contenant le « - QTL » seul, alors « - QTL » est épistatique à « + QTL » et « - QTL » occupe une position supérieure dans la hiérarchie génétique puisqu'il inhibe les effet de « + QTL ». Soit « - QTL > + QTL ». De cette façon il est possible d'analyser les effets épistatiques entre paires de QTLs contenus dans une cascade et ainsi déterminer l'ordre d'action des gènes.

D'après nos résultats (**Figure 1-f (IV-1) page 95**), le C10QTL2 (- QTL) contenu dans EM2, serait hiérarchiquement supérieur à C8QTL2 (+ QTL) car l'effet du premier masque l'effet du second. Ainsi C10QTL2 > C8QTL2. Les allèles normotendus de ces deux QTLs présentant des effets opposés, diminuant la PA versus augmentant la PA, respectivement, nous permettent de dévoiler leur ordre hiérarchique de régulation (**Figure 14**).



**Figure 14: Ordre hiérarchique entre C8QTL2 et C10QTL2 dans une cascade de régulation, déterminée par leurs effets sur la PA et leur interaction épistatique**

(voir explication ci-dessous)(extraite de Deng AY., 2015).

Dans la **figure 14**, le phénotype de SS/Jr étant le point de référence auquel toutes les souches congéniques sont comparées, nous avons défini SS/Jr comme le phénotype sauvage dont le génotype « SS » est l'état « marche » ou « on ». Les rats congéniques chez lesquels des allèles LEW ont été introduits dans le génome de SS/Jr sont alors considérés comme les phénotypes mutants et leurs génotypes « LL » est l'état « arrêt » ou « off ».

Lorsque seul C10QTL2 est « *off* », comme c'est le cas dans la souche congénique C10S.L16, la PA diminue (représentée par une flèche qui pointe vers le bas sur la **figure 14**) par rapport à celle de SS/Jr, ce qui signifie que les allèles « *SS, on* » du C10QTL2 sont requises pour faire augmenter la PA. Or, la PA de SS/Jr est maintenue comme le phénotype sauvage lorsque les deux QTLs sont « *SS, on* » car lorsque C8QTL2 est « *on, SS* », il agit comme régulateur négatif en amont de C10QTL2, inhibant ainsi la hausse de PA.

Lorsque seul C8QTL2 est « *off, LL* », comme dans la congénique C8S.L2, son effet inhibiteur sur C10QTL2 est levé, entraînant la hausse de la PA au-dessus de celle de SS/Jr (flèche pointant vers le haut).

Considérons désormais que C10QTL2 et son inhibiteur C8QTL2 sont « *off, LL* », comme dans la double congénique C10S.L16/C8S.L2, la PA diminue alors au même niveau que le mutant C10QTL2, comme si C10QTL2 seul est « *LL, off* » (**Figure 1-f (IV-1) page 95**). En effet, lorsque C10QTL2 est « *LL, off* », le facteur nécessaire pour faire augmenter la PA est « *LL, off* », que son inhibiteur soit « *on* » ou « *off* ».

Cet ordre de régulation est le seul plausible d'après les données expérimentales obtenues. L'ordre inverse de régulation selon lequel C10QTL2 serait en amont de C8QTL2 ne peut pas exister ici car ce n'est pas consistant avec le fait que C10QTL2 soit épistatique à C8QTL2. De plus, dans ce cas, le double mutant devrait avoir le même phénotype que C8QTL2 seul, contrairement à la réalité qui montre le même phénotype que C10QTL2 seul.

Un autre scénario selon lequel C8QTL2 agirait comme un stimulateur et non un inhibiteur n'est pas non plus consistant avec l'effet du C10QTL2 « *SS, on* » qui augmente la PA puisque lorsque C8QTL2 est « *LL, off* », en tant que stimulateur, la PA devrait diminuer ou du moins rester la même. Or, les résultats expérimentaux indiquent l'inverse de cette prédiction: la PA augmente au-dessus de celle de SS/Jr dans la souche C8S.L2 (**Tableau I (IV-1) page 93**).

De plus, ces données épistatiques entre QTLs réfutent l'hypothèse d'une interaction inter-protéiques via contact direct qui suggère une relation d'égalité entre les deux QTLs, ce qui est en désaccord avec la relation épistatique observée.

La révélation génétique de la voie régulatrice existante entre C10QTL2 et C8QTL2 permet d'expliquer pourquoi des allèles qui diminuent la PA existent chez les rats hypertendus SS/Jr. La théorie de l'additivité stipule que plusieurs QTLs agissent directement et de façon parallèle pour mener au développement de l'HTA, suggérant qu'un nombre plus élevé d'allèles qui augmentent la PA contrebalance le nombre de QTLs qui la diminuent chez les rats SS/Jr. Ainsi un seuil serait franchit par accumulation de QTLs qui augmentent la PA menant à L'HTA (**Figure 9**). Or, nous avons démontré ici que ce scénario ne peut pas être le seul à envisager. Grâce à l'épistasie, il est alors possible d'établir la vraie relation fonctionnelle entre C8QTL2 et C10QTL2. C10QTL2 étant épistatique à C8QTL2, ce dernier inhibe l'effet de C10QTL2 au sein de la même voie de régulation.

De la même façon, nous avons déterminé une hiérarchie épistatique similaire entre C2QTL4L et C10QTL2 dans le EM2 et entre C3QTL2 et C3QTL1 dans EM1 (**Figure 14**).

## **V-5.2. Signification de la hiérarchie génétique et facteurs limitants**

Cet ordre régulateur décrit ci-dessus a d'ailleurs été présenté précédemment dans la littérature. La détermination du sexe chez la drosophile impliquant les gènes *Transformer* et *doublesex* en est un exemple, le dernier étant épistatique au premier, un double mutant pour ces deux gènes donnent un phénotype sexuel de « double sexes ». Des travaux ont montré que le produit de *transformer* est impliqué dans la régulation de l'épissage et la polyadénylation, spécifiques aux femelles, de *doublesex* (Baker B. S. *et al*, 1980) L'ensemble de ces données

suggère que chaque étape épistatique est un prérequis permettant de passer à l'étape suivante de la cascade génétique.

La situation précédente n'est pas l'unique scénario pouvant exister entre les QTLs. Des cas où un QTL situé en amont est cette fois épistatique à celui en aval ont été décrits dans la littérature par Avery L. et Wasserman S., en 1992. Ces derniers ont déterminé une généralisation de l'ordre hiérarchique des QTLs par rapport à des travaux réalisés chez *C.elegans* et la drosophile (Avery, L. *et al*, 1992). Nos travaux viennent d'ailleurs confirmer leurs résultats et procure la première preuve de l'existence d'une telle hiérarchie régulatrice entre QTLs, basée sur l'épistasie, chez le mammifère.

Comme nous l'avons vu, cette hiérarchie génétique entre deux QTLs au sein d'une même voie ne peut voir le jour que lorsque ces deux QTLs ont des effets opposés sur le phénotype. Or la plupart de nos QTLs dans EM1 et EM2 (**Figure 12**) exercent des effets semblables sur la PA. C'est le cas par exemple de C10QTL1 et C16QTL (**Tableau I (IV-1) page 93**).

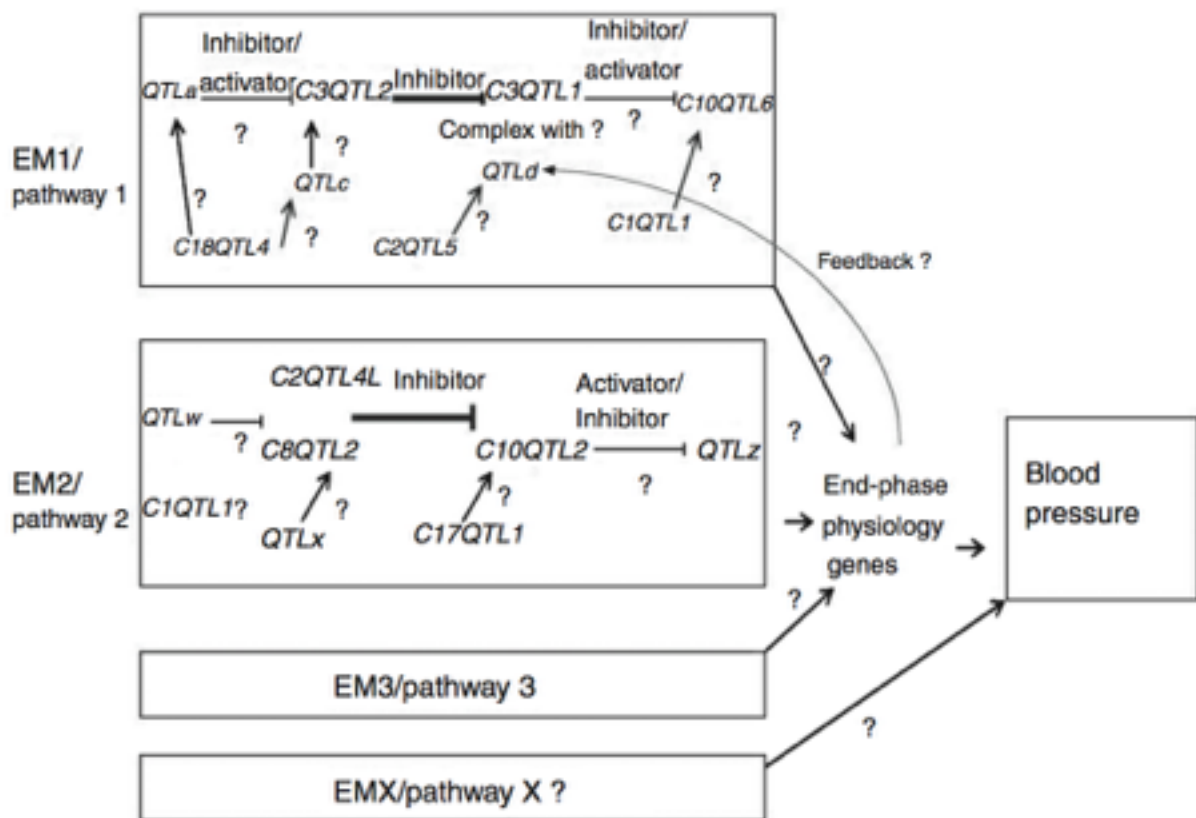
Deux QTLs exerceront des effets similaires sur la PA si, par exemple, le produit d'un QTL est nécessaire pour recruter le produit de l'autre sous la forme d'un complexe actif, lors d'un contact direct entre protéines. Dans cette situation, on s'attend à ce que le double mutant présente le même phénotype que celui d'un des deux mutants seul. On parle ici de relation épistatique égale entre les deux QTLs (Deng AY., 2015).

Une relation épistatique hiérarchique, comme celle décrite plus haut, ne peut être déterminée que lorsque les mutants sont complètement « *on* » ou « *off* ». Des mutants « incomplets » ou hypomorphiques, qui expriment le phénotype sauvage mais dont l'expression est moindre ou le produit est moins actif, viendraient compliquer l'analyse épistatique en créant un phénotype intermédiaire entre ceux définis par les deux gènes épistatiques.

Enfin, une hiérarchie biologique supérieure à celle de la voie génétique étudiée, à l'origine de l'intégrité structurelle cellulaire, tissulaire, organique doit être nécessairement intacte pour pouvoir réaliser ce genre d'analyse.

L'épistasie permet donc de lever le jour sur des cascades génétiques impliquées dans l'homéostasie de la PA, sans connaissance préalable sur les gènes appartenant à la voie régulatrice en question. Les analyses épistatiques permettent de déterminer les relations liant deux QTLs entre eux et d'établir, lorsque leurs phénotypes nous le permettent, l'ordre hiérarchique selon lequel ils agissent pour aller finalement réguler les gènes en bout de cascade qui agissent directement sur la PA.

Il faut bien évidemment prendre en considération qu'une voie de régulation génétique est composée de nombreux éléments créant plusieurs étapes avant d'atteindre les gènes ayant une action directe sur le phénotype. Des bifurcations peuvent avoir lieu, formant une cascade complexe de régulation. Il est d'ailleurs connu que la PA est régulée par des boucles de rétrocontrôles telles que le baroréflexe, la natriurèse-diurèse. D'où il est nécessaire de prendre en considération l'existence de tels mécanismes dans l'architecture génétique des QTLs impliqués dans la régulation de la PA (**Figure 15**).



**Figure 15: Schéma global de l'architecture génétique basée sur une hiérarchie régulatrice complexe des QTLs menant à l'homéostasie de la PA.**

Les flèches suggèrent une direction générale, « ? » indique une relation probable, non confirmée entre les QTLs. Seules les hiérarchies entre C3QTL2 et C3QTL1 dans le EM1 et entre C8QTL2, C2QTL4L et C10QTL2 dans le EM2 ont été établis à partir de nos données expérimentales (extraite de Deng AY., 2015).

La **figure 15** expose la complexité de l'architecture génétique sous-jacente à la régulation de la PA, qui doit certainement s'appliquer à l'ensemble des traits complexes. Nous avons montré ici que certains QTLs sont organisés en réseaux fonctionnels via des hiérarchies régulatrices. De plus, logiquement, seuls les gènes étant situés en aval de la cascade génétique agissant directement sur le phénotype devraient être connus pour leur impact sur l'homéostasie de la PA. Comme nous l'avons illustré, C8QTL2 agit en amont de la voie régulatrice déterminée par EM2 et inhibe C10QTL2. Par conséquent, C8QTL2 exerce



une action indirecte sur le phénotype. De plus, C10QTL2 est supporté par le gène *ATP-binding cassette, subfamily A, member 8a (Abca8a)*, dont le rôle dans la régulation de la PA n'est pas évident, suggérant que ce dernier doit certainement réguler d'autres gènes en aval de la cascade jusqu'à atteindre le chaînon final ayant une action directe sur la PA. De même, C8QTL2 n'est certainement pas le premier acteur duquel découle la voie régulatrice. La hiérarchie épistatique entre C8QTL2 et d'autres QTLs du EM2 n'étant pas établi, il est possible que ce dernier agisse lui-même en aval d'un autre de ces QTLs.

L'héritabilité manquante est bien illustrée dans notre modèle de doubles congéniques où la combinaison de 8 QTLs équivaut à celle de seulement 2 QTLs, comme si 6 QTLs étaient « manquants » (**Figure 11**). Les 16 QTLs contenus dans le EM1 agissent également comme un seul QTL, comme si 15 QTLs étaient « manquants ». Ici, l'épistasie appuie donc fortement l'origine de cette héritabilité manquante.

## V-6. Du modèle animal à l'Humain

Bien que la modularisation épistatique des QTLs découverte chez le modèle murin consanguin ne peut pas être testée directement dans la population humaine hétérogène, celle-ci peut constituer une source de compréhension incontestable de l'organisation régulatrice régnant entre les QTLs.

Les études de GWAS ont révélé l'association de certains gènes avec la PAS, la PAD, la PAM et/ou la PP. Parmi ces derniers, *FLJ32810-transmembrane protein 133 (TMEM133)* trouve son homologue chez le rat et correspond à C8QTL2 (Newton-Cheh *et al*, 2009, Levy *et al*, 2009, Wain, L. V. *et al*, 2011). Chez l'Homme, *TMEM133* pourrait ainsi agir au sein d'une voie de régulation de la même façon que C8QTL2. Si c'est bien le cas, la compréhension de l'organisation régulatrice existante autour de ce gène semble plus pertinente que l'étude de son impact physiologique sur la PA. Ainsi l'interaction entre *TMEM133* et *ABCA8A*, l'homologue

de *Abca8a* codant pour un transporteur de drogues lipophiles, semble une voie d'étude intéressante. Les QTLs humains désignés par *Hemochromatosis (HFE)* et *Natriuretic Peptide Receptor 3 (NPR3)/C5ORF23* sont homologues à C17QTL2 et C2QTL4L, respectivement, appartenant au même EM2 et donc à la même voie que C8QTL2. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la voie régulatrice homologue au EM2 comprenant ces trois gènes chez l'humain.

Selon le même principe, les QTLs désignés par *JAGGED1 (JAG1)*, *guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating complex (GNAS)/Endothelin 3 (EDN3)* and *c-src tyrosine kinase (CSK)/ unc-51 like kinase 3 (ULK3)* trouvent tous leur homologues chez le rat dans EM1 qui correspondrait ainsi à la « voie régulatrice homologue humaine 1 ».

Les quatre QTLs humains: *furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)/FES proto-oncogene, tyrosine kinase (FURIN/FES)*, *adrenomedullin (ADM)*, *pleckstrin homology domain containing, family A member 7 (PLEKHA7)* and *phospholipase C, epsilon 1 (PLCE1)* seraient impliqués dans la cascade homologue 1 ou 2 puisque leur homologues chez le rats appartiennent soit à EM1, soit à EM2.

La compréhension de l'organisation régulatrice des QTLs au sein de cascades génétiques devrait avoir une implication physiologique potentielle chez l'humain, de même qu'un impact thérapeutique. En effet, cibler deux QTLs, chacun appartenant à une voie distincte de la régulation de la PA, devrait s'avérer plus efficace que de cibler deux QTLs situés dans la même cascade et faire profiter les patients d'effets thérapeutiques additifs qui mèneraient en parallèle au rétablissement d'une PA normale.

Nos résultats nous ont mené à la découverte de deux principaux modules épistatiques. Or, il est possible que d'autres voies régulatrices existent, rassemblant chacune plusieurs QTLs et leurs découvertes s'avèrent aujourd'hui critique dans la compréhension de la pathogénicité de l'HTA.

## V-7 La spécificité des populations

Comme les études de GWAS l'indiquent, des SNPs sont associés à la PA dans certaines populations mais pas dans d'autres (Franceschini N. *et al*, 2014). De même, nous avons démontré que certains gènes sont des candidats pour des QTLs dans certaines souches seulement (Crespo K. *et al*, 2011 (Annexe 1), paragraphe I-4.2.2, page 59).

L'existence d'un suppresseur de l'HTA dans le génome LEW qui empêcherait les QTLs de s'exprimer malgré leur présence est un phénomène qui pourrait se retrouver chez certains individus dans la population humaine. Comme déjà discuté dans l'introduction (paragraphe I-4.2.3, page 62) d'autres travaux (Crespo K. *et al*, 2015 (Annexe 2)) nous ont menés à localiser une région qui contiendrait un potentiel suppresseur de l'HTA dans le génome LEW et qui serait manquant chez SS/Jr engendrant le développement de l'HTA. Ainsi, élucider la pathogénèse de l'HTA nécessite l'identification de QTLs isolés et organisés en modules épistatiques mais également la compréhension du système responsable du maintien de la normotension qui est altéré chez les individus hypertendus. Ce mécanisme normotenseur semble surpasser les effets des cascades génétiques déterminées par l'ensemble des QTLs identifiés chez SS/Jr et se présente donc comme une hiérarchie supérieure à l'architecture génétique modulaire décrite ci-dessus, qui pourrait prévenir l'HTA.

L'ensemble de ces résultats doit donc prendre en compte la spécificité des populations étant donné que l'HTA pourrait se développer chez certains individus en raison d'une altération de ce potentiel suppresseur de l'HTA et chez d'autres personnes à cause de défauts touchant des cascades de régulation homologues à celles décrites ci-dessus.

Nos données sur le chromosome 16 montrent que la délétion de glycine présente dans la souche LEW ne se retrouve pas forcément dans d'autres souches de rats, et ceci indépendamment de leurs phénotypes. En effet, la migration sur gel d'agarose du produit de PCR réalisée sur la région du gène *Rap140/Fam208a* contenant la délétion montre un polymorphisme de longueur chez LEW par rapport à SS/JR, et les souches normotendues LN

et WKY mais également la souche hypertendue SHR présentent le même profil polymorphique que LEW (**Figure S7 (IV-2), page 178**). Cependant, un séquençage de cette région du gène devrait être réalisé pour l'ensemble de ces souches afin de confirmer ces résultats.

Le phénomène de spécificité des populations pourrait remettre en cause la validité des gènes candidats identifiés dans l'HTA essentielle (Deng AY., 2007 (c)). De plus, ce fait exclut l'existence de variants en cause dans l'HTA qui seraient communs à l'ensemble de la population mondiale.

Or, la spécificité des populations peut s'expliquer à l'aide du modèle animal. En effet, l'organisation des QTLs en modules épistatiques (EMs) suppose qu'un variant présent dans un QTL contenu dans un EM suffit pour faire varier la PA. Ainsi un individu, ou une population spécifique, pourra porter un variant dans un QTL, alors qu'un autre individu, ou population portera un autre variant situé dans un autre QTL, mais dans le même EM. Par conséquent, les deux individus ou populations afficheront le même phénotype puisque la même voie/cascade sera affectée. Suivant ce modèle, une mutation dans un gène situé en amont dans la hiérarchie épistatique pourra cacher/inhiber les effets d'un autre gène situé en aval dans la hiérarchie. La découverte de nouvelles voies/cascades, regroupant plusieurs QTLs, semble ainsi plus appropriée que la recherche de QTLs communs. Par extension, chaque population peut exhiber une voie/cascade spécifique, voire cumuler plusieurs voies/cascades qui agissent en parallèle, de façon additive pour réguler la PA.

Le démantèlement d'une telle organisation hiérarchique génétique est prometteuse en terme d'implication physiologique et médicale. En fonction de l'origine génétique des populations, différentes approches thérapeutiques pourraient être employées. En effet, cibler 2 QTLs distincts dans 2 voies/cascades différentes pourra s'avérer plus efficace, s'appuyant sur les effets additifs des voies/cascades et mener à l'émergence de traitements personnalisés (Deng AY., 2007 (c)).

## V-8 Analyses moléculaires des QTLs

Suite à nos résultats, de nouvelles interrogations surgissent. De quelle façon C8QTL2 régule-t-il négativement C10QTL2? C8QTL2 agit-il sur le taux d'expression de C10QTL2, ou bien sur sa transcription, sa traduction? Ou encore agit-il de façon post-traductionnelle? Afin de répondre à ces questions, la recherche de mutations altérant la fonction ou l'expression des gènes candidats pour les QTLs entre les deux souches parentales contrastantes de rats s'avère nécessaire. Parmi ces mutations, certaines pourront affecter la région codante du gène, d'autres altéreront le cadre de lecture, mèneront à une expression différentielle, produiront une variation du nombre de copies ou encore engendreront des effets épigénétiques héréditaires. L'impact fonctionnel de ces mutations devra ensuite être confirmé. Pour cela, la réalisation de congéniques isolant un seul gène servira de technique de *Knock-in*, de même, le *nucleotide-targeted knock-in*, la transgénèse, le *Knock-out* ou *Knock down* pourront être utilisés.

### V-8.1 Gènes candidats

#### V-8.1.1 Dépistage de mutations

Le séquençage des régions codantes, des jonctions exons-introns et des régions régulatrices possède un grand potentiel informatif. Suite aux analyses moléculaires, un gène sera identifié comme un gène candidat pour un QTL impliqué dans l'HTA si une ou des mutations sont trouvées. Certains gènes dont l'impact fonctionnel sur la PA a bien été mis en évidence via transgéniques ou *knock-out* n'ont pas révélé de mutations chez SS/Jr ou même chez l'humain. Le gène *Adrenomedullin (Adm)* par exemple, situé dans une région chromosomique arborant un QTL chez notre modèle et chez l'humain, qui de plus montre un impact fonctionnel lorsqu'il est *knock-out*, ne présente aucune variation dans sa région codante, ses jonctions exons-introns ou sa région promotrice (Garett *et al*, 1998). Par

conséquence, *Adm* n'est pas supporté, bien que pas complètement exclu, comme gène candidat positif pour le QTL en question dans notre modèle. Ces gènes pourraient donc influencer la PA directement, en aval d'une voie de régulation, ce qui expliquerait pourquoi ils ne sont pas détectés par les GWAS détectant des variants communs ayant peu d'impact par exemple. En effet, sans mutation altérant sa fonction ou son expression, un gène ne peut pas affecter le phénotype, ce qui représente l'essence même de l'hérédité mendélienne et la base des études de GWAS et de notre approche. Pour être un QTL, un gène doit affecter le phénotype, mais un gène qui affecte la PA n'est pas nécessairement un QTL (Deng A .Y, 2007). Ainsi, des gènes ont été identifiés comme gènes candidats pour des QTLs chez les modèles de rats hypertendus parmi lesquels *Cyp11b1* qui code pour la 11 $\beta$ -hydroxylase ou le gène *Add1* qui code pour l' $\alpha$ -adducin régulant l'activité de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase rénale, ou encore *Cd36* qui code pour un transporteur d'acides gras dont le rôle sur la régulation de la PA chez l'humain reste à être démontrée, *etc* (Franceshini N. *et al*, 2014).

#### V-8.1.2 Profil d'expression génique

Les biopuces d'ARN permettent une analyse du profil d'expression d'un grand nombre de gènes de façon simultanée. Cependant, l'application de cette technique afin d'identifier les QTLs impliqués dans l'HTA a mené à de nombreux faux-positifs. Le gène *acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3* (*Acsf3* ou *Sa*) en est un exemple. Ce gène était différentiellement exprimé et lié à la PA (Iwai N. *et al*, 1992) or la souche congénique le contenant n'a pas montré d'effet sur la PA (Hubner N. *et al*, 1999). Certaines régions contenant des QTLs sont trop grandes et comprennent trop de gènes pour en déduire qu'un gène différentiellement exprimé est le candidat pour le QTL en question. De plus, cette méthode a montré une expression différentielle entre deux souches contrastantes de rats pour certains gènes qui ne sont cependant pas compris dans les régions chromosomiques abritant les QTLs d'intérêts, voire situés sur d'autres chromosomes considérés comme identiques entre les deux souches. Ces résultats peuvent être interprétés comme une régulation en trans effectuée par les gènes contenus dans les intervalles chromosomiques d'intérêts sur l'expression de ces gènes.

Profitons pour faire le point entre les QTLs impliqués dans la PA et les QTLs d'expression (eQTLs). Les derniers sont régulés par des éléments en cis ou en trans alors que les premiers peuvent fonctionner de façon indépendante, sans combinaison nécessaire avec un autre élément régulateur contrairement aux eQTLs. Ceci étant dit, un gène éliminé comme gène candidat car contenu dans une souche congénique dont l'effet sur la PA n'est pas significatif peut constituer un gène candidat pour un eQTL ayant un effet sur une autre fonction que la PA. L'existence de faux-positifs est la raison pour laquelle des gènes différentiellement exprimés doivent être testés *in vivo* pour leurs impacts réels sur la PA. Dans ce contexte, la réalisation de congéniques isolant le seul QTL d'intérêt (*Knock in*) ou l'utilisation d'animaux transgéniques sont des approches intéressantes (Deng AY., 2007).

Les profils d'expression génique combinés aux données de cartographie et séquençage génétique peuvent aider à identifier des gènes candidats. Cependant l'expression différentielle d'un gène n'est pas toujours révélatrice d'un QTL. En effet, des différences d'expression peuvent être restreintes à certains tissus ou stades du développement (Flint J., *et al*, 2005).

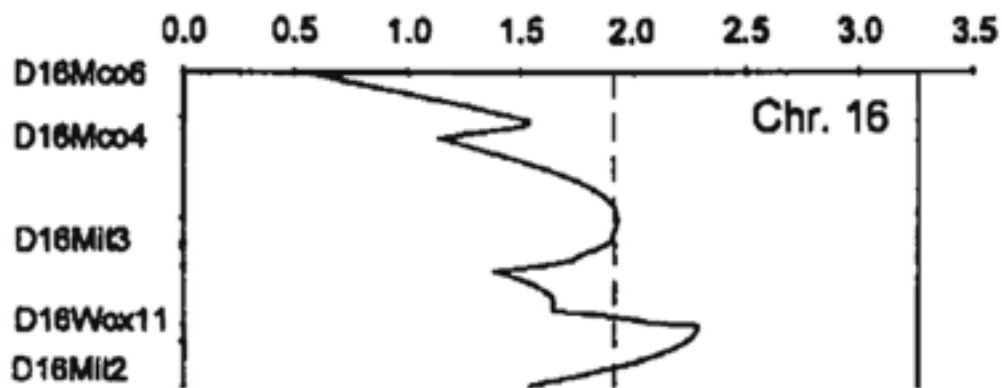
## **V-9. En découvrir plus sur les modules épistatiques: exemple du C16QTL**

L'article « *Retinoblastoma-associated protein 140 as a candidate for a novel etiological gene to hypertension* » récemment soumis illustre parfaitement l'étude des QTLs précédemment décrite et s'inscrit dans une suite logique avec le premier article discuté ci-haut.

En effet, nous avons à ce jour déterminé l'ordre hiérarchique entre 3 paires de QTLs grâce à leurs effets phénotypiques opposés, ce qui n'est pas négligeable, cependant, qu'en est-il des autres QTLs contenus dans chaque module? Afin d'essayer d'en dévoiler un peu plus sur les cascades de régulation définies par EM1 et EM2, l'exemple du C16QTL ouvre la voie à une autre façon d'y parvenir.

### V-9.1. Localisation d'un QTL sur le chromosome 16

La première évidence de l'existence d'un QTL sur le chromosome 16 des rats SS/Jr remonte à une quinzaine d'années, lorsque une analyse de liaison avait localisé une région avec un LOD score de 2,3 suggérant seulement une liaison statistique entre ce fragment chromosomique et la variation du phénotype (Garrett MR. *et al*, 1998) (**Figure 16**). Ces données venaient compléter d'autres analyses réalisées peu auparavant montrant un LOD score de 4,3 dans une population F2 issue du croisement entre SHR et BN (Schork, N. J. *et al*, 1995).



**Figure 16: Analyse de liaison pour le chromosome 16 montrant un LOD score de 2,3; soit une liaison suggestive.**

En coordonnées sont indiqués les marqueurs microsatellites de la région chromosomique, en abscisses, les LOD scores. La ligne en pointillé représente le seuil de LOD score pour une liaison suggestive et la ligne solide une liaison significative

(extrait de Garrett MR. *et al*, 1998).



La création de souches congéniques a par la suite permis de réduire cette région chromosomique à 2,16 Mb (Moujahidine M. *et al*, 2002). Puis la génération d'environ 400 individus F2 issus de plusieurs sous-souches congéniques nous ont finalement permis d'observer des COs et ainsi d'isoler un fragment d'environ 1 Mb contenant 7 gènes susceptibles d'être responsables de la variation de PA observée. La dernière sous-congénique d'intérêt compte pour 28% de la différence de MAP entre les deux souches parentales SS/Jr et LEW (**Figure 1 (IV-2) de l'article, page 145**). La présence du C16QTL a donc été confirmée par quatre sous-souches nommées C16S.L6, C16S.L7, C16S.L8 et C16S.L9, présentant une variation significative de la PA par rapport aux souches parentales.

### **V-9.2. *Rap140/Fam208a* comme gène candidat pour le C16QTL**

Sur les sept gènes contenus dans la région d'intérêt, trois présentent des mutations dans leurs régions codantes dont seulement une dans *Rap140/Fam208a* est non synonyme. Des mutations dans les jonctions intron-exons de ces derniers ne montrent pas d'épissage alternatif. En revanche, ils possèdent tous les trois des SNPs dans leurs régions 5'UTRs et 3'UTRs. Les quatre autres gènes que nous avons défini comme le bloc génomique 1, par opposition au bloc 2 comprenant les trois gènes précédents, semblent au contraire très conservés entre les souches SS/Jr et LEW (**Figure 1 (IV-2), page 145 et supplément S6 (IV-2), page 177 de l'article**). Ainsi, le gène *Rap140/Fam208a* (*Retinoblastoma associated-protein 140/Family with sequence similarity 208 member a*) est le gène dont la candidature pour supporter le C16QTL nous semble la plus plausible. En effet, ce gène est le seul présentant une mutation dans sa région codante responsable de changer sa séquence en acides aminés impliquant un impact potentiel sur sa fonction.

Peu d'informations sont connues sur *Fam208a* (*Family with sequence similarity 208 member a*) situé sur le chromosome 3 humain, aussi connu sous le nom de *Rap140* chez le rat (*Retinoblastoma associated-protein 140*) ou *D14Abble* (*Abbott 1 expressed*) sur le chromosome 14 chez la souris. Ce gène coderait pour une protéine nucléaire jouant

vraisemblablement un rôle critique dans le développement comme l'ont démontré des travaux chez des souris transgéniques qui menaient à la mort embryonnaire de ces dernières (Harten S. K. *et al*, 2014). Rap140 appartient à une grande famille de protéines associées avec le *Retinoblastoma tumor suppressor protein* (RB) dont la fonction connue est celle d'un facteur de transcription qui interagirait avec E2F (Li Q. *et al*, 2000, Benedict W. F. *et al*, 1990, Shan B. *et al*, 1992). Les complexes RB-E2F inhibent la transcription des gènes impliqués dans la transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire, sont impliqués dans l'apoptose et la différenciation cellulaire. Ces interactions sont régulées par des phosphorylations réversibles par des *Cyclin/Cyclin-dependant kinases* (Cdk) (Sengupta S. *et al*, 2015). *Rb* joue également un rôle dans le remodelage de la chromatine via le complexe SWI/SNF. Ainsi, la régulation négative ou positive de gènes spécifiques par RB/E2F est spécifique à chaque membre des familles RB et E2F et dépend également de leurs modifications post-traductionnelles ainsi que d'autres facteurs interagissant avec les gènes ciblés (Du W. *et al*, 2006). D'autres travaux ont montré que l'activité des protéines RB est régulée par le système Ubiquitin/Protéasome (Sengupta S. *et al*, 2015). Le gène *RB*, bien qu'il soit principalement impliqué dans certains cancers dont le retinoblastome, est exprimé de façon ubiquitaire, de même que Rap140/Fam208a (**Figure 2 (IV-2) de l'article, page 147**) qui d'après nos travaux pourrait être aussi impliqué dans l'HTA.

*Rap140/Fam208a* présente une délétion de glycine, située dans une région de répétition en glycine, chez LEW et C16S.L9 par rapport à SS/Jr. Or, les régions de répétitions en glycines sont connues pour former des structures en épingles à cheveux (*hairpins*) qui peuvent interférer avec la traduction et les modifications post-traductionnelles. Notamment, des études de liaison familiale sur le récepteur androgénique (*Androgene Receptor*, AR) ont montré que la variation du nombre de répétitions de glycine est associée avec l'alopecie androgénique, souvent associée avec le cancer de la prostate, les maladies coronariennes, l'hyperplasie bénigne de la prostate, et les désordres métaboliques associés à la résistance à l'insuline chez certains individus (Ding D. *et al*, 2005, Hillmer A.M. *et al*, 2005). Notamment, le nombre de répétitions serait inversement proportionnel au taux de protéine produite, ainsi,

plus la répétition est longue, plus la structure en épingle à cheveux sera forte et plus le taux de production protéique sera faible. En effet, les « *hairpins* » pourraient compromettre le déplacement des ribosomes le long de l'ARNm, affectant ainsi l'efficacité de la traduction. Ces études montrent qu'une variation d'un seul triplet de glycine dans ces séquences répétitives suffit à diminuer l'efficacité de la traduction et que plus la répétition est longue plus intense sera l'inhibition. Basées sur des algorithmes caractérisant la structure de l'ARN, ces « *hairpins* » entraveraient d'autant plus la traduction qu'elles sont formées par des répétitions de « GGC », comme c'est le cas pour *Rap140/Fam208a*, plutôt que des répétitions de codons « GGA » ou « GGG » (Ding D. *et al*, 2005).

### **V-9.3 *Slc7a12* agirait en aval de la cascade EM1**

Le *Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y<sup>+</sup> system), member 12 (Slc7a12)* situé sur le chromosome 2 du rat est aussi connu sous le nom de *Asc-type amino acid transporter 2 (Asc2)* (à ne pas confondre avec le facteur de transcription du même nom) (Chairoungdua A. *et al*, 2001) et *XAT-1* (Blondeau J.-P., 2002). Celui-ci appartient à la famille des transporteurs d'acides aminés cationiques et de type L, SLC7 et est spécifiquement exprimé dans les reins, au niveau de la membrane plasmique apicale et basale des tubes collecteurs rénaux (**Annexe 3**). Il a cependant fait l'objet de peu d'études et se trouve donc moins bien caractérisé que d'autres transporteurs. Cependant, il a été documenté que les membres de la famille SLC7 peuvent fournir la L-arginine permettant la synthèse du NO (Verrey F. *et al*, 2004, Komers R. *et al*, 2014), puissant vasodilatateur impliqué dans la régulation de la PA, comme nous l'avons vu précédemment en introduction. De même, la L-DOPA, précurseur de la dopamine qui agit sur les échangeurs NHE3 et les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases donc sur la natrémie et les variations de PA, circule via ces transporteurs (Pinto V. *et al*, 2013).

Des mutations dans cette famille de gènes ont été associées avec l'intolérance à la protéine lysinuric (LPI) qui se manifeste par une hypersécrétion urinaire et donc une faible

concentration plasmatique en acides aminés cationiques. Les patients atteints de LPI peuvent souffrir, entre autre, d'atteintes glomérulaires.

Les travaux de Komers *et al.* publiés l'an dernier sur une analyse d'expression transcriptomique rénale chez les souris diabétiques OVE26 comparées à un groupe contrôle non diabétique ont montré que sur 638 gènes dont l'expression est altérée, *Slc7a12* est le plus surexprimé (>52 fois) et *Gm6300* (*murine solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member pseudogene*) est le plus sous-exprimé (>99%) chez les souris diabétiques par rapport aux contrôles. Un 3<sup>ème</sup> groupe de souris diabétiques traitées au Losartan, un bloqueur des récepteurs de l'angiotensine, montre une diminution de l'expression de *Slc7a12* et *Gm6300*. Ces deux gènes sont tous les deux des membres de la famille SLC7 et sont adjacents sur le chromosome 3 de la souris, ils seraient paralogues et dériveraient donc du même gène ancestral. Ces données sont consistantes avec l'existence d'un « switch » de l'expression de *Gm6300* dans les conditions contrôles vers l'expression de *Slc7a12* à l'état diabétique et montrent que l'expression de *Slc7a12* est influencée par les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine (Komers R. *et al.*, 2014).

Or, Zeng *et al.* ont montré que les souris OVE26 sont hypertendues lorsque leur PA est mesurée par *tail-cuff* sur animal conscient (Zheng S. *et al.*, 2004). Ainsi, la surexpression de *Slc7a12* chez les souris diabétiques hypertendues concorde avec nos données d'après lesquelles *Slc7a12* est surexprimé chez SS/Jr par rapport à C16S.L9.

Une grande zone d'ombre plane sur le mécanisme d'action de *Slc7a12*, cependant, d'après les connaissances actuelles sur les transporteurs d'acides aminés et nos résultats, *Slc7a12* jouerait un rôle dans la régulation de la PA qu'il exercerait probablement de façon directe à travers la fonction rénale.

## V-9.4 La voie de régulation EM1 se dévoile un peu plus

Basée sur les données précédentes, la souche LEW chez qui le gène *Rap140/Fam208a* est muté, possède une répétition de glycine plus courte, donc un « *hairpin* » moins solide et pourrait donc produire une quantité plus importante de protéine comparée à SS/Jr. Ainsi, si le taux de *Rap140/Fam208a* qui agit comme un facteur de transcription en interaction avec E2F varie entre les deux souches, il est envisageable que d'autres gènes qui seraient ciblés par *Rap140/Fam208a* verraient une variation de leur expression. Plus concrètement, à l'aide de nos sous-congéniques, si des gènes sont effectivement sous régulation de *Rap140/Fam208a*, alors ceux-ci devraient être différentiellement exprimés entre la souche parentale SS/Jr et la sous-souche congénique C16S.L9. Le génome de ces deux souches étant semblable excepté pour la région du chromosome 16 contenant le C16QTL, si un gène contenu en dehors de cette région présente une différence d'expression entre les deux souches, alors on pourra en conclure que C16QTL est responsable de cette variation d'expression.

Afin d'obtenir des indices quant à la véracité de cette proposition, nous nous sommes intéressés au profil d'expression de certains gènes au niveau rénal. Le rein a été choisi pour ces analyses dû à son rôle évident sur la régulation de la PA et pour ainsi essayer de cibler des gènes ayant une action directe sur la PA. Nos données sont en faveur de l'implication de *Rap140/Fam208a* dans la variation de l'expression rénale de *Slc7a12* qui jouerait un rôle direct dans la régulation de la PA. Nos résultats attribuent pour la première fois un rôle indirect joué par *Rap140/Fam208a* dans l'HTA dont le mécanisme d'action passerait par son interaction avec *Slc7a12*, qui, d'après son expression rénale et sa fonction de transporteur d'acides aminés cationique, pourrait être directement impliqué dans l'homéostasie de la PA.

La voie de régulation passant par *Rap140/Fam208a-Slc7a12*, une fois confirmée, pourra contribuer à démystifier la cascade régulatrice définie par EM1. Celle-ci placerait *Slc7a12* comme acteur direct situé en aval de la cascade.

## V-10 Critique de nos résultats

Une alternative à la modularisation épistatique des QTLs que nous avons présenté a été proposée par Rapp J.P. Selon cette dernière, les QTLs sont considérés comme des « interrupteurs » (« *switches* ») qui agissent en série ou en parallèle. Ces « *switches* » sont basés sur les interactions intermoléculaires entre protéine-protéine, enzyme-substrat, récepteur-ligand, protéine-ADN, ARN-ADN, *etc.* Dans ce modèle, les variations génétiques correspondent à des variants alléliques d'une des deux molécules interagissant et les effets environnementaux ou le phénotype sexuel sont considérés comme des variations de la concentration de l'autre molécule du complexe. Ces « *switches* » peuvent être « *on* » ou « *off* » mais des états intermédiaires sont également possibles. Ce modèle permettrait de déterminer quels QTLs agissent en série, dans le cas où la double congénique montre un effet moindre que l'effet additif prédit et quels QTLs agissent en parallèle lorsque la double congénique montre des effets plus importants que l'addition des deux QTLs ne le prédit (Rapp J.P. *et al.*, 2013). Ceci étant dit, Rapp J.P. *et al.* intègrent et corroborent notre concept de modularisation mais suggère la validation de ce modèle en se basant sur leur théorie.

Cependant, ces travaux se basent sur une définition statistique, élargie de l'épistasie, qui selon Fisher, englobe, en plus des interactions « inhibitrices », des interactions « stimulatrices » où une mutation « aggrave » la sévérité d'une autre mutation (Fisher R.A., 1918). En d'autres termes les effets d'un gène pourrait masquer ou exacerber les effets d'un autre gène. Ceci ne correspond pas à la définition originale du généticien mendélien Bateson citée précédemment sur laquelle nous nous basons vu que les QTLs répondent, individuellement, aux lois de l'hérédité mendélienne. Il est important d'insister ici sur le fait que le concept de modularisation est fondé sur des données expérimentales et donc une interprétation biologiquement fonctionnelle contrairement à la théorie de Rapp J.P. basée sur des estimations statistiques.

Une des limites de notre approche est que certains fragments chromosomiques d'intérêts identifiés chez notre modèle sont larges et pourraient contenir plus d'un QTLs responsables de la variation phénotypique. Il n'est pas toujours évident d'obtenir des sous-souches congéniques permettant d'isoler un seul QTL. Par conséquent il peut s'avérer qu'un QTL contenu dans un EM puisse en fait correspondre à plusieurs QTLs.

De plus, bien que nos travaux aient détecté la présence de transcrits *Rap140/Fam208a* dans le rein via une expérience de qRT-PCR sensible, la détection de la protéine Rap140/Fam208a par anticorps n'est pas décelable comme l'a montré l'équipe de Harten SK. *et al*, 2014. Par conséquent, l'impact de la délétion de glycine sur la synthèse protéique rénale ne peut pas être directement adressée et a donc été indirectement évaluée via la sous-expression rénale de *Slc7a12* (**Tableau II (IV-2) de l'article, page 151**). En outre, il n'existe pas à ce jour d'anticorps spécifiques pour *Slc7a12*, limitant la possibilité de déterminer si l'expression différentielle de transcrits *Slc7a12* observée entre les deux souches résulte en une synthèse différentielle de la protéine *Slc7a12*.

Les autres gènes contenus dans le bloc 2 et les gènes ne se chevauchant pas entre C16S.L8 et C16S.L9 ne peuvent pas être complètement exclus comme candidats potentiels pour le C16QTL parce qu'ils ne contiennent pas de mutation non synonyme dans leurs régions codantes, ni au niveau de leurs jonctions introns-exons. Bien que les effets fonctionnels des séquences régulatrices soient plus difficiles à appréhender, un effort de recherche sur la caractérisation de ces régions est toujours de mise dans nos études et le séquençage des régions promotrices, 5'UTRs et 3'UTRs est souvent réalisé lorsque les connaissances à leur égard le permettent. Or, nous avons montré ici, par qPCR que les trois gènes du bloc 2 n'étaient pas différentiellement exprimés dans les reins des souches SS/Jr et C16S.L9 malgré la présence de SNPs dans leur 5' et 3' UTRs, mis en évidence par notre base de données et RGD.

Nous nous sommes seulement intéressé ici aux gènes qui étaient différentiellement exprimés entre C16S.L9 et SS/Jr dans les reins, donc nous ne pouvons nous prononcer sur

l'éventuel impact de *Rap140/Fam208a* sur d'autres gènes exprimés dans d'autres organes, d'autant plus que celui-ci s'exprime de façon ubiquitaire. Des analyses d'expression devraient aussi être réalisées à différentes étapes du développement, vu l'impact de *Rap140/Fam208a* sur le développement embryonnaire.

Il s'agit d'une piste d'étude qui nous semble intéressante à suivre sans pour autant négliger le fait qu'il en existe sûrement d'autres. Cette étude pourrait nous mener à découvrir une nouvelle pièce du *puzzle* formant le EM1.



**CHAPITRE VI**

**CONCLUSION**

Le dogme de l'additivité admis par la grande majorité de la communauté scientifique encore aujourd'hui, est à la base des études de GWAS réalisées chez l'humain. Or, la stratégie génétique des souches congéniques de rats nous a mené à objecter à cette théorie un nouveau concept venant expliquer les mécanismes moléculaires sous-jacents au développement de l'HTA.

Les associations entre QTLs et PA réalisées chez l'humain n'expliquent que moins de 3% de la variation génétique de la PA dans la population. Ce fait vient soulever la question de l'héritabilité manquante. C'est afin de répondre à cette interrogation que notre stratégie génétique, basée sur l'utilisation du modèle animal consanguin trouve sa pertinence. En effet, via la création de doubles et multiples souches congéniques nous avons fourni la première preuve fonctionnelle de l'existence d'interactions épistatiques entre les QTLs impliqués dans l'HTA chez le modèle SS/Jr. Nos travaux nous ont non seulement permis d'expliquer la non colinéarité observée entre le nombre de QTLs et leurs effets sur la PA ainsi que la redondance de l'effet de ces QTLs, mais ils nous ont également mené à déterminer le mécanisme par lequel les gènes susceptibles de faire varier la PA y parviennent. Ce qui n'est pas mis en évidence par les études d'associations pangénomiques.

Bien que la notion d'épistasie soit empirique, la modularisation des QTLs en cascades de régulation de la PA est un concept novateur, qui s'applique pour la première fois à un trait multigénique complexe chez le mammifère. Ainsi, le nombre de QTLs participant à une même voie régulatrice peut être défini, sans forcément connaître leurs identités ou modes d'action. Si l'additivité est compromise par ces travaux, elle n'en est pas pour autant réfutée et s'applique ici aux cascades de régulation qui agiraient en parallèle pour normaliser la PA ou développer l'HTA.

À partir de cette modularisation, il est possible de déterminer la hiérarchie génétique régnant entre ces QTLs, en établissant, lorsque cela est possible, l'ordre d'action des QTLs à l'intérieur d'un module/voie, qu'ils soient connus ou inconnus pour leurs rôles dans la PA. Cette organisation des QTLs explique le mécanisme d'action des QTLs qui augmentent versus

qui diminuent la PA chez SS/Jr. Ces découvertes nous ont permis d'atteindre une nouvelle profondeur dans la compréhension des mécanismes génétiques sous-jacents au développement de l'HTA et pourraient ainsi être extrapoler à l'Homme, d'autant plus que 26% des QTLs identifiés chez l'humain possèdent leurs homologues dans des régions chromosomiques hébergeant des QTLs ayant un impact sur la PA dans les souches congéniques et appartiennent à EM1 ou EM2.

Des travaux datant de plus de 30 ans, réalisés chez la levure, sur des lignées cellulaires de nématodes et sur la détermination du sexe chez la drosophile ont établi que l'épistasie peut être interprétée comme l'existence de hiérarchies régulatrices régnant au sein de voies de régulation phénotypiques (Baker B.S. *et al*, 1980, Ferguson E.L. *et al*, 1987, Neigeborn L. *et al*, 1989). Nos données viennent donc compléter l'édifice architectural de la génétique des traits complexes, appliqué ici à l'HTA dont les fondations nous ont précédés de plusieurs années.

En prenant en compte la spécificité des populations, bien que nos résultats ne peuvent pas être testés directement dans la population humaine hétérogène, une telle organisation hiérarchique des QTLs pourrait lever le jour sur des mécanismes de régulation de la PA expliquant le maintien d'une PA normale ou élevée et permettrait le développement de traitements thérapeutiques plus efficaces, ciblant plus d'une cascade de régulation à la fois.

Les maladies complexes portent effectivement bien leur nom puisqu'elles semblent être issues d'un ensemble de facteurs intriqués entre eux qui ne sont pas tous bien maîtrisés. Comme nous venons de le démontrer, l'héritabilité manquante serait donc due en grande partie aux interactions génétiques. Cependant, toute cette polémique autour de l'héritabilité manquante ne devrait pas nous détourner des aspirations ultimes de la génétique médicale. Nous cherchons en priorité à identifier les cascades moléculaires et leurs mécanismes sous-jacents menant, ici, au développement de l'HTA essentielle. Le but de la recherche biomédicale n'est pas d'expliquer l'héritabilité, d'autant plus que la part de variance phénotypique due à un variant dans la population humaine n'est pas un bon prédicteur de son

impact biologique et médical. Le gène codant l'*HMGCoA reductase* en est un exemple. Celui-ci n'explique qu'une petite fraction de la variance du taux de cholestérol mais constitue une cible thérapeutique importante dans les traitements anti-cholestérol (Zuk, O., *et al*, 2012). L'objectif de notre recherche génétique vise plutôt la compréhension des mécanismes menant au développement de l'HTA, la finalité étant le progrès des techniques de diagnostics et de thérapies personnalisés.

L'étude du C16QTL chez le rat est un exemple de la façon dont on peut appréhender la modularisation des QTLs afin de lever le jour sur une partie d'une des voies régulatrices mises en évidence ici. *Rap140/Fam208a* se présente comme un fort candidat pour le C16QTL et régulerait *Slc7a12* au niveau rénal qui pourrait agir, vue sa fonction, de façon directe sur la régulation de la PA. C16QTL agirait ainsi comme un QTL pour la PA et s'apparenterait à un eQTL en trans affectant indirectement la PA. Le gène *Slc7a12* qui n'avait encore jamais été identifié comme un QTL influençant la PA se voit attribuer un rôle principal, probablement direct dans la régulation de la PA. Deux nouvelles cibles pharmacologiques de la cascade EM1 voient le jour et pourraient donner lieu, une fois bien caractérisées, au progrès thérapeutique.

**CHAPITRE VII**  
**PERSPECTIVES**

Élucider les étapes intermédiaires et déterminer chaque point des cascades menant à la régulation de la PA constitue un défi d'envergure. De futurs travaux nous apprendront certainement si les gènes responsables des formes monogéniques familiales d'HTA se situent en aval de ces nouvelles voies de régulations ou s'ils agissent indépendamment d'autres gènes.

Le C16QTL est un exemple de la façon dont on peut essayer d'étudier plus en profondeur les modules épistatiques. Outre l'identification des gènes candidats pour chaque QTL, il est nécessaire de confirmer et valider leur candidature.

La caractérisation fonctionnelle des QTLs influençant la PA est une tâche pendante qui se voit aujourd'hui facilitée avec le développement des nouvelles technologies de génomique et protéomique. En complément à la méthode de fine résolution congénique (*Knock in*) et afin de confirmer l'impact fonctionnel d'un gène potentiellement candidat, l'édition génomique (*Genome editing*) doit faire suite à la découverte de mutation afin de confirmer l'implication d'un gène dans l'HTA. Bien que la recombinaison homologe ne soit pas facilement réalisable chez le rat, les techniques de *Knock out* sont bien développées chez la souris. L'utilisation d'ARNs interférents *in vivo* chez les souris/rats transgéniques ou *in vitro* en culture cellulaire permet de tester la fonction de la plupart des gènes candidats. Des mesures de PA, de la fonction cardiaque et de l'hypertrophie ventriculaire gauche via échocardiographie, de la fonction cérébrale (oedème, activité cérébrale), de la vasculature de ces animaux devront être analysées rigoureusement.

La majorité des QTLs découverts à ce jour correspondent à des gènes non identifiés ou inconnus pour leurs rôles dans la régulation de la PA. Ainsi leur caractérisation fonctionnelle est importante puisque de leur découverte découlera certainement de nouvelles formules thérapeutiques.

Nos recherches sur le C16QTL nous ont mené à certaines limitations inattendues tels que le fait que les souris KO pour *Rap140/Fam208a* ne sont pas viables et que la protéine ne soit pas décelable par anticorps ou encore qu'il n'existe pas d'anticorps pour *SLC7A12* nous

permettant de comparer son expression protéique rénale entre les souches. Ainsi, à partir de nos résultats, il serait intéressant de vérifier s'il existe d'autres expressions différentielles entre les souches dans d'autres organes que le rein dont la vasculature, les organes cardiaque et cérébrale. De plus, étant donné que l'implication de *Slc7a12* dans l'HTA n'avait encore jamais été démontrée, il serait judicieux de réaliser des études fonctionnelles pour ce gène via production de rats SS/Jr transgéniques et d'analyser, en plus des fonctions physiologiques habituelles, certaines fonctions inhérentes à la famille des transporteurs SLC7 tel que le transport de la L-arginine (via mesure de la synthèse en NO), ce qui nous permettrait d'en connaître d'avantage sur la fonction de ce transporteur encore mal connu.

D'autres pièces du *puzzle* de EM1 et EM2 devront également être étudiées de la même façon afin de compléter ce projet.

L'identification d'un potentiel suppresseur de l'HTA qui appartiendrait à une hiérarchie supérieure constitue également un nouveau défi et la compréhension de son action sur les QTLs impliqués dans l'HTA nous permettrait d'atteindre une nouvelle étape dans la compréhension des mécanismes moléculaires menant à l'HTA (**Annexe 2**). Ce dernier vient effectivement renforcer nos résultats précédents en compromettant à son tour la théorie de l'additivité qui, suite à nos travaux, ne pourra plus être considérée comme la seule explication aux développement des traits polygéniques complexes.

À l'heure de la médecine personnalisée, les professionnels de la santé et scientifiques sont en mesure d'utiliser les nouveaux outils génomiques pour fournir aux patients des informations individualisées sur leurs risques de développer certaines maladies. L'information issue des études génétiques permettra d'adapter des programmes de prévention unique à chaque personne. En outre, les traitements les plus susceptibles d'être efficaces et de causer le moins de réactions indésirables possibles seront sélectionnés en fonction des patients (NIH, 2015).

Ce concept de modularization des QTLs nouvellement appliqué à l'HTA devra certes passer le test du temps et des validations indépendantes devront être réalisées. Toutefois, nous avons jeté les bases conceptuelles de l'architecture génétique menant à l'HTA qui nécessitent désormais d'être validées via l'utilisation d'autres souches hypertendues et normotendues. Si, à la vue de l'évidence expérimentale, ce concept s'applique chez le modèle SS/Jr, est-il extrapolable à certains individus dans la population humaine? Ceci reste à prouver, en prenant en compte la spécificité des populations. Or, étant donné que 26% des QTLs identifiés chez l'humain tombent dans des régions abritant des QTLs chez SS/Jr et appartiennent à EM1 ou EM2, il n'est pas du tout surfait de penser que ces QTLs chez l'humain pourraient agir au sein de voies régulatrices homologues à EM1 et EM2. L'établissement d'une interaction épistatique doit donner suite à l'identification moléculaire des QTLs impliqués afin de déterminer leur mode d'action.

Basés sur les données issues de la génétique des populations et sur nos résultats, on pourrait alors se demander si le déséquilibre de liaison (LD) observé entre les variants génétiques dans les populations servirait d'indice quant à l'identification des gènes qui agissent ensemble de façon épistatique et indiquerait ainsi quels gènes participeraient à la même voie de régulation génétique. Ainsi une collaboration entre les études d'association chez l'humain et la « stratégie congénique » chez le modèle animal constituerait un terrain favorable à la révélation et la caractérisation de nouvelles cascades moléculaires en cause dans l'HTA et même dans l'ensemble des traits polygéniques complexes.



# **CHAPITRE VIII**

## **ANNEXES**

# VIII-1 Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes

Kimberley Crespo<sup>1</sup> Cristina Chauvet<sup>1</sup>, Marilyne Blain, Annie Ménard,  
Julie Roy and Alan Y. Deng

<sup>1</sup>  
( Co-premières auteurs)

Publié dans *Journal of Hypertension* (2011), 29(3), 460–465.

Ma contribution à cet article, en tant que co-première auteure avec Cristina Chauvet, correspond au génotypage et à la cartographie du chromosome 7, au séquençage de 5 gènes et à la confirmation des mutations trouvées dans les gènes *Tac2*, *Nxph4* et *Rdh2*, ainsi qu'à la réalisation de la RT-PCR. Cristina s'est occupée du séquençage des gènes *Cyp11b1*, *Cyp11b2*, *Cyp11b3*, *Trhr* et *Kcnv1* et d'une partie du génotypage des souches congéniques. Annie Ménard, Marilyne Blain et Julie Roy se sont occupées de la réalisation des souches congéniques et souches congéniques réciproques, des mesures de télémétrie et de la qPCR.

Ma contribution aux figures de l'article en pourcentage:

Figure 1: 100%

Tableau 1: 50%

Figure 3: 100%

Supplements 6 à 10: 100%

Supplement 13: 100%

# Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes

Kimberley Crespo\*, Cristina Chauvet\*, Marilyne Blain, Annie Ménard, Julie Roy and Alan Y. Deng

**Objectives** Inbred rodent models simulating essential hypertension and normotension are useful tools in discovering genes controlling blood pressure (BP) homeostasis. An analysis of a  $F_2$  population made from crosses of hypertensive Dahl salt-sensitive (DSS) and normotensive Lewis rats did not detect a BP quantitative trait locus (QTL) on chromosome 7 (Chr 7). However, false negativity could not be excluded. If a BP QTL could be proven to exist, what gene(s) may be responsible for this QTL.

**Methods** We first constructed reciprocal congenic strains for a Chr 7 segment and determined functional domains of prominent candidate genes.

**Results** A congenic strain made in the DSS rat background exhibited a BP effect, indicating that a BP QTL, C7QTL, inhabits Chr 7. Contrarily, a congenic strain constructed in the Lewis rat background did not change BP, demonstrating a dependence of C7QTL on the DSS rats environment. Among the candidate genes, *tachykinin 2 (Tac2)*, *neurexophilin 4 (Nxph4)* and *retinol dehydrogenase 2 (Rdh2)* bear nonsynonymous changes comparing DSS and Lewis rats, but are the same comparing DSS and Dahl salt-resistant (DSR) rats. In contrast, the Lewis alleles of *11-beta-hydroxylase (Cyp11b1)*, *aldosterone synthase (Cyp11b2)* and *Cytochrome P-450 11B3 (Cyp11b3)* are identical to those of DSS rats, but different from those of DSR rats.

## Introduction

Toward the identification of quantitative trait loci (QTLs) for blood pressure (BP) or hypertension in animal models, a usual first step is to expose them by linkage in populations derived from crosses of hypertensive and normotensive strains [1]. Our hypertensive rat model is always Dahl salt-sensitive (DSS) rats, whereas normotensive counterparts vary. It turns out that genetic detections of BP QTLs often depend on a judicious, and sometimes, fortuitous use of contrasting normotensive controls employed in crosses with DSS rats [2]. Coincidentally, this population specificity appears to play a role in detecting an association of genes for essential hypertension [2–4].

For example, a BP QTL was found around the *11-beta-hydroxylase* gene (*Cyp11b1*) on chromosome 7 (Chr 7) in a cross of DSS with Dahl salt-resistant (DSR) rats [5], but not in a cross of DSS with Lewis rats [6], although both DSR and Lewis rats are normotensive. Possible explanations for

**Conclusion** Thus, the failure to detect a linkage between a Chr 7 segment and BP in  $F_2$ (DSS  $\times$  Lewis) can be attributed to false negativity. *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2* are priority candidate genes for C7QTL. Lewis and DSR rats are both normotensive, but their underlying genetic determinants are different. *J Hypertens* 29:460–465 © 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Journal of Hypertension 2011, 29:460–465

Keywords: genetics of hypertension and normotension, *Nxph4*, *Rdh2*, *Tac2*

**Abbreviations:** BP, blood pressure; Chr, chromosome; Cyp11b1, cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 1; Cyp11b2, cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 2; Cyp11b3, cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 3; DAP, diastolic arterial pressure; DSR, Dahl salt-resistant; DSS, Dahl salt-sensitive; MAP, mean arterial pressure; Nxph4, neurexophilin 4; QTL, quantitative trait locus; Rdh2, retinol dehydrogenase 2; SAP, systolic arterial pressure; Tac2, tachykinin 2

Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence to Alan Y. Deng, Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Technopôle Angus, 2901 Rachel St East – Room 312, Montreal, QC H1W 4A4, Canada  
Tel: +1 514 890 8000 x23614; fax: +1 514 412 7655;

Received 30 August 2010 Revised 25 October 2010  
Accepted 26 October 2010

a lack of detection of a BP QTL around *Cyp11b1* in a  $F_2$ (DSS  $\times$  Lewis) population could be due to a false-negative linkage. A congenic strain homogenizes the genetic background and provides a cause–effect connection between the chromosome segment in question and BP [1].

If false negative in linkage in  $F_2$ (DSS  $\times$  Lewis) was the case, and can be rectified by the use of a congenic strain for a Chr 7 section, *Cyp11b1* alleles might be capable of accounting for the BP difference between DSS and Lewis rats, much like the situation between DSS and DSR rats [5,7]. If not, another gene may be responsible for the BP impact of C7QTL. The present investigation was designed to address these issues and to provide a molecular basis for population specificity in detecting a gene to polygenic hypertension.

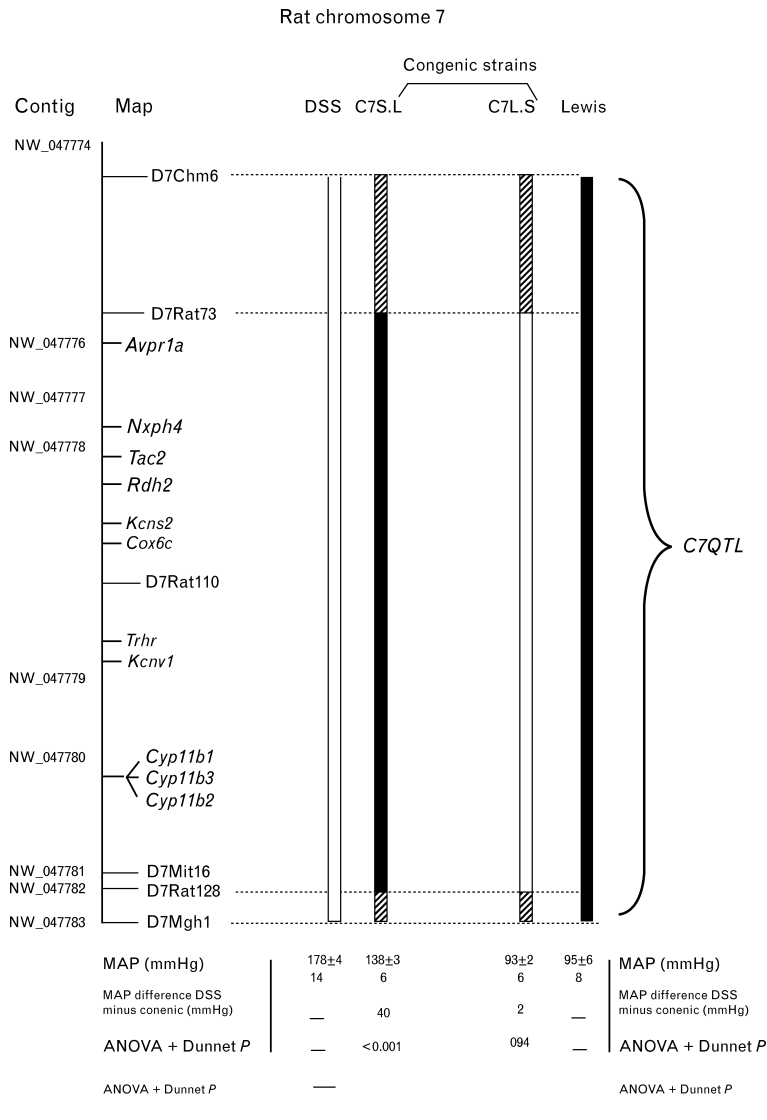
## Methods

### Animals

Protocols for handling and sustaining animals were approved by our institutional animal committee (CIPA).

\*K.C. and C.C. contributed equally to the writing of this article.

Fig. 1



Congenic definition of C7QTL. Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats' chromosome segments are symbolized by white and solid bars respectively. Under congenic strains, a solid bar under congenic strains symbolizes the DSS chromosome fragment that has been replaced by that of Lewis. A white bar represents the Lewis chromosome segment that has been replaced by that of DSS rats. Hatched bars on ends of solid and white bars indicate the ambiguities of cross-over breakpoints between markers. Mean arterial pressures (MAPs) for DSS rats, Lewis and congenic strains are averaged values throughout the period of measurements. The full nomenclature of each congenic strain is described in the method section. The placement of C7QTL is marked in the right by a bracket. *Avpr1a*, Arginine vasopressin receptor 1A; *Cox6c*, Cytochrome c oxidase, subunit 6c; *Cyp11b1*, 11-beta-hydroxylase; *Cyp11b2*, aldosterone synthase; *Cyp11b3*, Cytochrome P-450 11B3; *Kcns2*, potassium voltage-gated channel delayed-rectifier subfamily S member 2; *Kcnv1*, potassium channel subfamily V member 1; *Nxp4*, neurexophilin 4; *Rdh2*, retinol dehydrogenase 2; *Tac2*, tachykinin 2 and *Trhr*, thyrotropin-releasing hormone receptor.

**Construction of congenic strains**

Congenic strains used in the present work are made by an accelerated process as described previously [8]. As a result, two strains were established. One replaced a Chr 7 segment of DSS with its homologue of Lewis in the DSS background, designated: DSS.Lewis-(D7Rat73-

D7Rat128)/Lt (C7S.L). Conversely, the other strain substituted a similar Chr 7 segment of Lewis with its homologue of DSS in the Lewis background, designated: Lewis.DSS-(D7Rat73-D7Rat128)/Lt (C7L.S). The extent of the chromosome replacements in congenic strains is indicated in Fig. 1.

### Animal protocols, blood pressure measurement and statistical analyses

Breeding procedures, dietary treatments, implantation, postoperative care and BP measurement plans adhered to those documented previously [8]. Briefly, male rats were separated from their mothers, fed a low-salt diet (0.2% NaCl, Harlan Teklad 7034; Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, Indiana, USA) 21 days after birth and challenged by a high-salt diet (2% NaCl, Harlan Teklad 94217; Harlan Laboratories, Inc.) starting from 35 days after birth until the end of measurements. Telemetry probes were implanted at 56 days of age (namely 3 weeks from the commencement of the high-salt regiment). BP of the same strain was measured at least from two independently raised litters at different times and the resulting BP for each strain was pooled from these separate measurements, as they were not different. A congenic strain was compared to DSS or Lewis parental strains simultaneously and treated the same way. In the BP presentation, averaged 24-h readings are shown for the duration of our investigation (Fig. 2). Repeated measures' analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test was used to compare a parameter between two groups as reported previously [8].

### Sequencing of 11-beta-hydroxylase, aldosterone synthase and cytochrome P-450 11B3

The coding regions of DSS and Lewis rats are determined in this work. The sequences for DSR rats were taken from those published [5,7,9,10]. The sequences of DSS rats for the three genes confirmed those previously reported [5,7,9,10]. Lewis alleles for the three genes are new.

#### 11-beta-Hydroxylase

Most of the *Cyp11b1* coding region was sequenced in PCR fragments amplified from adrenal glands cDNAs as specified by Cicila *et al.* [5]. The sequence for the first six amino acids was determined from a PCR product amplified from the genomic DNA of rat strains of interest.

#### Aldosterone synthase and cytochrome P-450 11B3

Because their coding domains are very similar, the genomic regions that carry gene-specific sequences are employed to design primers for PCR amplifications of each gene (Supplement 1, <http://links.lww.com/HJH/A61>).

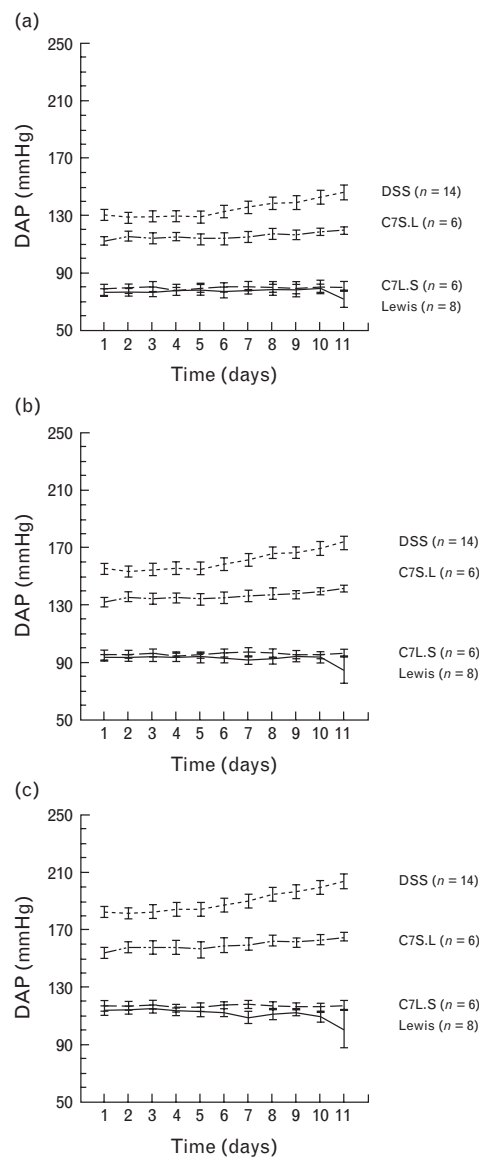
#### Evaluation of gene expressions by real-time reverse transcriptase PCR

The *Cyp11b1* expression in adrenal glands was quantified by the standard qPCR method [11] and compared between DSS and Lewis strains.

#### Gene sequencing of additional candidate genes

Most genes in the C7QTL-residing interval were chosen for sequencing on the basis of their potential influence on BP (Fig. 1). Their coding regions from both DSS and

Fig. 2



Comparison of pressures between congenic, Dahl salt-sensitive and Lewis strains. Each time point on the graph represents an average of 24 h readings. Error bars represent SEM. *n* refers to the number of rats. DAP, diastolic arterial pressure; DSS, Dahl salt-sensitive strain; MAP, mean arterial pressure; SAP, systolic arterial pressure. The chromosome coverage for congenic strains is given in Fig. 1.

Lewis rats were first amplified by PCR from genomic DNAs and then sequenced. When a mutation was detected, the same segment was independently PCR-amplified and resequenced. Thus, all mutations were verified. For certain genes that were different between DSS and Lewis rats, their alleles from DSR rats were also sequenced.

**Table 1 Mutation screening in candidate genes in the C7QTL-containing interval**

Gene	Contig	Genomic start position	Genomic end position	No. of exons	Size of codons (bp)	Mutation detected Lewis/ DSS rats	Change in amino acid Lewis/DSS rats
<i>Avpr1a</i>	NW_047776	3079158	3083083	2	1273	No	No
<i>Nxph4</i>	NW_047777	492259	506431	2	913	Exon2: 571 A/C	191 T/P
<i>Tac2</i>	NW_047778	15714	22321	5	346	Exon2: 162 C/T	55 P/S
<i>Rdh2</i>	NW_047778	50903	65642	4	950	Exon1: 67 A/G Exon1: 311 G/C Exon4: 746 T/C	23 M/V 104 R/T 249 M/T
<i>Kcns2</i>	NW_047778	2547659	2579147	1	1433	1059 G/A	No
<i>Cox6c</i>	NW_047778	3764436	3777171	2	229	No	No
<i>Trhr</i>	NW_047778	12362032	12407353	3	1236	No	No
<i>Kcnv1</i>	NW_047778	13310892	13317297	3	1509	No	No
<i>Cyp11b1</i>	NW_047780	7579869	7586555	9	1500	No	No
<i>Cyp11b3</i>	NW_047780	7615809	7621299	9	1497	No	No
<i>Cyp11b2</i>	NW_047780	7645839	7652254	9	1509	No	No

Gene locations on chromosome 7 are indicated on the map in Fig. 1. The position of a mutation corresponds to its reference point from the ATG start codon of that gene. The amino acid position begins from the first methionine. *Avpr1a*, Arginine vasopressin receptor 1A; *Cox6c*, cytochrome c oxidase subunit 6c; *Cyp11b1*, 11-beta-hydroxylase; *Cyp11b2*, aldosterone synthase; *Cyp11b3*, cytochrome P-450 11B3; *Kcns2*, potassium voltage-gated channel delayed rectifier subfamily S member 2; *Kcnv1*, potassium channel subfamily 5 member 1; *Nxph4*, neurexophilin 4; *Rdh2*, retinol dehydrogenase 2; *Tac2*, tachykinin 2; and *Trhr*, thyrotropin releasing hormone receptor. *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2* of Dahl salt-resistant (DSR) rats possess the same nucleotides as DSS rats at the positions where Lewis and DSS rats differ (Supplements 6–8, <http://links.lww.com/HJH/A61>). The DSR rats *Cyp11b1* and *Cyp11b2* genes are different from both DSS and Lewis rats (Supplements 2 and 3, <http://links.lww.com/HJH/A61>). Complete sequences for the remaining genes are given in Supplements 9–13, <http://links.lww.com/HJH/A61>.

## Results

### Quantitative trait locus placement

One BP QTL, *C7QTL*, manifests itself in the chromosome segment between D7Chm6 and D7Mgh1 markers (Fig. 1). The BP effect of *C7QTL* is only visible when the Lewis allele replaced the DSS allele in the DSS background, that is C7S.L, but not when the genetic background comprised that of Lewis, that is C7L.S (Fig. 2). The BP-raising allele was from DSS rats, instead of Lewis rats as implicated by linkage [6].

### Evaluation of 11-beta-hydroxylase, cytochrome P-450 11B3 and aldosterone synthase as candidate genes

Because C7S.L displayed a BP effect and contains *Cyp11b1*, *Cyp11b3* and *Cyp11b2*, we initiated our mutation screenings with these three genes as obvious candidates to be *C7QTL*. These gene products are well known to participate in the glucocorticoid and mineralocorticoid pathways [12]. *Cyp11b1* has been shown to be responsible for a QTL on Chr 7, designated as QTLChr7, in a DSS and DSR rats matchup [5,13]. *Cyp11b2* bears functional mutations pitting DSS against DSR rats [10], although its role in the inheritance of hypertension is unclear. Both DSR and Lewis rats are normotensive [6], but it was not known whether the similar phenotype was founded on a common genetic basis. Molecular analyses of *Cyp11b1* and *Cyp11b2* comparing DSR, DSS and Lewis rats could provide some insights.

The *Cyp11b1* (Supplement 2, <http://links.lww.com/HJH/A61>) and *Cyp11b2* alleles of Lewis rats (Supplement 3, <http://links.lww.com/HJH/A61>) turned out to be identical to those of DSS rats, but different from those of DSR rats. No evidence of differential expression was seen for *Cyp11b1* (Supplement 4, <http://links.lww.com/HJH/A61>). The *Cyp11b2* expression in adrenal glands under our

conditions was not sufficiently high enough to reach a threshold for quantitative polymerase chain reaction (qPCR), thus could not be compared reliably (data not shown). *Cyp11b3* is the same among DSS, Lewis and DSR rats (Supplement 5, <http://links.lww.com/HJH/A61>). Thus, unlike QTLChr7 distinguishing DSS from DSR rats [5,13], *Cyp11b1* can not be *C7QTL* defined in our present work (Fig. 1), because of its identity between DSS and Lewis rats. *Cyp11b2* and *Cyp11b3* are most likely not responsible for the BP effect of *C7QTL*.

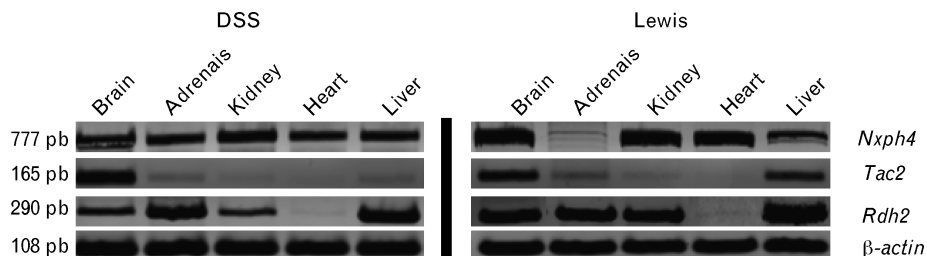
### Premier identification of tachykinin 2, neurexophilin 4 and retinol dehydrogenase 2 as leading candidate genes for C7QTL

Because none of *Cyp11b1*, *Cyp11b2* and *Cyp11b3* could be *C7QTL*, another gene responsible for it had to exist. To identify it, a series of genes across the *C7QTL*-lodging interval (Fig. 1) were screened for mutations in their functional domains. Indeed, significant mutations were found in *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2*. *Tac2* and *Nxph4* contain one nonconserved mutation each, and *Rdh2* carries three such mutations (Table 1, Supplements 6–8, <http://links.lww.com/HJH/A61>). These three genes are expressed in functionally relevant organs such as the brain (Fig. 3). No mutations in the intron–exon junctions for the three genes were found (data not shown). The remaining genes shown in Fig. 1 encode the same amino acids for DSS and Lewis rats (Supplements 9–13, <http://links.lww.com/HJH/A61>) and thus, may not be considered as candidates for *C7QTL*.

## Discussion

Primary verdicts from the present work are as follows. First, at least one BP QTL, *C7QTL*, inhabits a Chr 7 segment. Its hypertensive and normotensive alleles are of DSS and Lewis origins, respectively. Second, *C7QTL*

Fig. 3



Organ expressions of *Nxph4*, *Tac2* and *Rdh2* assayed by reverse transcriptase polymerase chain reaction. The organs are from Dahl salt-sensitive (DSS) rats on the left panel and Lewis rats on the right panel. Numbers to the left indicate the size of the fragment in base pairs. Primers for reverse transcriptase-PCR are forward 5'gcaagattgtggaccatgtg 3' and reverse 5'ctatgcttatgccctcccaa3' for *Nxph4*, 5'-ctcagcttggcattggacott-3' and reverse 5'-ccttgctcagcactttcagc-3' for *Tac2*, 5'-gggagaggaaggtggaagc-3' and reverse 5'-gatgccagcattgttgacc-3' for *Rdh2*, 5'actgccgcctcctctcctc3' and reverse 5'ccgctcgttgccaatagtga3' for  $\beta$ -actin. Two primers for each gene are located in two different exons to avoid amplifying genomic DNAs contaminated in RNA preparations, because no products were seen when genomic DNAs were amplified (data not shown). Results shown are from one rat of each strain and they have been replicated with multiple rats of the same strain (data not shown). Rats were all males and their organs were harvested at the end of the experiment (see the Animal protocol section in Methods section).

cannot be *Cyp11b1*, *Cyp11b2* and *Cyp11b3*, because they are identical between DSS and Lewis rats. Third, *Tach2*, *Nxph4* and *Rdh2* are foremost candidates for C7QTL, because they all carry nonconserved mutations. This is the first study identifying their potential roles in the genetics of polygenic hypertension. Fourth, the genetic foundation for maintaining a similar BP phenotype differs between two normotensive rat strains, DSR and Lewis.

#### Congenetic definition of C7QTL

A Chr 7 segment that lodges the three genes encoding cytochrome P450 enzymes was not linked to BP [6]. If anything, the Lewis allele at the D7Mit5 marker was associated with a BP-increasing outcome, whereas the DSS allele was associated with a BP-decreasing consequence [6]. Contrary to these predictions, congenic strain C7S.L significantly altered BP, and exhibited a BP-decreasing effect when the DSS allele was replaced by that of Lewis (Fig. 1). Because the congenic strategy predicates on a cause-effect relationship between genes and BP [1], the established presence of C7QTL proves that the result from linkage [6] was false-negative, even though C7QTL can not be anyone of *Cyp11b1*, *Cyp11b2* and *Cyp11b3*.

#### Tachykinin 2, neurexophilin 4 and retinol dehydrogenase 2 are premier candidate genes for C7QTL

Among the genes in the C7QTL-residing fragment (Fig. 1), *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2* appear to be strong choices to be C7QTL. Tachykinin 2 is a member of the vasoactive peptide tachykinin family that can modulate BP [14]. Neurexophilin 4 belongs to a class of neuropeptides [15] and serves as a ligand for alpha-neurexins that appear to play a role in neuronal cell recognition. Retinol dehydrogenase 2 converts retinol to retinal, the first step in the production of retinoic acid that is involved in the development [16]. All these genes are located adjacent to

one another in a chromosomal block (Fig. 1). The emergence of these favorable candidate genes paves the way for molecular identification of the causal gene for C7QTL. All three genes are expressed in the brain (Fig. 3). Thus, a neuronal mechanism may play an eminent role in the C7QTL function.

It is worth noting that mutations responsible for C7QTL all appear to be located in the coding realms of *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2*. The presence of these variants provides testable hypotheses for analyzing the impact on the functions of their gene products. The present study, however, cannot rule out the possibility that polymorphisms in the regulatory regions of these genes may influence their expressions also.

The possibility cannot be excluded that a combination of more than one gene might be needed to achieve the BP effect of C7QTL. Alternatively, additional QTLs may emerge from the chromosome segment lodging C7QTL (Fig. 1). Congenic fine dissection is required to resolve these issues by separating *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2*.

#### A normotensive phenotype between strains can be underpinned by different genetic grounds

Lewis and DSR rats seem to be comparably normotensive [6]. Mutations in the DSR rats *Cyp11b1* allele endow a change in the catalytic function of its product [7] and are believed to render DSR rats normotensive compared with DSS rats [6]. In contrast, the Lewis *Cyp11b1* allele codes for an identical protein as that of DSS rats and a different protein from DSR rats, and yet Lewis rats is also normotensive. Conversely, DSS and DSR rats possess the same alleles at *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2*, and both are different from Lewis rats. Thus, normotension in Lewis rats has to be determined by different genes than that in DSR rats.

The use of congenic strains demonstrated the power of identifying genes that may influence BP, not just show

polymorphisms between strains, such as between DSR and Lewis rats. Because the genetic backgrounds of DSR and Lewis rats (Fig. 1) seem 'resistant' to allow the exhibition of a BP effect, directly comparing DSR and Lewis rats cannot identify genes responsible for their normotension. By putting the similar chromosome segment from DSR and Lewis on the DSS background separately, one can reveal the genetic influence of that segment on BP.

The discovery of distinguishable genes controlling normotension in Lewis and DSR rats provides a molecular basis for population specificity in genetic analyses that utilize the populations derived from intercrosses of a hypertensive model and normotensive control. When the same hypertensive strain is used, the outcome of genetic detection of a hypertension gene depends entirely on the choice of normotensive control. Consequently, an association of a gene or genetic locus to hypertension can appear positive in the population originated from one normotensive control, but negative in another. This population specificity is not an artifact, but a true genetic occurrence. This observation can be extrapolated to explain the phenomenon of population specificity in human genetic studies of essential hypertension.

Until recently, the candidate gene approach was the cornerstone of genetic analysis for essential hypertension [3,4], because the products of these genes are known to participate in the regulation of BP homeostasis. A crippling impediment employing this approach has always been that no matter which candidate gene was tested, it was associated with hypertension in some populations, but not in others. This outcome inexorably called into question a valid role of any gene played in essential hypertension. Population dependence, rather than a lack of confirmation, however, has not been considered as a factor. Population specificity was first raised in animal model studies of polygenic hypertension [17], but has not been earnestly embraced to rationalize the population dependence of candidate genes in association with essential hypertension. In light of the results from the present investigation, population specificity should be treated as a genuine phenomenon with a credible genetic basis. Even with the recent advancement of genome-wide association studies [18–21], it is expected that the genetic detection of possible hypertension or BP genes may vary from community to community due to population specificity.

In conclusion, the congenic approach has affirmed that the result of linkage was false negative for not detecting C7QTL in a Chr 7 segment in F<sub>2</sub>(DSS × Lewis). Promising candidate genes *Tac2*, *Nxph4* and *Rdh2* for C7QTL have been unearthed, as they all possess amino acid-changing mutations. Unlike DSR rats, Lewis rats carry the same alleles at *Cyp11b1* and *Cyp11b2* as DSS rats, thus excluding them as probable genes responsible for C7QTL. Because their genetic underpinnings for BP

differences to DSS rats are different, Lewis and DSR rats must achieve normotension via differing genetic machinery, and perhaps, divergent physiological mechanisms. By inference, a comparable phenotype among different hypertensive strains may have differing genetic determinants. Therefore, diverse genetic bases, rather than a common variant, of normotension, and perhaps hypertension, likely lay the foundation for individuals in general human populations.

## Acknowledgement

The present work was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research to A.Y.D.

There are no conflicts of interest.

## References

- Deng AY. Positional cloning of quantitative trait loci for blood pressure: how close are we? A critical perspective. *Hypertension* 2007; **49**:740–747.
- Deng AY. Genetics of polygenic hypertension from animal models to humans. *Curr Hypertens Rev* 2007; **3**:284–297.
- Agarwal A, Williams GH, Fisher ND. Genetics of human hypertension. *Trends Endocrinol Metab* 2005; **16**:127–133.
- Morris BJ, Benjafeld AV, Lin RC. Essential hypertension: genes and dreams. *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**:834–844.
- Cicila GT, Rapp JP, Wang JM, St Lezin E, Ng SC, Kurtz TW. Linkage of 11 beta-hydroxylase mutations with altered steroid biosynthesis and blood pressure in the Dahl rat. *Nat Genet* 1993; **3**:346–353.
- Garrett MR, Dene H, Walder R, Zhang Q, Cicila GT, Assadnia S, et al. Genomic scan and congenic strains for blood pressure quantitative trait loci using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res* 1998; **8**:711–723.
- Matsukawa N, Nonaka Y, Higaki J, Nagano M, Mikami H, Ogihara T, Okamoto M. Dahl's salt-resistant normotensive rat has mutations in cytochrome P450(11 beta), but the salt-sensitive hypertensive rat does not. *J Biol Chem* 1993; **268**:9117–9121.
- Sivo Z, Malo B, Dutil J, Deng AY. Accelerated congenics for mapping two blood pressure quantitative trait loci on chromosome 10 of Dahl rats. *J Hypertens* 2002; **20**:1–9.
- Cicila GT, Garrett MR, Lee SJ, Liu J, Dene H, Rapp JP. High-resolution mapping of the blood pressure QTL on chromosome 7 using Dahl rat congenic strains. *Genomics* 2001; **72**:51–60.
- Cover CM, Wang JM, St. Lezin E, Kurtz TW, Mellon SH. Molecular variants in the P450c11AS gene as determinants of aldosterone synthase activity in the Dahl rat model of hypertension. *J Biol Chem* 1995; **270**:16555–16560.
- Moujahidine M, Lambert R, Dutil J, Palijan A, Sivo Z, Ariyaratna A, Deng AY. Combining congenic coverage with gene profiling in search of candidates for blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats. *Hypertens Res* 2004; **27**:203–212.
- Connell JMC, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 2005; **186**:1–20.
- Garrett MR, Rapp JP. Defining the blood pressure QTL on chromosome 7 in Dahl rats by a 177-kb congenic segment containing *Cyp11b1*. *Mamm Genome* 2003; **14**:268–273.
- Walsh DA, McWilliams F. Tachykinins and the cardiovascular system. *Curr Drug Targets* 2006; **7**:1031–1042.
- Missler M, Hammer RE, Sudhof TC. Neurexophilin binding to alpha neurexins. *J Biol Chem* 1998; **273**:34716–34723.
- Holland LZ. Developmental biology: a chordate with a difference. *Nature* 2007; **447**:153–155.
- Rapp JP, Deng AY. Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? *Hypertension* 1995; **25**:1121–1128.
- Cho YS, Go MJ, Kim YJ, Heo JY, Oh JH, Ban HJ, et al. A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. *Nat Genet* 2009; **41**:527–534.
- Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet* 2009; **41**:677–687.
- Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet* 2009; **41**:666–676.
- The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature* 2007; **447**:661–678.



**Supplement 1. Genomic DNA alignment among rat *11 beta-hydroxylase(Cyp11b1)*, *aldosterone synthase (Cyp11b2)* and *Cytochrome P-450 11B3 (Cyp11b3)* genes.**

```

Cyp11b1_DNA      GAAGAGAAATGAGAAATTTCTAAAAGCCAACACTTAACCGTAAATCACGACAGTGAGTAAA 60
Cyp11b2_DNA      CTAGTCTTTAGATTTATTTTCACTAAAACACACACACACACACACACACACACACACACACA 59
Cyp11b3_DNA      GAAAAGAAAAGAGAAATTTCTAAAAGCGAACACTTAACCGTGAATCAGGACAGTGAGTAAA 60
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      GACCCACTCCCTAAATCTGGCTAGGGAATTTTAACTAGGATGAATCATTCAAGG---TT 117
Cyp11b2_DNA      CACACACACACACACACACACCCCAAGTCATATAAAGAAACCAAGGCTTCTAGGATATC 119
Cyp11b3_DNA      GACCCACTCCCTAAATCTGGCTAGGGAATTTTAACTAGGATGA-TCATTCAAGG---TT 116
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      CCACAAAGGGAAAAATATGTCATCTGACGGCTCTACCATGGGGGAGGAGAAAGAGGCT 177
Cyp11b2_DNA      TTCAAAGAGAGGATCCATCCATCTTCCCTTTCCATCTATAGTGAGAAAAGAGTAATTT 179
Cyp11b3_DNA      CCACAAAGGGAAAAATAAGAGCCTGACGGCTCTCACCTCGAGGAGGAAAAAGAGGCT 176 F1
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      CTG-----ACCACCATTGGACTATTTTTGAGTGTTAAAGTAGAGTCTGCACCC---T 226
Cyp11b2_DNA      CTTCCCCTTCTACCTCAGGCAACACAGTTCGCGATGTGGACACTACACCTGCTCTTAGTT 239
Cyp11b3_DNA      CTG-----ACCACAATTGGACTATTTTTGAGTGTTAAAGTAGAGTCTGCACCC---T 225
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      CCCACCCACCAGCAGGCATTGCAGAGGTAGGAAAA--GGGAGAAAGCCTCTACCTCCAGA 284
Cyp11b2_DNA      TCTACCCCCAGCAGGCTTTCAGAGTGTGGGGAGCTGGTCATATGCTTCTACTGACACT 299
Cyp11b3_DNA      CCCACCCACCAGCAGGCATTGCAGAGGTAGGACAA--GGGAGAAAGCCTCTACCTCCAGA 283
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      AGA-----ACCATCAGCTCAGTATACATTTCTAGGGCAAGTCCAGGGACACATCCTGCA 338
Cyp11b2_DNA      TGAGCCCCAACCATGACCAGAGCTCAGATACCTCAGACAAGTCCAGGGACAGTTTCTTCC 359
Cyp11b3_DNA      AGA-----ACCATCAGTTCAGAATACATTTCTAGGGCAAGTCCAGGGACACATCCTGCA 337
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      GTGACATTATCAGTCAGCGATTTATATCCTCAAGACAAGATAAAAAGGCCACGGACTAAAC 398
Cyp11b2_DNA      ATGACGTGATTAGCTGAACAGTACAGTACTTA-GGCAGGATAAAAGGCTGTGAGCT---- 414 F1
Cyp11b3_DNA      GTGGCATGTGTCAGTCAGCGATTTCATGTCTTCAAGACAAGATAAAAAGGCCACGGACTAAAC 397
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      ACAGGAAGAGAGGAGGATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAG 458
Cyp11b2_DNA      ----GAAGGGAGGAGGATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAG 470
Cyp11b3_DNA      ACAGGAAGAGAGGAGGATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGG--GCAAG 454
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      ACCCTGGCAGTGCCTGACACAGGACGAGGGCACTGGGCACTACGGCAAAAGTGGCCCCAA 518
Cyp11b2_DNA      ACCCTGGCAGTGCCTGACACAGGACGAGGGCACTGGGCACTACGGCAACACTGGCCCCAA 530
Cyp11b3_DNA      ACCCTGGCAGTGCCTGACACAGGACGAGGGCACTGGGCACTACGGCAACACAGGCCCCAA 514
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      GACACTGAAGCCCTTTGAAGCCATACCACAATACCTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGAT 578
Cyp11b2_DNA      GACACTGAAGCCCTTTGAAGCCATACCACAATACCTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGAT 590
Cyp11b3_DNA      GACACTGAAGCCCTTTGAAGCCATACCACAATACCTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGAT 574
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      ACAGATCCTGAGGGAGCAGGGCCAAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCTTCCA 638
Cyp11b2_DNA      ACAGATCCTGAGGGAGCAGGGCCAAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCTTCCA 650
Cyp11b3_DNA      ACAGATCCTGAGGGAGCAGGGCCAAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCTTCCA 634
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      AGAGCTGGGGCCATTTTCAGGTAAGGGCTTTCCCTTCCCATAGCCAAGCACAGACATAG 698
Cyp11b2_DNA      GGAGCTGGGGCCATTTTCAGGTAAGGGCTTTCCCTTCCCATAGCCAAGCACAGACATAG 710
Cyp11b3_DNA      GGAACCTAGGGCCATTTTCAGGTAAGGGCTTTCCCTTCCCATAGCCAAGCACAGACATAG 694 R1
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      CTTGCTGTCTCTGTTGGCCAGGCTCTGCAGGGTACGAGGTGCTGCATTCTCCAGTAGG 758
Cyp11b2_DNA      CTTGCTGTCTCTGTTGGCCAGGCTCTGCAGGGTACGAGGTGCTGTATTCTCCAGTAGG 770
Cyp11b3_DNA      CTTGCTGTCTCTCCGTTTGCCCAGGCTCTGCAGGGTACGAGGTGCTGCATTCTCCTGTAGG 754
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      CACCAGGCATTCCATCATTAGGAAGACAGGGAGGGAGAACAGGAGGTTCTGGGACTGACT 818
Cyp11b2_DNA      CACC CGCATTCATCTTTAGGAAGACAGGGAGGGAGAACAGGAGGTTCTGGGACTGACT 830
Cyp11b3_DNA      CACCAGGCATTCTTCTTTAGGAAGACAGGGAGGGAGAACAGGAGGTTCTGGGACTGACT 814 F2
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      CGTGGTCTCTCCACAGGGACAGAGAAAAGCCTTCTCACTGCTGAGAGGACAGAGTGCTG 878
Cyp11b2_DNA      CGTGGGCTCTCCACAGGGACAGAGAAAAGCCTTCTCACTGCTGAGAGGACAGAGTGCTG 890
Cyp11b3_DNA      CGTGGGCTCTCCACAGGGACAGAGAAAAGCCTTCTCACTGCTGAGAGGACAGAGTGCTG 874
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      AAGTGTGAAGTGGAGTGCAGACACTGGGAGAGTCTCCTGTGGGGGAAGCAAGGGCTAG 938
Cyp11b2_DNA      AA-----GTGGAGTGCAGACACTGGGAGAGTCTCCTGTGGGGGAAGCAAGGGCTAG 942
Cyp11b3_DNA      AA-----GTGGAGTGCAGACACTGGGAGAGTCTCCTGTGGGGGAAGCAAGGGCTAG 926
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Cyp11b1_DNA      GAGAGGATGAGATGAGAGAGCACACTGACAGGGCTGGCTGTGCAGCGAGCTCAGGTGGAG 998
Cyp11b2_DNA      GAGAGGATGAGATGAGAGAGCACACTGACAGGGCTGGCTGTGCAGCGAGCTCAGGTGGAG 1002
Cyp11b3_DNA      GAGAGGATGAGATGAGAGAGCACACTGACAGGGCTGGCTGTGCAGCGAGCTCAGGTGGAG 986
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Cyp11b1\_DNA GACACTCCACTTACAGCAGGGCTGTGTGCTTACCACAGGCACAGTGCAGGGGGAGCACA 1058  
Cyp11b2\_DNA GACACTCCACTTACATCAGGGCTGTGTGCTTACCACAGGCACAGTGCAGGGGGAGCACA 1062  
Cyp11b3\_DNA GACACTCCACTTACAGCAGGGCTGTGTGCTTACCACAGGCACAGTGCAGGGGGAGCACA 1046  
\*\*\*\*\*  
Cyp11b1\_DNA GATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAGCTGCACCAGGTGGAGAGTATCCT 1118  
Cyp11b2\_DNA GATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAGCTGCACCAGGTGGAGAGTATCCT 1122  
Cyp11b3\_DNA GATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAGCTGCACCAGGTGGAGAGTATCCT 1106  
\*\*\*\*\*  
Cyp11b1\_DNA CCCGCATCGGATGCCCTGGAGCCGTGGGTGGCCACAGGGAATCCGTGGCCTGAGACG 1178  
Cyp11b2\_DNA CCCGCCTCGGATGCACCTGGAGCCGTGGGTGGCCACAGGGAATCCGTGGCCTGAGACG 1182  
Cyp11b3\_DNA CCCGCCTCGGATGACGCTGGAGTCGTGGGTGGCCACAGGGAATCCGTGGCCTGAGACG 1166  
\*\*\*\*\*  
Cyp11b1\_DNA TGGTGTGTTCTTGCTGTGAGTGGACATTGGGAATGAGGAGGGAGGTGAGATTGGAGTCT 1238  
Cyp11b2\_DNA TGGTGTGTTCTTGCTGTGAGTGGACATTGGGAATGAGGAGGGAGGTGAGATCTGTGCC 1242  
Cyp11b3\_DNA TGGTGTGTTCTTGCTGTGAGTGGACATTGGGAATGAGGAGGGAGGTGAGATTGGAGTCT 1226  
\*\*\*\*\*  
Cyp11b1\_DNA GAACACAGGATGCAGAACTGGCTGGGGTGG--ATATGAAGACCAGTCTCTGACAAGCATA 1296  
Cyp11b2\_DNA --ACACAAGATGCAGATCCTGTTGGGTGGTGGTATGGAGATCAGTCACAGCCAAGCCTG 1300 **R1**  
Cyp11b3\_DNA GAACACAGGATGCAGAACTGGCTGGGGTGG--ATATGAAGACCAGTCTCTGACAAGCATA 1284  
\*\*\*\*\*  
Cyp11b1\_DNA AATTGTAGTATGTATGATGAGGTTTGGGGTCTGGGGAGGAGAGATGGCCAAACAGC 1356  
Cyp11b2\_DNA GGTCGATACCATGCCATGCAGATCCT--GGGCTGAGGAGGAGGGAGGTAGCAGAGGAGT 1358  
Cyp11b3\_DNA AATTGTAGTATGTATGATGAGGTTTGGGGTCTGGGGAGGAGGAGATGGCCAAACAGC 1344  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA ACTTGCT-CTCAACATCCCTTTCCAGTCTCCTTCCCTTAGGTCAAAACACTGCTCCA-- 1413  
Cyp11b2\_DNA GCCTCTTGTTCAGCTTCTGTTTGAATAGGTTTTCTAGAGTGTGGCTCTCTTCCCTA 1418  
Cyp11b3\_DNA ACTTGCT-CTCAACATCCCTTTCCAGTCTCCTTCCCTTAGGTCAAAACACTGCTCCA-- 1401 **R2**  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA -----GGAAGGTGGGGTAAAA-----GACCCCTGGATGAAGGTACAGCCAGCTTC 1460  
Cyp11b2\_DNA CCAGTTGCAAGGTGGCCAGAATGGGAGGGGCACTGGCTTAGAGTCATAGCCTGTATC 1478  
Cyp11b3\_DNA -----GGAAGGTGGGGTAAAA-----GACCCCTGGATGAAGGTACAGCCAGCTTC 1448  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA CTCCATAGCCTGATATCCAACAACATGGATTGTTTCCCTAGGGGATGCTTTACTCACAG 1520  
Cyp11b2\_DNA TGCCACAGCCTG-TATCCAGCAATGAAGTCTTCTTTTGTAGGGGTAATTTTGTCTCCAG 1537  
Cyp11b3\_DNA CTCCATAGCCTGATATCCAACAACATGGATTGTTTCCCTAGGGGATGCTTTACTCACAG 1508  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA AGATTTGGGCTAGACGGTCTGGGGACGAAGGGGTGGAGAG-AGGGAGTTGGCAGCTCTT 1579  
Cyp11b2\_DNA AGATTTGAGATAGATTGCTCTGGGCTGAAGGGATAGAGAACAAGGAGTTGG-AGCTCCT 1596  
Cyp11b3\_DNA AGATTTGGGCTAGACGGTCTGGGGACGAAGGGGTGGAGAG-AGGGAGTTGGCAGCTCTT 1567  
\*\*\*\*\*  
Cyp11b1\_DNA GTGGGCTCACAATCAAACTAATAAAGGTGGTGGAGAGAGGGG-----CTCCTAT-- 1629  
Cyp11b2\_DNA GTGGACTCATAGTCAAA-CTGAGTAAGGTGGTAAGAGAGGGGAGAGTCTCTCCCGCAG 1655  
Cyp11b3\_DNA GTGGGCTCACAATCAAACTAATAAAGGTGGTGGAGAGAGGGG-----CTCCTAT-- 1617  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA -TGGCTTAGTCTGT-GTGAAGTCAAAAGGTGTCCTTCTGCTGAGAATGAA----- 1678  
Cyp11b2\_DNA CTAGATGGACATCTAGAGAGCTAAGCAGGGGCTCTTGGTCTTGGAGTGGATAGGCTGGA 1715  
Cyp11b3\_DNA -TGGCTTAGTCTGT-GTGAAGTCAAAAGGTGTCCTTCTGCTGAGAATGAA----- 1666  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA AAAGGAGGT-----GATGGACAGCTACCCGAG 1705  
Cyp11b2\_DNA AAGAGAGGCCACTAGTGGGTATTGGTAAGCCTGCCAAGGGAAGACACATGGGTACACCAG 1775  
Cyp11b3\_DNA AAAGGAGGT-----GATGGACAGCTACCCGAG 1693  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA ACCACAT-AAAGAGCAGTGTCTTCT--AGTAATGGCTA-GAGAGATGAGGACCTTGG-- 1759  
Cyp11b2\_DNA GCCATGTCAGAGGGAATCTTTTGTGAAAAAATAGTTTGGGAAATAGGCACATGGGTT 1835  
Cyp11b3\_DNA ACCACAT-AAAGAGCAGTGTCTTCT--AGTAATGGCTA-GAGAGATGAGGACCTTGG-- 1747  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA --AACCTTGTGTC---TGAAATC--ACCTGGAAGC---ATGGAAATGCT----- 1796  
Cyp11b2\_DNA TGACACTTACCAGATGGAGTCTGGCAGGGAGCCAGATGCAAAATGGCAGCTTCGGGCAGT 1895  
Cyp11b3\_DNA --AACCTTGTGTC---TGAAATC--ACCTGGAAGC---ATGGAAATGCT----- 1784  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA -----CAAGAGGCACTGGGGACAC---GAATGTGCATGTGT-----CATATATGT-TG 1840  
Cyp11b2\_DNA GTGAGCATGAGCCTCTGAGAAGGTAGGGAGCCCATATGTGTGCAAGTCCATACATGTGTG 1955  
Cyp11b3\_DNA -----CAAGAGGCACTGGGGACAC---GAATGTGCATGTGT-----CATATATGT-TG 1828  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA TATACTTG---GGGTACTTGACT---TGTATTTTTTGAAGCGTGACCCTGTGACGTGT 1894  
Cyp11b2\_DNA TAAAGATGCTGT 2015  
Cyp11b3\_DNA TATACTTG---GGGTACTTGACT---TGTATTTTTTGAAGCGTGACCCTGTGACGTGT 1882  
\* \* \* \* \*  
Cyp11b1\_DNA CCAGATATAGAACT---TGACTCTCTAAAGGAATATGTATGGCTGCTCAG--AGTACT-- 1947  
Cyp11b2\_DNA CTGCATCTGTGACTTTTGTGTGTTTATGTCTTTATGCATGACTGTTTGTGTGTGTGT 2075  
Cyp11b3\_DNA CCAGATATAGAACT---TGACTCTCTAAAGGAATATGTATGGCTGCTCAG--AGTACT-- 1935  
\* \* \* \* \*





```

Cyp11b1_DNA      GACCAGCCTAAGGCCTTGGGAATGAGAAGCCAGAGGCATGGGAACAGTGCAAAAAGGGAC 4147
Cyp11b2_DNA      CATCAG-----GTCTTATAAC----AAGTTAGATGAAT----ACAGAGT----- 4006
Cyp11b3_DNA      GACCAGCCTAAGGCCTTGGAACTGAGAAGCCAGAGGCATGGGAACAGTGCAAAAAGGGAA 4123
* * * * *
Cyp11b1_DNA      CAGGAGGCCATGAAAGGGAGTCTGACAAGTGAGAATTGTATGCCTACACTCCAGGGCAG 4207
Cyp11b2_DNA      TAGCATGCCAGGTGGAG-----CATGGAGG 4032
Cyp11b3_DNA      CAGAGAGCCATGAAAGGGAGTCTGACAAGTGAGAATTGTATGCCTACACTCCAGGGCAG 4183
** * * * * *
Cyp11b1_DNA      CAAGCTACTGAAGCAGGGACACACGGCCAGATGAGGCCAACAAAGAATCTGGGCCCCATA 4267
Cyp11b2_DNA      CAGGCTG-GTGACATCGGGGGA-----GAGGCT--TCAGAGGCTGTTTCT---- 4074
Cyp11b3_DNA      CAAGCTACGTGAAGCAGGGACACACGGCCAGATGAGGCCAACAAAGAATCTGGGCCCCATA 4243
** * * * * *
Cyp11b1_DNA      AGGAAGGGCCATGTACCATGTCCAATGCCAATCAGGCAGCATAAACCCAGGTTGATATGT 4327
Cyp11b2_DNA      ---GTGGGC--TGTGACATAACAAGAGACAATCTGGATATAGACGCCCAAG-----GC 4122
Cyp11b3_DNA      AGGAAGGGCCATTTACCATGTCCAATGCCAATCAGGCAGCATAAACCCAGGTTGATATGT 4303
* * * * *
Cyp11b1_DNA      TCAGTGTACAGCATAGAAATCTAATGGTGACTT-----GAGAGAGAGAGAGAG 4376
Cyp11b2_DNA      TCATTCT-----GGAACCTA----TCACT----- 4142
Cyp11b3_DNA      TCAGTGTACAGCATAGAAACCTAATGGTGACTTCAGAGGAGAATGAGAGAGAGAGAGAGA 4363
* * * * *
Cyp11b1_DNA      GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCTCTCAGAGACTGTTTT 4436
Cyp11b2_DNA      -----GAAGCAAGAAGAGGTAGGGTGGGGAAACATGGACCTATTTCAT-GCCTGCACA 4193
Cyp11b3_DNA      GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCTCTCAGAGACTGTTTA 4423
* * * * *
Cyp11b1_DNA      GTGGATCTAGAGGCTCAGGGCTTACACAGGTCAGGAGGGGTCAATGTGAAATGTTGTGAC 4496
Cyp11b2_DNA      GTGA-----GGTCAGTGTGAGAG-GCCCGAGGACAGTCATTG---GCATTAAGGC 4240
Cyp11b3_DNA      GTGGATCTAGAGGCTCAGGGCTTACAGAGGTCAGGAGGGGTCAATGTGAAATGTTGTGAC 4483
* * * * *
Cyp11b1_DNA      CAATTAGAGATATGGACCATAAAGGGCAATCCAAGGGGCATATGGAAGGCCAAGTCCCTC 4556
Cyp11b2_DNA      -ACTTGGAAATATAGA--GTGGCCATGTCTTACGTGACAC-----CCAGGTACCAC 4289
Cyp11b3_DNA      CAATTAGAGATATGGACCATAAAGGACAATCCAAGGGGCATGTGGAAGGCCAAGTCCCTC 4543
* * * * *
Cyp11b1_DNA      TTAATGGGCACCAGATCAGGTCTAAATCACAAAACTCTGAAGTGTGAGGTTGTTGGTG 4616
Cyp11b2_DNA      T----GCGTACCAGAGCAGGCTGTGAACGCCAGA-CTATAAAGGTGCTGAGACAGTGGCC 4344
Cyp11b3_DNA      TCAATGGGCACCAGATCAGGTCTAAATCAGCAAAACTCTGAAGTGTGAGGTTGTTGGTG 4603 F5
* * * * *
Cyp11b1_DNA      GGGAAATACCATGTAGGGATTTTTCCCTCAGGATGTAGGGCAAGGAGTTCAGGTGAAT 4676
Cyp11b2_DNA      AGGACTGGGGTGTCTGTAGCCTGT--CTCTCAGGACTTAGAGCAAGGATCCAGGCAGAC 4402
Cyp11b3_DNA      GGGAAATACCATGTAGGGATTTTTCCCTCAGGATGTAGGGCAAGGAGTTCAGGTGAAT 4663
* * * * *
Cyp11b1_DNA      ATTAGAGTGG---GTCAGAGTCTC-----ACTTTGCTATGCCCATGCTCTTTCCT 4723
Cyp11b2_DNA      ATTAGAGTGGAGGTCATGGCTCCCTGGGTCTTATTCTGCTATGCCCATGCAATTTTCCT 4462 F4
Cyp11b3_DNA      ATTAGAGTGG---GTCAGAGTCCC-----ACTTTGCTATGTCATGCACTTTCCT 4710
* * * * *
Cyp11b1_DNA      CAGGGGAGGGCATCTTTGTAGTAGCAATGCCCTTTGGGAGGCTGCTCGAGATTGCTCTCT 4783
Cyp11b2_DNA      CAGAGGAGGGCATCTTTGTAGTAGCAATGCCCTTCGGGAGGCTGCTCGAGATTGCTCTCT 4522
Cyp11b3_DNA      CAGGGGAGGGCATCTTTGTAGTAGTGTATGCCCTTTGGGAGGCTGCTCGAGATTGCTCTCT 4770
* * * * *
Cyp11b1_DNA      GGCTCCTGCAGACAGCAATCTCCTTGGTAATGACCCCTTTTGGAGCTGGCTCGGAACCCAG 4843
Cyp11b2_DNA      GGCTCCTGCAGACAGCAATCTCCTTGGTAATGACCCCTTTTGGAGCTGGCTCGGAACCCAG 4582
Cyp11b3_DNA      GGCTCCTGCAGACAGCAATCTCCTTGGTAATGACCCCTTTTGGAGCTGGCTCGGAACCCAG 4830
* * * * *
Cyp11b1_DNA      ATGTTTCAGCAGGCCCTGCGGCAGGAGAGCCTAGCAGCTGAGGCCAGCATCGTTGCTAATC 4903
Cyp11b2_DNA      ATGTTTCAGCAGGCCCTGCGGCAGGAGAGCCTGCGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATC 4642
Cyp11b3_DNA      ATGTTTCAGCAGGCCCTGCGGCAGGAGAGCCTGCGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATC 4890
* * * * *
Cyp11b1_DNA      CCCAGAAGGCCATGTGACAGCTGCCCTTGTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGT 4963
Cyp11b2_DNA      CCCAGAAGGCCATGTGACAGCTGCCCTTGTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGT 4702
Cyp11b3_DNA      CCCAGAAGGCCATGTGACAGCTGCCCTTGTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGT 4950
* * * * *
Cyp11b1_DNA      AGGTGCTGACTGCCCTTCCCTTCCCTGCTGTCCAGTATTCTCTATTATCTGGGGCAGAAGA 5023
Cyp11b2_DNA      AGGTGCTGACTGCCCTTCCCTTCCCTGCTGTCCAGTATTCTCTATTATCTGGGGCAGAAGA 4762
Cyp11b3_DNA      AGGTGCTGACTGCCCTTCCCTTCCCTGCTGTCCAGTATTCAATCTTTTCAGGGGCAGAGGA 5010
* * * * *
Cyp11b1_DNA      CTGCCATGTTCTCTACTCTCCTTCCCTGTTGGTTGGT-GCCGTTGTTCCCTTTGGAGGTTGGT 5082
Cyp11b2_DNA      CAGCCATGTTCTCTACTCTCCTTCCCTGTTGGTTGGGAGCTGTTGTTCCCTTGGAGGTTGGC 4822
Cyp11b3_DNA      CGGCCATGTTCTCTACTCTCCTTCCCTGTTGGTTGGGAGCTGTTGTTCCCTTGGAGGTTGGC 5070 R5
* * * * *
Cyp11b1_DNA      TGAGCTCCACAGAAGTCTGAGCCACACCTCTCAAGGATCTGAGGGAGGAAGGTGCAGATG 5142
Cyp11b2_DNA      TGAGCTCCACAGAGCCGGGAGCCACACCCCTGGAGGTTCTGAGGGAGGAAGGTGCAGATG 4882 R4; F5
Cyp11b3_DNA      TGAGCTCCACAGAGCTGGGAGCCACACCCCTCAAGTATCTGAGGGAGGAAGGTGCAGATG 5130 F6
* * * * *

```

Cyp11b1_DNA	TGGGCAGGAGAAGCCCTCATTCTGAGGCCCTTGCTGCTTCTCCTCATCTCCAGGCTCT	5202
Cyp11b2_DNA	TGGGCAGGAGAAGCCCTCATTCTGAGGCCCTTGCTGCTTCTCCTCATCTCCAGACTCT	4942
Cyp11b3_DNA	TGGGCAGGAGAAGCCCTCATTCTGAGGCCCTTGCTGCTTCTCCTCATCTCCAGGCTCT	5190
	*****	
Cyp11b1_DNA	ACCCTGTTGGTAGCTTTGTAGAGAGAATCGTACACTCAGACCTGGTGGCTTCAGAACTATC	5262
Cyp11b2_DNA	ACCCTGTTGGTGGCTTTTGGAGAGAATCCTAAACTCAGACCTGGTGGCTTCAGAACTATC	5002
Cyp11b3_DNA	ACCCCATTTGGTAGCTTTTGGAGAGAATCGTAGACTCAGACCTGGTGGCTTCAGAACTATC	5250
	*****	
Cyp11b1_DNA	ATGTCCTCGTGGGGTGAGTGATCTTATGCCCCTTACCAACTGACCTTCCCTCTATCTCC	5322
Cyp11b2_DNA	ATGTCCTCGTGGGGTGAGTGATCTTATACCCCTACCAATTGCCCTTCCCTCTATCTCC	5062
Cyp11b3_DNA	ATGTCCTCGTGGGGTGAGTGATCTTATGCCCCTACCAATTGCCCTTCCCTCTATCTCC	5310
	*****	
Cyp11b1_DNA	TCAAAAAGCAGCTGAACCTACCCCTGGCCCTGCCCCACAGACATTCGTCATAATTTATC	5382
Cyp11b2_DNA	TCAAAAAGCAGCTGAACCTACCCCTGGCCCTGCCCCACAGACATTCGTCATAATTTATC	5122
Cyp11b3_DNA	TCAAAAAGCAGCTGAACCTACCCCTGGCCCTGCCCCACAGACATTCGTCATAATTTATC	5369
	*****	
Cyp11b1_DNA	TGTACTCCATGGGCCGAAACCCGTCAGTGTTCACCAAGACCTGAGCGCTATATGCCTCAGC	5442
Cyp11b2_DNA	TGTACTCCATGGGCCGAAACCCGTCAGTGTTCACCAAGACCTGAGCGCTATATGCCTCAGC	5182
Cyp11b3_DNA	TGTACTCCATGGGCCGAAACCCGTCAGTGTTCACCAAGACCTGAGCGCTATATGCCTCAGC	5429
	*****	
Cyp11b1_DNA	GCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTGGCCCTTCGGCTTTGGGATGCGCCAGT	5502
Cyp11b2_DNA	GCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTGGCCCTTCGGCTTTGGGATGCGCCAGT	5242
Cyp11b3_DNA	GCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTGGCCCTTCGGCTTTGGGATGCGCCAGT	5489
	*****	
Cyp11b1_DNA	GCCTGGGGCGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTCCTGCTTCACCATGTGAGCACCT	5562
Cyp11b2_DNA	GCCTGGGGCGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTCCTGCTTCACCATGTGAGCACCT	5302
Cyp11b3_DNA	GCCTGGGGCGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTCCTGCTTCACCATGTGAGCACCT	5549
	*****	
Cyp11b1_DNA	CTGGGTGGG-----CCTGTGAGTTTCAGGGTGTGATGGGCAGTATTGGAAACAAAAGC	5616
Cyp11b2_DNA	CTGGGTGGG-----CCTGTGAGTTTCAGGGTGTGATGGGCAGTATTGGAAACAAAAGC	5356
Cyp11b3_DNA	ATGGGTGGGATGTGCCTGTGCGATTAGGGTGTGATGGGCAGTATTGGAAACAAAAGC	5609
	*****	
Cyp11b1_DNA	ATAGGCCTTCAGGCCTCTATTTGGTCTTCCTGTGTTGGTGAATTCTCTAGAGCAGGACT	5676
Cyp11b2_DNA	ATAGGCCTTCAGGCCTCTATTTGGGCTTCGTTGTGTTGGTGAATTCTCTAGAGCAGGACT	5416
Cyp11b3_DNA	ATAGGCCTTCAGGCCTCTATTTGGGCTTCGTTGTGTTGGTGAATTCTCTAGAGCAGGACT	5669
	*****	
Cyp11b1_DNA	GGACCCCTCAGGCCTCCACAGGAAGTCTAGTTTCAGCATGGTGGCTGCACTAAACAATTT	5736
Cyp11b2_DNA	GGACCCCTCAGGCCTCCACAGGAAGTCTAGTTTCAGCATGGTGGCTGCACTAAACAATTT	5476
Cyp11b3_DNA	GGACCCCTCAGGCCTCCAAAGGATGCTCCTAGTTTCAGCATGGTGGCTGCACTAAACAATTT	5729
	*****	
Cyp11b1_DNA	AGCAGTAGATGGGCCAGTGTCTGCCCCTGCTGAGGAGGCCATAAGGACCCCCC-TTTGTG	5795
Cyp11b2_DNA	AGCAGTAGATGGGCCAGTGTCTGCCCCTGCTGAGGAGGCCATAAGGACCCCCC-GTTGTC	5535
Cyp11b3_DNA	AGCAGTAGATGGGCCAGTGTCTGCCCCTGCTGAGGAGGCCATAAGGACCCCCC-TTTGTG	5789
	*****	
Cyp11b1_DNA	TTCCAGATGCTGAAAACCTTCCAAGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATATGCAGATGGTT	5855
Cyp11b2_DNA	TTCCAGATGCTGAAAACCTTCCAAGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATATGCAGATGGCC	5595
Cyp11b3_DNA	TTCCAGATGCTGAAAACCTTCCAAGTGGAGACACTGAGGCAAGAGGATATGCAGATGGCC	5849
	*****	
Cyp11b1_DNA	TTTCGCTTTCTTTTGTATGCCAGCTCTAGTCTTTCTTACTTTCCGGCCTGTGAGCTAG	5915
Cyp11b2_DNA	TATCGCTTTGTTTGTATGCCAGCTCTAGTCTTCTTACTTTCCGGCCTGTGAGCTAG	5655
Cyp11b3_DNA	TATCGCTTTGTTTGTATGCCAACCCTAGACTCGTCTCCTCACTATCCGGCCTGTGAGCTAG	5909
	*****	
Cyp11b1_DNA	TCACCTTACATCTGGGGCCCTAGTCAGTCCACCAGCCTACCTCTGTCTGACACCCAAGG	5975
Cyp11b2_DNA	TCACCTTACATCTGGGGCCCTAATCAGTCCACCAGCCTACTTCTGTCTGACGCCAAGG	5715
Cyp11b3_DNA	TCACCTTACATCTGGGGCCCTAGTCAGTCCACCAGCCTACCTCTGTCTGACACCCAAGG	5969
	*****	
Cyp11b1_DNA	TCACACTTCTGCCAGCAGAAATTTTGTGGGGAGGA--GGTCACACTGTATCATTC	6032
Cyp11b2_DNA	TCACGCTTCTGCCAGCAGAAATCTTGGGGGGGGGAAGAGGTCACATTTGTCATCATTC	5775
Cyp11b3_DNA	TCATGCTTCTGCCAGCAGAAATTTTGTGGGGAGGA--GGTCACACTGTATCATTC	6026
	*****	
Cyp11b1_DNA	AACACAAGTGTACACAGTTTACAGCTGAAGACCTCCAGCATCAGGTACAAGCAAGGCCAG	6092
Cyp11b2_DNA	AACACAAGTGTACACAGTTTACAGCTGAAGACCTCCAGCATCAGGTACAAGCAAGGCCAG	5835
Cyp11b3_DNA	AACACAAGTGTACACAGTTTACAGCTGAAGACCTCCAGCATCAGGTACAAGCAAGGCCAG	6086
	*****	
Cyp11b1_DNA	GGAAGAGATTAGGACTATCTTCAGGGCAATAAGTAGTCTCTCCTGAGCGGTCTTCCCAT	6152
Cyp11b2_DNA	GGAAGAGATTAGGACTATCTTCAGGGCAATAAGTAGTCTCTCCTGAGCGGTCTTCCCAT	5895
Cyp11b3_DNA	GGAAGAGATTAGGACTATCTTCAGGGCAATAAGTAGTCTCTCCTGAGTGGTCTTCCCAT	6146
	*****	
Cyp11b1_DNA	TCTTTCCAACGGTCACTCCAGGTGGCCACGGCCTTTAAAGGGTCTCAGAGTAAAGCCAGA	6212
Cyp11b2_DNA	TCTTTCCAACGGTCACTCCAGGTGGCCACGGCCTTTAAAGGGTCTCAGAGTAAAGCCAGA	5955
Cyp11b3_DNA	TCTTTCCAACGGTCACTCCAGGTGGCCACAGCCTTTAAAGGGTCTCAGAGTAAAGCCAGA	6206
	*****	

R5; F6

R6  
R6

\*denotes nucleotide identity among 3 genes. The initiation and termination codons are highlighted in red. Exons are marked in grey blocks. PCR primer pairs, F1/R1 until F6/F6, were utilized to amplify segments of *Cyp11b2* and *Cyp11b3* for direct sequencing and are underlined and in bold.

**Supplement 2. Coding sequence alignment of 11-beta-hydroxylase (*Cyp11b1*) among Dahl salt-sensitive (DSS), Lewis and Dahl salt-resistant (DSR) strains**

```

M A L R V T A D V W L A R P W Q C L H R
Cyp11b1-DSS      ATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAGACCCTGGCAGTGCCTGCACAGG 60
Cyp11b1-Lewis   ATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAGACCCTGGCAGTGCCTGCACAGG 60
Cyp11b1_DSR     ATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAGACCCTGGCAGTGCCTGCACAGG 60
*****
T R A L G T T A K V A P K T L K P F E A
Cyp11b1-DSS      ACGAGGGCACTGGGCACTACGGCAAAAGTGGCCCCAAGACACTGAAGCCCTTTGAAGCC 120
Cyp11b1-Lewis   ACGAGGGCACTGGGCACTACGGCAAAAGTGGCCCCAAGACACTGAAGCCCTTTGAAGCC 120
Cyp11b1_DSR     ACGAGGGCACTGGGCACTACGGCAAAAGTGGCCCCAAGACACTGAAGCCCTTTGAAGCC 120
*****
I P Q Y S R N K W L K M I Q I L R E Q G
Cyp11b1-DSS      ATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGAGAGCAGGGC 180
Cyp11b1-Lewis   ATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGAGAGCAGGGC 180
Cyp11b1_DSR     ATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGAGAGCAGGGC 180
*****
Q E N L H L E M H Q A F Q E L G P I F R
Cyp11b1-DSS      CAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCCTTCCAAGAGCTGGGGCCCATTTTCAGG 240
Cyp11b1-Lewis   CAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCCTTCCAAGAGCTGGGGCCCATTTTCAGG 240
Cyp11b1_DSR     CAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCCTTCCAAGAGCTGGGGCCCATTTTCAGG 240
*****
H S A G G A Q I V S V M L P E D A E K L
Cyp11b1-DSS      CACAGTGCAGGGGGAGCACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAGCTG 300
Cyp11b1-Lewis   CACAGTGCAGGGGGAGCACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAGCTG 300
Cyp11b1_DSR     CACAGTGCAGGGGGAGCACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAGCTG 300
*****
H Q V E S I L P H R M P L E P W V A H R
Cyp11b1-DSS      CACCAGTGGAGAGTATCCTCCCGCATCGGATGCCCTGGAGCCGTGGGTGGCCACAGA 360
Cyp11b1-Lewis   CACCAGTGGAGAGTATCCTCCCGCATCGGATGCCCTGGAGCCGTGGGTGGCCACAGA 360
Cyp11b1_DSR     CACCAGTGGAGAGTATCCTCCCGCATCGGATGCCCTGGAGCCGTGGGTGGCCACAGA 360
*****
E L R G L R R G V F L L N G A D W R F N
Cyp11b1-DSS      GAACTCCGTGGCCTGAGACCGTGGTGTGTTCTTGCTAAATGGGGCAGACTGGCGCTTCAAC 420
Cyp11b1-Lewis   GAACTCCGTGGCCTGAGACCGTGGTGTGTTCTTGCTAAATGGGGCAGACTGGCGCTTCAAC 420
Cyp11b1_DSR     GAACTCCGTGGCCTGAGATCGTGGTGTGTTCTTGCTAAATGGGGCAGACTGGCGCTTCAAC 420
*****
R L Q L N P N M L S E K A I Q S F V P F
Cyp11b1-DSS      CGACTGCAGCTGAATCCAAATATGCTGTCACCAAAAAGCCATTCAATCTTTGTCCCTTT 480
Cyp11b1-Lewis   CGACTGCAGCTGAATCCAAATATGCTGTCACCAAAAAGCCATTCAATCTTTGTCCCTTT 480
Cyp11b1_DSR     CGACTGCAGCTGAATCCAAATATGCTGTCACCAAAAAGCCATTCAATCTTTGTCCCTTT 480
*****
V D V V A R D F V E N L K K R M L E N V
Cyp11b1-DSS      GTGGATGTGGTAGCAAGGGACTTTGTGGAAAACCTGAAGAAGAGAATGCTGGAGAATGTT 540
Cyp11b1-Lewis   GTGGATGTGGTAGCAAGGGACTTTGTGGAAAACCTGAAGAAGAGAATGCTGGAGAATGTT 540
Cyp11b1_DSR     GTGGATGTGGTAGCAAGGGACTTTGTGGAAAACCTGAAGAAGAGAATGCTGGAGAATGTT 540
*****
H G S M S I N I Q S N M F N Y T M E A S
Cyp11b1-DSS      CATGGAAGCATGTCTATAAACATTTCAGTCCAATATGTTCAACTATAACCATGGAAGCCAGC 600
Cyp11b1-Lewis   CATGGAAGCATGTCTATAAACATTTCAGTCCAATATGTTCAACTATAACCATGGAAGCCAGC 600
Cyp11b1_DSR     CATGGAAGCATGTCTATAAACATTTCAGTCCAATATGTTCAACTATAACCATGGAAGCCAGC 600
*****
H F V I S G E R L G L T G H D L K P E S
Cyp11b1-DSS      CATTTTGTTATTTCCGGAGAGCGTCTGGGCCCTCACAGGCCATGACCTGAAACCTGAGAGC 660
Cyp11b1-Lewis   CATTTTGTTATTTCCGGAGAGCGTCTGGGCCCTCACAGGCCATGACCTGAAACCTGAGAGC 660
Cyp11b1_DSR     CATTTTGTTATTTCCGGAGAGCGTCTGGGCCCTCACAGGCCATGACCTGAAACCTGAGAGC 660
*****
V T F T H A L H S M F K S T T Q L M F L
Cyp11b1-DSS      GTGACATTCACTCATGCTCTGCACCTCAATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCATGTTCTTA 720
Cyp11b1-Lewis   GTGACATTCACTCATGCTCTGCACCTCAATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCATGTTCTTA 720

```

Cyp11b1\_DSR GTGACATTCACTCATGCTCTGCCTCAATGTTCAAGTCCACCACAGCTCATGTTCTTA 720  
 \*\*\*\*\*  
 P K S L T R W T S T R V W K E H F D S W  
 Cyp11b1-DSS CCAAGAGCTTGACTCGTTGGACAAGCACCCGGGTGTGGAAAGAACACTTTGATTCTCTGG 780  
 Cyp11b1-Lewis CCAAGAGCTTGACTCGTTGGACAAGCACCCGGGTGTGGAAAGAACACTTTGATTCTCTGG 780  
 Cyp11b1\_DSR CCAAGAGCTTGACTCGTTGGACAAGCACCCGGGTGTGGAAAGAACACTTTGATTCTCTGG 780  
 \*\*\*\*\*  
  
 D I I S E Y V T K C I K N V Y R E L A E  
 Cyp11b1-DSS GATATCATCTCTGAGTATGTACAAAATGTATCAAGAATGTGTATCGCGAACTGGCAGAG 840  
 Cyp11b1-Lewis GATATCATCTCTGAGTATGTACAAAATGTATCAAGAATGTGTATCGCGAACTGGCAGAG 840  
 Cyp11b1\_DSR GATATCATCTCTGAGTATGTACAAAATGTATCAAGAATGTGTATCGCGAACTGGCAGAG 840  
 \*\*\*\*\*  
 G R Q Q S W S V I S E M V A Q S T L S M  
 Cyp11b1-DSS GGTCGCCAACAGTCTGGAGTGTATATCCGAGATGGTAGCACAGAGTACTCTGTCAATG 900  
 Cyp11b1-Lewis GGTCGCCAACAGTCTGGAGTGTATATCCGAGATGGTAGCACAGAGTACTCTGTCAATG 900  
 Cyp11b1\_DSR GGTCGCCAACAGTCTGGAGTGTATATCCGAGATGGTAGCACAGAGTACTCTGTCAATG 900  
 \*\*\*\*\*  
 D A I H A N S M E L I A G S V D T T A I  
 Cyp11b1-DSS GATGCCATCCATGCCAACTCAATGGAACATTATTGCTGGAAGTGTGACACGACAGCAATC 960  
 Cyp11b1-Lewis GATGCCATCCATGCCAACTCAATGGAACATTATTGCTGGAAGTGTGACACGACAGCAATC 960  
 Cyp11b1\_DSR GATGCCATCCATGCCAACTCAATGGAACATTATTGCTGGAAGTGTGACACGACAGCAATC 960  
 \*\*\*\*\*  
 S L V M T L F E L A R N P D V Q Q A L R  
 Cyp11b1-DSS TCCTTGTAATGACCCTTTTTGAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTTCAGCAGGCCCTGCGG 1020  
 Cyp11b1-Lewis TCCTTGTAATGACCCTTTTTGAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTTCAGCAGGCCCTGCGG 1020  
 Cyp11b1\_DSR TCCTTGTAATGACCCTTTTTGAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTTCAGCAGGCCCTGCGG 1020  
 \*\*\*\*\*  
 Q E S L A A E A S I **V** A N P Q K A M S D  
 Cyp11b1-DSS CAGGAGACCTAGCAGCTGAGGCCAGCATCGTTGCTAATCCCAGAAGGCCATGTCAGAC 1080  
 Cyp11b1-Lewis CAGGAGACCTAGCAGCTGAGGCCAGCATCGTTGCTAATCCCAGAAGGCCATGTCAGAC 1080  
 Cyp11b1\_DSR CAGGAGACCTAGCAGCTGAGGCCAGCATCGTTGCTAATCCCAGAAGGCCATGTCAGAC 1080  
 \*\*\*\*\*  
 L P L L R A A L K E T L R L Y P V G S F  
 Cyp11b1-DSS CTGCCCTTGCTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGCTCTACCCCTGTTGGTAGCTTT 1140  
 Cyp11b1-Lewis CTGCCCTTGCTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGCTCTACCCCTGTTGGTAGCTTT 1140  
 Cyp11b1\_DSR CTGCCCTTGCTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGCTCTACCCCTGTTGGTAGCTTT 1140  
 \*\*\*\*\*  
**V** E R **I** V H S D L V L Q N Y H V P A G T  
 Cyp11b1-DSS GTAGAGAGATCGTACACTCAGACCTGGTGCTTCAGAACTATCATGTCCCTGCTGGGACA 1200  
 Cyp11b1-Lewis GTAGAGAGATCGTACACTCAGACCTGGTGCTTCAGAACTATCATGTCCCTGCTGGGACA 1200  
 Cyp11b1\_DSR GTAGAGAGATCGTACACTCAGACCTGGTGCTTCAGAACTATCATGTCCCTGCTGGGACA 1200  
 \*\*\*\*\*  
**L** **L**  
 F V I I Y L Y S M G R N P A V F P R P E  
 Cyp11b1-DSS TTCGTCATAATTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCTGCAGTGTCCCAAGGCCTGAG 1260  
 Cyp11b1-Lewis TTCGTCATAATTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCTGCAGTGTCCCAAGGCCTGAG 1260  
 Cyp11b1\_DSR TTCGTCATAATTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCTGCAGTGTCCCAAGGCCTGAG 1260  
 \*\*\*\*\*  
 R Y M P Q R W L E R K R S F Q H L A F G  
 Cyp11b1-DSS CGCTACATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTGGCCTTCGGC 1320  
 Cyp11b1-Lewis CGCTACATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTGGCCTTCGGC 1320  
 Cyp11b1\_DSR CGCTACATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTGGCCTTCGGC 1320  
 \*\*\*\*\*  
 F G **V** R Q C L G R R L A E V E M L L L L  
 Cyp11b1-DSS TTTGGGCTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTCCTGCTT 1380  
 Cyp11b1-Lewis TTTGGGCTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTCCTGCTT 1380  
 Cyp11b1\_DSR TTTGGGCTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTCCTGCTT 1380  
 \*\*\*\*\*  
**M**  
 H H M L K T F Q V E T L R Q E D M Q M V  
 Cyp11b1-DSS CACCATATGCTGAAAACCTTCCAAGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATATGCAGATGGTT 1440  
 Cyp11b1-Lewis CACCATATGCTGAAAACCTTCCAAGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATATGCAGATGGTT 1440  
 Cyp11b1\_DSR CACCATATGCTGAAAACCTTCCAAGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATATGCAGATGGTT 1440  
 \*\*\*\*\*



```

F R F L L M P S S S P F L T F R P V S -
Cyp11b1-DSS      TTTCGCCTTCTTTTGTATGCCAGCTCTAGTCCTTTCCTTACTTCCGGCCTGTGAGCTAG 1500
Cyp11b1-Lewis   TTTCGCCTTCTTTTGTATGCCAGCTCTAGTCCTTTCCTTACTTCCGGCCTGTGAGCTAG 1500
Cyp11b1_DSR     TTTCGCCTTCTTTTGTATGCCAGCTCTAGTCCTTTCCTTACTTCCGGCCTGTGAGCTAG 1500
*****

```

\* indicates nucleotide identity among 3 strains. Nucleotide differences are marked by yellow colors. The changes in amino acids are designated in larger and bold letters. The DSR sequence was taken from *Nat Genet.* 1993;3:346-353 and *J Biol Chem.* 1993;268:9117-9121.

### Supplement 3. Alignment of *aldosterone synthase (Cyp11b2)* coding sequence among Dahl salt-sensitive (DSS), Lewis and Dahl salt-resistant (DSR) strains.

```

M A M A L R V T A D V W L A R P W Q C L
Cyp11b2-DSS      ATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAGACCTGGCAGTGCCTG 60
Cyp11b2-Lewis   ATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAGACCTGGCAGTGCCTG 60
Cyp11b2-DSR     -----ATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAGACCTGGCAGTGCCTG 54
*****
H R T R A L G T T A T L A P K T L K P F
Cyp11b2-DSS      CACAGGACGAGGGCAGTGGGCTACTACGGCAACACTGGCCCTAAGACACTGAAGCCCTTT 120
Cyp11b2-Lewis   CACAGGACGAGGGCAGTGGGCTACTACGGCAACACTGGCCCTAAGACACTGAAGCCCTTT 120
Cyp11b2-DSR     CACAGGACGAGGGCAGTGGGCTACTACGGCAACACTGGCCCTAAGACACTGAAGCCCTTT 114
*****
E A I P Q Y S R N K W L K M I Q I L R E
Cyp11b2-DSS      GAAGCCATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGGGAG 180
Cyp11b2-Lewis   GAAGCCATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGGGAG 180
Cyp11b2-DSR     GAAGCCATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGGGAG 174
*****
Q G Q E N L H L E M H Q A F Q E L G P I
Cyp11b2-DSS      CAGGGCCAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCTTCCAGGAGCTGGGGCCATT 240
Cyp11b2-Lewis   CAGGGCCAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCTTCCAGGAGCTGGGGCCATT 240
Cyp11b2-DSR     CAGGGCCAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCTTCCAGGAGCTGGGGCCATT 234
*****
F R H S A G G A Q I V S V M L P E D A E
Cyp11b2-DSS      TTCAGGCACAGTGCAGGGGAGCAGACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAG 300
Cyp11b2-Lewis   TTCAGGCACAGTGCAGGGGAGCAGACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAG 300
Cyp11b2-DSR     TTCAGGCACAGTGCAGGGGAGCAGACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAG 294
*****
K L H Q V E S I L P R R M H L E P W V A
Cyp11b2-DSS      AAGCTGCACCAGGTGGAGAGTATCCTCCCGCGTCGGATGCACCTGGAGCCGTGGGTGGCC 360
Cyp11b2-Lewis   AAGCTGCACCAGGTGGAGAGTATCCTCCCGCGTCGGATGCACCTGGAGCCGTGGGTGGCC 360
Cyp11b2-DSR     AAGCTGCACCAGGTGGAGAGTATCCTCCCGCGTCGGATGCACCTGGAGCCGTGGGTGGCC 354
*****
H R E L R G L R R G V F L L N G A E W R
Cyp11b2-DSS      CACAGGGAACCTCCGTGGCCTGAGACGTGGTGTCTTGTCTAAATGGGGCTGAATGGCGC 420
Cyp11b2-Lewis   CACAGGGAACCTCCGTGGCCTGAGACGTGGTGTCTTGTCTAAATGGGGCTGAATGGCGC 420
Cyp11b2-DSR     CACAGGGAACCTCCGTGGCCTGAGACGTGGTGTCTTGTCTAAATGGGGCAGACTGGCGC 414
*****
*****
F N R L K L N P N V L S P K A V Q N F V
Cyp11b2-DSS      TTCAACCGACTGAAACTGAACCCAAACGTGCTGTCCACAAAAGCTGTTCAAAATTTTGTG 480
Cyp11b2-Lewis   TTCAACCGACTGAAACTGAACCCAAACGTGCTGTCCACAAAAGCTGTTCAAAATTTTGTG 480
Cyp11b2-DSR     TTCAACCGACTGAAACTGAACCCAAACGTGCTGTCCACAAAAGCTGTTCAAAATTTTGTG 474
*****
P M V D E V A R D F L E A L K K V R Q
Cyp11b2-DSS      CCCATGGTGGACGAGGTAGCAAGGGACTTCTTGGAGGCCCTGAAAAAGAAGTGCCTGAG 540
Cyp11b2-Lewis   CCCATGGTGGACGAGGTAGCAAGGGACTTCTTGGAGGCCCTGAAAAAGAAGTGCCTGAG 540
Cyp11b2-DSR     CCCATGGTGGACGAGGTAGCAAGGGACTTCTTGGAGGCCCTGAAAAAGAAGTGCCTGAG 534
*****
N A R G S L T M D V Q Q S L F N Y T I E
Cyp11b2-DSS      AATGCTCGAGGGAGCCTTACCATGGATGTCCAGCAAAGTCTCTTCAACTACACTATAGAA 600
Cyp11b2-Lewis   AATGCTCGAGGGAGCCTTACCATGGATGTCCAGCAAAGTCTCTTCAACTACACTATAGAA 600
Cyp11b2-DSR     AATGCTCGAGGGAGCCTTACCATGGATGTCCAGCAAAGTCTCTTCAACTACACTATAGAA 594
*****
A S N F A L F F G E R L G L L G H D L N P
Cyp11b2-DSS      GCCAGCAACTTTGCACATTTTGGAGAGAGGCTGGGCCTCCTTGGTCATGACCTGAACCC 660
Cyp11b2-Lewis   GCCAGCAACTTTGCACATTTTGGAGAGAGGCTGGGCCTCCTTGGTCATGACCTGAACCC 660
Cyp11b2-DSR     GCCAGCAACTTTGCACATTTTGGAGAGAGGCTGGGCCTCCTTGGTCATGACCTGAACCC 654

```

```

*****
G S L K F I H A L H S M F K S T T Q L L
Cyp11b2-DSS GGTAGCCTGAAGTTCATCCATGCCTACATTCATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCCTG 720
Cyp11b2-Lewis GGTAGCCTGAAGTTCATCCATGCCTACATTCATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCCTG 720
Cyp11b2-DSR GGTAGCCTGAAGTTCATCCATGCCTACATTCATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCCTG 714
*****

F L P R S L T R W T S T Q V W K E H F D
Cyp11b2-DSS TTCTTACCCAGAAGCTTGACTCGCTGGACAAGCACCCAGGTTGGAAAGAACATTTTGTAT 780
Cyp11b2-Lewis TTCTTACCCAGAAGCTTGACTCGCTGGACAAGCACCCAGGTTGGAAAGAACATTTTGTAT 780
Cyp11b2-DSR TTCTTACCCAGAAGCTTGACTCGCTGGACAAGCACCCAGGTTGGAAAGAACATTTTGTAT 774
*****
R
*****

A W D V I S E Y A N R C I W K V H Q E L
Cyp11b2-DSS GCCTGGGATGTCATCTCTGAGTATGCCAACAGATGTATCTGGAAGGTGCACCAGGAAGCT 840
Cyp11b2-Lewis GCCTGGGATGTCATCTCTGAGTATGCCAACAGATGTATCTGGAAGGTGCACCAGGAAGCT 840
Cyp11b2-DSR GCCTGGGATGTCATCTCTGAGTATGCCAACAGATGTATCTGGAAGGTGCACCAGGAAGCT 834
*****

R L G S S Q T Y S G I V A A L I T Q G A
Cyp11b2-DSS AGACTCGGCAGCTCTCAGACCTACAGTGGCATTGTGGCAGCAGCTAATAAAGTCCAGGAGCT 900
Cyp11b2-Lewis AGACTCGGCAGCTCTCAGACCTACAGTGGCATTGTGGCAGCAGCTAATAAAGTCCAGGAGCT 900
Cyp11b2-DSR AGACTCGGCAGCTCTCAGACCTACAGTGGCATTGTGGCAGCAGCTAATAAAGTCCAGGAGCT 894
*****

L P L D A I K A N S M E L T A G S V D T
Cyp11b2-DSS TTACCTCTGGACGCCATCAAAGCCAACCTCTATGGAGCTCACTGCTGGGAGCGTTGACACG 960
Cyp11b2-Lewis TTACCTCTGGACGCCATCAAAGCCAACCTCTATGGAGCTCACTGCTGGGAGCGTTGACACG 960
Cyp11b2-DSR TTACCTCTGGACGCCATCAAAGCCAACCTCTATGGAGCTCACTGCTGGGAGCGTTGACACG 954
*****

T A I P L V M T L F E L A R N P D V Q Q
Cyp11b2-DSS ACAGCAATCCCCTTGGAATGACACTTTTTGAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTTCAGCAG 1020
Cyp11b2-Lewis ACAGCAATCCCCTTGGAATGACACTTTTTGAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTTCAGCAG 1020
Cyp11b2-DSR ACAGCAATCCCCTTGGAATGACACTTTTTGAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTTCAGCAG 1014
*****

A L R Q E T L A A E A S I A A N P Q K A
Cyp11b2-DSS GCCCTGCGGCAGGAGACCCTGGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATCCCAGAAAGGCC 1080
Cyp11b2-Lewis GCCCTGCGGCAGGAGACCCTGGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATCCCAGAAAGGCC 1080
Cyp11b2-DSR GCCCTGCGGCAGGAGACCCTGGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATCCCAGAAAGGCC 1074
*****

M S D L P L R A A L K E T L R L Y P V
Cyp11b2-DSS ATGTCAGACCTGCCCTTGCTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGACTCTACCTGTT 1140
Cyp11b2-Lewis ATGTCAGACCTGCCCTTGCTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGACTCTACCTGTT 1140
Cyp11b2-DSR ATGTCAGACCTGCCCTTGCTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGACTCTACCTGTT 1134
*****

G G F L E R I L N S D L V L Q N Y H V P
Cyp11b2-DSS GGTGGCTTTTTGGAGAGAATCCTAAACTCAGACCTGGTGCTTCAGAACTATCATGTCCCT 1200
Cyp11b2-Lewis GGTGGCTTTTTGGAGAGAATCCTAAACTCAGACCTGGTGCTTCAGAACTATCATGTCCCT 1200
Cyp11b2-DSR GGTGGCTTTTTGGAGAGAATCCTAAACTCAGACCTGGTGCTTCAGAACTATCATGTCCCT 1194
*****

A G T L V L L Y L Y S M G R N P A V F P
Cyp11b2-DSS GCTGGGACGTTGGTCTACTTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCTGCAGTGTTCCTCA 1260
Cyp11b2-Lewis GCTGGGACGTTGGTCTACTTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCTGCAGTGTTCCTCA 1260
Cyp11b2-DSR GCTGGGACGTTGGTCTACTTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCTGCAGTGTTCCTCA 1254
*****

R P E R Y M P Q R W L E R K R S F Q H L
Cyp11b2-DSS AGACCTGAGCGCTATATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTG 1320
Cyp11b2-Lewis AGACCTGAGCGCTATATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTG 1320
Cyp11b2-DSR AGACCTGAGCGCTATATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTG 1314
*****

A F G F G V R Q C L G R R L A E V E M L
Cyp11b2-DSS GCCTTCGGCTTTGGGTTGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTG 1380
Cyp11b2-Lewis GCCTTCGGCTTTGGGTTGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTG 1380
Cyp11b2-DSR GCCTTCGGCTTTGGGTTGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGATGCTG 1374
*****

L L L H H M L K T F Q V E T L R Q E D V
Cyp11b2-DSS CTCCTGCTTCACCATATGCTGAAAACCTTCCAGGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATGTG 1440
Cyp11b2-Lewis CTCCTGCTTCACCATATGCTGAAAACCTTCCAGGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATGTG 1440
Cyp11b2-DSR CTCCTGCTTCACCATATGCTGAAAACCTTCCAGGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATGTG 1434
*****

Q M A Y R F V L M P S S S P V L T F R P
Cyp11b2-DSS CAGATGGCCTATCGCTTTGTTTGTATGCCAGCTCTAGTCCCTGTCTCCTCCTTCCGGCCC 1500
Cyp11b2-Lewis CAGATGGCCTATCGCTTTGTTTGTATGCCAGCTCTAGTCCCTGTCTCCTCCTTCCGGCCC 1500
Cyp11b2-DSR CAGATGGCCTATCGCTTTGTTTGTATGCCAGCTCTAGTCCCTGTCTCCTCCTTCCGGCCC 1494
*****

```

Cyp11b2-DSS            I S -  
 Cyp11b2-Lewis        ATCAGCTAG 1509  
 Cyp11b2-DSR         ATCAGCTAG 1509  
                           ATCAGCTAG 1503  
                           \*\*\*\*\*

\* indicates nucleotide identity among 3 strains. Nucleotide differences are marked by yellow colors. The changes in amino acids are designated in bold and larger letters. The DSR sequence was taken from *J Biol Chem.* 1995;270:16555-16560.

**Supplement 4. Comparison of 11-beta-hydroxylase (Cyp11b1) expressions by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) in adrenal glands**

Mean R	Ratio of mean R DSS/ mean R C7S.L	p	Primers
0,004 ± 0,002 (DSS)/ 0,005 ± 0,004 (C7S.L)	0,8	0,81	Fwd: 5'GTCTATAAACATTCAGTCCAA'3 Rev: 5'ATCTCGGATATGACACTCC'3

R represents the ratio of the expression of the gene target relative to that of the *Gapdh* reference. R is the average value of triplicates from 1 rat. Mean R is the average value of R from 3 rats of the same strain. mRNAs were treated with DNase to remove any contamination from genomic DNAs. PCR primers were taken from those published in *Endocrinology* 144(8):3321–3328. DSS, Dahl salt-sensitive rats; C7S.L, congenic strain specified in Figure 1. 3 rats from each strain were males and their adrenal glands were harvested at the end of the experiment (see the animal protocol section in Methods).

**Supplement 5. Alignment of Cytochrome P-450 11B3 (Cyp11b3) coding sequences among Dahl salt-sensitive (DSS), Lewis and Dahl salt-resistant (DSR) strains.**

```

M A M A L R V T A D V W A R P W Q C L H
Cyp11b3_DSS   ATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGGCAAGACCCTGGCAGTGCCTGCAC 60
Cyp11b3_Lewis ATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGGCAAGACCCTGGCAGTGCCTGCAC 60
Cyp11b3_DSR   ATGGCAATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGGCAAGACCCTGGCAGTGCCTGCAC 60
*****
R T R A L G S T A T Q A P K T L K P F E
Cyp11b3_DSS   AGGACGAGGGCACTGGGCAGTACGGCAACACAGGCCCAAGACACTGAAGCCCTTTGAA 120
Cyp11b3_Lewis AGGACGAGGGCACTGGGCAGTACGGCAACACAGGCCCAAGACACTGAAGCCCTTTGAA 120
Cyp11b3_DSR   AGGACGAGGGCACTGGGCAGTACGGCAACACAGGCCCAAGACACTGAAGCCCTTTGAA 120
*****
A I P Q Y S R N K W L K M I Q I L R E Q
Cyp11b3_DSS   GCCATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGGGAGCAG 180
Cyp11b3_Lewis GCCATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGGGAGCAG 180
Cyp11b3_DSR   GCCATACCACAATACTCCAGGAACAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGGGAGCAG 180
*****
G Q E N L H L E M H Q A F Q E L G P I F
Cyp11b3_DSS   GGCCAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCCTCCAGGAAGTGGGCCCATTTTC 240
Cyp11b3_Lewis GGCCAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCCTCCAGGAAGTGGGCCCATTTTC 240
Cyp11b3_DSR   GGCCAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAGGCCCTCCAGGAAGTGGGCCCATTTTC 240
*****
R H S A G G A Q I V S V M L P E D A E K
Cyp11b3_DSS   AGGCACAGTGCAGGGGAGCAGACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAG 300
Cyp11b3_Lewis AGGCACAGTGCAGGGGAGCAGACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAG 300
Cyp11b3_DSR   AGGCACAGTGCAGGGGAGCAGACAGATTGTGTCTGTGATGCTGCCTGAGGACGCTGAGAAG 300
*****
L H Q V E S I L P R R M T L E S W V A H
Cyp11b3_DSS   CTGCACCAGGTGGAGAGTATCCTCCCGCTCGGATGACCCTGGAGTCGTGGGTGGCCAC 360
Cyp11b3_Lewis CTGCACCAGGTGGAGAGTATCCTCCCGCTCGGATGACCCTGGAGTCGTGGGTGGCCAC 360

```

Cyp11b3\_DSR CTGCACCAGGTGGAGAGTATCCTCCCCTCGGATGACCCCTGGAGTCGTGGGTGGCCAC 360  
 \*\*\*\*\*  
 R E L R G L R R G V F L L N G A D W R F  
 Cyp11b3\_DSS AGAGAACTCCGTGGCCTGAGACGTGGTGTGTTCTTGCTAAATGGGGCAGACTGGCGCTTC 420  
 Cyp11b3\_Lewis AGAGAACTCCGTGGCCTGAGACGTGGTGTGTTCTTGCTAAATGGGGCAGACTGGCGCTTC 420  
 Cyp11b3\_DSR AGAGAACTCCGTGGCCTGAGACGTGGTGTGTTCTTGCTAAATGGGGCAGACTGGCGCTTC 420  
 \*\*\*\*\*  
 N R L Q L N P N M L S P K A V Q S F V P  
 Cyp11b3\_DSS AACCGACTGCAGCTGAATCCAAATATGCTGTACCCAAAAGCCGTTCATCTTTTGTCCCC 480  
 Cyp11b3\_Lewis AACCGACTGCAGCTGAATCCAAATATGCTGTACCCAAAAGCCGTTCATCTTTTGTCCCC 480  
 Cyp11b3\_DSR AACCGACTGCAGCTGAATCCAAATATGCTGTACCCAAAAGCCGTTCATCTTTTGTCCCC 480  
 \*\*\*\*\*  
 F V D V V A R D F V E N L K K R M L E N  
 Cyp11b3\_DSS TTTGTGGATGTGGTAGCAAGGGACTTTGTGAAAACCTGAAGAAGAGAATGCTGGAGAAT 540  
 Cyp11b3\_Lewis TTTGTGGATGTGGTAGCAAGGGACTTTGTGAAAACCTGAAGAAGAGAATGCTGGAGAAT 540  
 Cyp11b3\_DSR TTTGTGGATGTGGTAGCAAGGGACTTTGTGAAAACCTGAAGAAGAGAATGCTGGAGAAT 540  
 \*\*\*\*\*  
 V H G S M S M D I Q S N V F N Y T M E A  
 Cyp11b3\_DSS GTTCATGGAAGCATGTCTATGGACATTCAGTCCAATGTGTTCAACTATACCATGGAAGCC 600  
 Cyp11b3\_Lewis GTTCATGGAAGCATGTCTATGGACATTCAGTCCAATGTGTTCAACTATACCATGGAAGCC 600  
 Cyp11b3\_DSR GTTCATGGAAGCATGTCTATGGACATTCAGTCCAATGTGTTCAACTATACCATGGAAGCC 600  
 \*\*\*\*\*  
 S H F V I S G E R L G L T G H D L N P E  
 Cyp11b3\_DSS AGCCATTTTGTATTTCGGAGAGCGACTGGGCCTCACAGGCCATGACCTGAACCCCTGAG 660  
 Cyp11b3\_Lewis AGCCATTTTGTATTTCGGAGAGCGACTGGGCCTCACAGGCCATGACCTGAACCCCTGAG 660  
 Cyp11b3\_DSR AGCCATTTTGTATTTCGGAGAGCGACTGGGCCTCACAGGCCATGACCTGAACCCCTGAG 660  
 \*\*\*\*\*  
 S L K F I H A L H S M F K S T T Q L M F  
 Cyp11b3\_DSS AGCCTGAAGTTCATTCATGCTCTGCACTCAATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCATGTT 720  
 Cyp11b3\_Lewis AGCCTGAAGTTCATTCATGCTCTGCACTCAATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCATGTT 720  
 Cyp11b3\_DSR AGCCTGAAGTTCATTCATGCTCTGCACTCAATGTTCAAGTCCACCACACAGCTCATGTT 720  
 \*\*\*\*\*  
 L P K N L T R W T S T Q V W K G H F E S  
 Cyp11b3\_DSS TTACCCAAGAACTTGACTCGTTGGACAAGCACCAGGTGTGGAAAGGACACTTTGAGTCC 780  
 Cyp11b3\_Lewis TTACCCAAGAACTTGACTCGTTGGACAAGCACCAGGTGTGGAAAGGACACTTTGAGTCC 780  
 Cyp11b3\_DSR TTACCCAAGAACTTGACTCGTTGGACAAGCACCAGGTGTGGAAAGGACACTTTGAGTCC 780  
 \*\*\*\*\*  
 W D I I S E Y V T K C I K N V Y R E L A  
 Cyp11b3\_DSS TGGGATATCATCTCTGAGTATGTCACAAAATGTATCAAGAATGTGTATCGCGAAGTGGCA 840  
 Cyp11b3\_Lewis TGGGATATCATCTCTGAGTATGTCACAAAATGTATCAAGAATGTGTATCGCGAAGTGGCA 840  
 Cyp11b3\_DSR TGGGATATCATCTCTGAGTATGTCACAAAATGTATCAAGAATGTGTATCGCGAAGTGGCA 840  
 \*\*\*\*\*  
 E G R Q Q S W S V I S E M V A Q S T L S  
 Cyp11b3\_DSS GAGGGTCGCCAACAGTCCCTGGAGTGCATATCCGAGATGGTAGCACAGAGTACTCTGTCA 900  
 Cyp11b3\_Lewis GAGGGTCGCCAACAGTCCCTGGAGTGCATATCCGAGATGGTAGCACAGAGTACTCTGTCA 900  
 Cyp11b3\_DSR GAGGGTCGCCAACAGTCCCTGGAGTGCATATCCGAGATGGTAGCACAGAGTACTCTGTCA 900  
 \*\*\*\*\*  
 M D A I H A N S M E L I A G S V D T T A  
 Cyp11b3\_DSS ATGGATGCCATCCATGCCAATCAATGGAACCTATTGCTGGAAGTGTGACACGACAGCA 960  
 Cyp11b3\_Lewis ATGGATGCCATCCATGCCAATCAATGGAACCTATTGCTGGAAGTGTGACACGACAGCA 960  
 Cyp11b3\_DSR ATGGATGCCATCCATGCCAATCAATGGAACCTATTGCTGGAAGTGTGACACGACAGCA 960  
 \*\*\*\*\*  
 I S L V M T L F E L A R N P D V Q A L  
 Cyp11b3\_DSS ATCTCCTTGGTAATGACCCCTTTTGTAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTGACGAGCCCTG 1020  
 Cyp11b3\_Lewis ATCTCCTTGGTAATGACCCCTTTTGTAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTGACGAGCCCTG 1020  
 Cyp11b3\_DSR ATCTCCTTGGTAATGACCCCTTTTGTAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTGACGAGCCCTG 1020  
 \*\*\*\*\*  
 R Q E S L A A E A S I A A N P Q K A M S  
 Cyp11b3\_DSS CGGCAGGAGAGCCTGGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATCCCCAGAAGGCCATGTCA 1080  
 Cyp11b3\_Lewis CGGCAGGAGAGCCTGGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATCCCCAGAAGGCCATGTCA 1080  
 Cyp11b3\_DSR CGGCAGGAGAGCCTGGCAGCTGAGGCCAGCATCGCTGCTAATCCCCAGAAGGCCATGTCA 1080  
 \*\*\*\*\*  
 D L P L L R A A L K E T L R L Y P I G S  
 Cyp11b3\_DSS GACTTGCCTTGTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGCTCTACCCCATTTGGTAGC 1140  
 Cyp11b3\_Lewis GACTTGCCTTGTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGCTCTACCCCATTTGGTAGC 1140  
 Cyp11b3\_DSR GACTTGCCTTGTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGCTCTACCCCATTTGGTAGC 1140  
 \*\*\*\*\*  
 S L E R I V D S D L V L Q N Y H V P A G  
 Cyp11b3\_DSS TCTTTGGAGAGAATCGTAGACTCAGACCTGGTGTTCAGAACTATCATGTCCTGCTGG 1200  
 Cyp11b3\_Lewis TCTTTGGAGAGAATCGTAGACTCAGACCTGGTGTTCAGAACTATCATGTCCTGCTGG 1200  
 Cyp11b3\_DSR TCTTTGGAGAGAATCGTAGACTCAGACCTGGTGTTCAGAACTATCATGTCCTGCTGG 1200  
 \*\*\*\*\*  
 T L V I I Y L Y S M G R N P A V F P R P

```

Cyp11b3_DSS      ACGTTGGTCATAATTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCCTGCAGTGTTCCTCAAGACCT 1260
Cyp11b3_Lewis   ACGTTGGTCATAATTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCCTGCAGTGTTCCTCAAGACCT 1260
Cyp11b3_DSR     ACGTTGGTCATAATTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCCTGCAGTGTTCCTCAAGACCT 1260
*****
E R Y M P Q R W L E R K R S F Q H L A F
Cyp11b3_DSS     GAGCGCTACATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTCCAGCATCTGGCCTTC 1320
Cyp11b3_Lewis   GAGCGCTACATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTCCAGCATCTGGCCTTC 1320
Cyp11b3_DSR     GAGCGCTACATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTCCAGCATCTGGCCTTC 1320
*****
G F G V R Q C L G R R L A E V E V L L L
Cyp11b3_DSS     GGCTTTGGGGTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGGTGTGCTCCTG 1380
Cyp11b3_Lewis   GGCTTTGGGGTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGGTGTGCTCCTG 1380
Cyp11b3_DSR     GGCTTTGGGGTGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAGGTGGAGGTGTGCTCCTG 1380
*****
L H H M L K I F Q V E T L R Q E D V Q M
Cyp11b3_DSS     CTTACCATATGCTGAAAATCTTCCAAGTCGAGACACTGAGGCAAGAGGATGTGCAGATG 1440
Cyp11b3_Lewis   CTTACCATATGCTGAAAATCTTCCAAGTCGAGACACTGAGGCAAGAGGATGTGCAGATG 1440
Cyp11b3_DSR     CTTACCATATGCTGAAAATCTTCCAAGTCGAGACACTGAGGCAAGAGGATGTGCAGATG 1440
*****
A Y R F V L M P N P R L V L T I R P V S
Cyp11b3_DSS     GCCTATCGCTTTGTTTTGATGCCCAACCCCTAGACTCGTCCTCACTATCCGGCCTGTGAGC 1500
Cyp11b3_Lewis   GCCTATCGCTTTGTTTTGATGCCCAACCCCTAGACTCGTCCTCACTATCCGGCCTGTGAGC 1500
Cyp11b3_DSR     GCCTATCGCTTTGTTTTGATGCCCAACCCCTAGACTCGTCCTCACTATCCGGCCTGTGAGC 1500
*****
-
Cyp11b3_DSS     TAG 1503
Cyp11b3_Lewis   TAG 1503
Cyp11b3_DSR     TAG 1503
***

```

\* indicates nucleotide identity among 3 strains. The DSR sequence was taken from *Genomics*. 2001;72:51-60.

### Supplement 6. Coding sequence alignment for *Tachykinin 2 (Tac2)* among Dahl salt-sensitive (DSS), Dahl salt-resistant (DSR) and Lewis rats.

```

M R S A M L F A A V L A L S L A W T F G 20
DSS      ATGAGGAGCGCCATGCTGTTTCGCGGCTGTCTCGCCCTCAGCTTGGCATGGACCTTCGGG 60
DSR      ATGAGGAGCGCCATGCTGTTTCGCGGCTGTCTCGCCCTCAGCTTGGCATGGACCTTCGGG
Lewis    ATGAGGAGCGCCATGCTGTTTCGCGGCTGTCTCGCCCTCAGCTTGGCATGGACCTTCGGG
*****
A A C E E P Q E Q G G R L S K D S D L S 40
DSS      GCTGCGTGTGAGGAACCTCAGGAGCAGGGTGGGAGGCTCAGTAAGGACTCTGATCTCTCT 120
DSR      GCTGCGTGTGAGGAACCTCAGGAGCAGGGTGGGAGGCTCAGTAAGGACTCTGATCTCTCT
Lewis    GCTGCGTGTGAGGAACCTCAGGAGCAGGGTGGGAGGCTCAGTAAGGACTCTGATCTCTCT
*****
L L P P P L L R R L Y D S R S I S L E G 60
DSS      CTGCTACCTCCACCCTGCTTCGGAGACTCTACGACAGCCGCCTCCATCTCTCTGGAAGGA 180
DSR      CTGCTACCTCCACCCTGCTTCGGAGACTCTACGACAGCCGCCTCCATCTCTCTGGAAGGA
Lewis    CTGCTACCTCCACCCTGCTTCGGAGACTCTACGACAGCCGCCTCCATCTCTCTGGAAGGA
*****
P
L L K V L S K A S V G P K E T S L P Q K 80
DSS      TTGCTGAAAGTGCTGAGCAAGGCTAGCGTGGGACCGAAGGAGACATCACTTCCACAGAAA 240
DSR      TTGCTGAAAGTGCTGAGCAAGGCTAGCGTGGGACCGAAGGAGACATCACTTCCACAGAAA
Lewis    TTGCTGAAAGTGCTGAGCAAGGCTAGCGTGGGACCGAAGGAGACATCACTTCCACAGAAA
*****
R D M H D F F V G L M G K R N S Q P D T 100
DSS      CGTGACATGCACGACTTCTTTGTGGGACTTATGGGCAAGAGGAACAGCAACCCAGACACT 300
DSR      CGTGACATGCACGACTTCTTTGTGGGACTTATGGGCAAGAGGAACAGCAACCCAGACACT
Lewis    CGTGACATGCACGACTTCTTTGTGGGACTTATGGGCAAGAGGAACAGCAACCCAGACACT
*****
P A D V V E E N T P S F G V L K - 116
DSS      CCCGCTGATGTGGTTGAAGAGAACACCCCGCTTTGGCGTCTCAAATAG 351
DSR      CCCGCTGATGTGGTTGAAGAGAACACCCCGCTTTGGCGTCTCAAATAG
Lewis    CCCGCTGATGTGGTTGAAGAGAACACCCCGCTTTGGCGTCTCAAATAG

```

\*\*\*\*\*

\* indicates nucleotide identity among 3 strains. Amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs containing coding regions from DSS, DSR and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced. A significant mutation and its corresponding amino acid alteration are indicated in larger and bold letters. When a sequence variation was seen, the DNA segment harboring it has been independently re-amplified by PCR, and the mutation has been confirmed by re-sequencing.

### Supplement 7. Coding sequence alignment for *Neurexophilin 4 (Nxph4)* among Dahl salt-sensitive (DSS), Dahl salt-resistant (DSR) and Lewis rats.

```

      M R L L P E W L L L L F G P W L L R K V 20
DSS  ATGCGGCTGCTCCCGAATGGCTCCTCTTGCTCTTTGGTCCTTGGCTCCTTAGGAAGGTT 60
DSR  ATGCGGCTGCTCCCGAATGGCTCCTCTTGCTCTTTGGTCCTTGGCTCCTTAGGAAGGTT
Lewis ATGCGGCTGCTCCCGAATGGCTCCTCTTGCTCTTTGGTCCTTGGCTCCTTAGGAAGGTT
      *****
      I S G Q I V E S G R P Q Y L D L R P A M 40
DSS  ATCAGTGGCCAGATCGTGAATCCGGGAGGCCACAGTACCTGGACCTGCGTCCCGCCATG 120
DSR  ATCAGTGGCCAGATCGTGAATCCGGGAGGCCACAGTACCTGGACCTGCGTCCCGCCATG
Lewis ATCAGTGGCCAGATCGTGAATCCGGGAGGCCACAGTACCTGGACCTGCGTCCCGCCATG
      *****
      A G G G A R G Q Q L P V P A S S E G L N 60
DSS  GCCGGAGGGGGCGCCCGCGCCAGCAGCTCCCGGTGCCCGCTTCTTCCGAGGGCCTGAAC 180
DSR  GCCGGAGGGGGCGCCCGCGCCAGCAGCTCCCGGTGCCCGCTTCTTCCGAGGGCCTGAAC
Lewis GCCGGAGGGGGCGCCCGCGCCAGCAGCTCCCGGTGCCCGCTTCTTCCGAGGGCCTGAAC
      *****
      P V R S W S W A W P A N H T G A L A R P 80
DSS  CCCGTGCGCTCCTGGAGCTGGGCTTGGCCAGCTAACCACACCGGGGCGCTGGCCAGGCCG 240
DSR  CCCGTGCGCTCCTGGAGCTGGGCTTGGCCAGCTAACCACACCGGGGCGCTGGCCAGGCCG
Lewis CCCGTGCGCTCCTGGAGCTGGGCTTGGCCAGCTAACCACACCGGGGCGCTGGCCAGGCCG
      *****
      G A A G G P P V P R T K R K P S I K A A 100
DSS  GGGGCAGCCGTTGGCCCGCCGTGCCGCGCACCAAGAGAAAGCCATCCATTAAAGCGGCC 300
DSR  GGGGCAGCCGTTGGCCCGCCGTGCCGCGCACCAAGAGAAAGCCATCCATTAAAGCGGCC
Lewis GGGGCAGCCGTTGGCCCGCCGTGCCGCGCACCAAGAGAAAGCCATCCATTAAAGCGGCC
      *****
      R A K K I F G W G D F Y F R V H T L K F 120
DSS  CGCGCCAAGAAGATTTTCGGCTGGGGGACTTTTACTTTTCGTGTACATACCCTCAAGTTC 360
DSR  CGCGCCAAGAAGATTTTCGGCTGGGGGACTTTTACTTTTCGTGTACATACCCTCAAGTTC
Lewis CGCGCCAAGAAGATTTTCGGCTGGGGGACTTTTACTTTTCGTGTACATACCCTCAAGTTC
      *****
      S L L V T G K I V D H V N G T F S V Y F 140
DSS  TCGCTGCTGGTGACCGGCAAGATTGTGGACCATGTGAACGGTACCTTCAGTGTGTACTTC 420
DSR  TCGCTGCTGGTGACCGGCAAGATTGTGGACCATGTGAACGGTACCTTCAGTGTGTACTTC
Lewis TCGCTGCTGGTGACCGGCAAGATTGTGGACCATGTGAACGGTACCTTCAGTGTGTACTTC
      *****
      R H N S S S L G N L S V S I V P P S K R 160
DSS  CGTCACAATTCGTCCAGCCTGGGTAACCTAAGTGTAGTATCGTGCCGCCTTCCAAGCGT 480
DSR  CGTCACAATTCGTCCAGCCTGGGTAACCTAAGTGTAGTATCGTGCCGCCTTCCAAGCGT
Lewis CGTCACAATTCGTCCAGCCTGGGTAACCTAAGTGTAGTATCGTGCCGCCTTCCAAGCGT
      *****
      V E F G G V W L P G P A P H P L Q S T L 180
DSS  GTGGAGTTCGGGGGCGTCTGGCTGCCTGGGCCTGCCCCCAACCCTTACAGTCTACGCTG 540
DSR  GTGGAGTTCGGGGGCGTCTGGCTGCCTGGGCCTGCCCCCAACCCTTACAGTCTACGCTG
Lewis GTGGAGTTCGGGGGCGTCTGGCTGCCTGGGCCTGCCCCCAACCCTTACAGTCTACGCTG
      *****
      A L E G V L P G L G P P L G M A G Q G L 200
DSS  GCATTAGAAGGGGTGCTTCCCGGACTGGGGCCCCCCTCTGGGGATGGCGGGGCAGGGGCTG 600
DSR  GCATTAGAAGGGGTGCTTCCCGGACTGGGGCCCCCCTCTGGGGATGGCGGGGCAGGGGCTG
Lewis GCATTAGAAGGGGTGCTTCCCGGACTGGGGACCCCCTCTGGGGATGGCGGGGCAGGGGCTG
      *****

```

**T**

```

      G G N L G G A L A G P L G G A L G V P G 220
DSS  GGGGGTAACCTTGGGGGTGCACTTGCCGGCCCACTCGGAGGCGCGCTGGGAGTTCCTGGG 660
DSR  GGGGGTAACCTTGGGGGTGCACTTGCCGGCCCACTCGGAGGCGCGCTGGGAGTTCCTGGG
Lewis GGGGGTAACCTTGGGGGTGCACTTGCCGGCCCACTCGGAGGCGCGCTGGGAGTTCCTGGG
*****
      A K E S R A F N C H V E Y E K T N R A R 240
DSS  GCCAAAGAGTCGCGCGCTTTTAATTGCCACGTAGAATATGAGAAGACAAACCGCGCTCGC 720
DSR  GCCAAAGAGTCGCGCGCTTTTAATTGCCACGTAGAATATGAGAAGACAAACCGCGCTCGC
Lewis GCCAAAGAGTCGCGCGCTTTTAATTGCCACGTAGAATATGAGAAGACAAACCGCGCTCGC
*****

      K H R P C L Y D P S Q V C F T E H T Q S 260
DSS  AAGCACCGCCCGTGCTGTACGACCCGTCGCAGGTGTGCTTCACCGAGCACACGCAGAGT 780
DSR  AAGCACCGCCCGTGCTGTACGACCCGTCGCAGGTGTGCTTCACCGAGCACACGCAGAGT
Lewis AAGCACCGCCCGTGCTGTACGACCCGTCGCAGGTGTGCTTCACCGAGCACACGCAGAGT
*****

      Q A A W L C A K P F K V I C I F V S F L 280
DSS  CAGGCCGCTGGCTTGTGCGCCAAGCCCTTCAAAGTCATCTGTATCTTCGTCTCCTTCCTC 840
DSR  CAGGCCGCTGGCTTGTGCGCCAAGCCCTTCAAAGTCATCTGTATCTTCGTCTCCTTCCTC
Lewis CAGGCCGCTGGCTTGTGCGCCAAGCCCTTCAAAGTCATCTGTATCTTCGTCTCCTTCCTC
*****

      S F D Y K L V Q K V C P D Y N F Q S E H 300
DSS  AGTTTTGACTACAAACTGGTGCAGAAGGTGTGCCAGACTATAACTTCCAGAGTGAGCAC 900
DSR  AGTTTTGACTACAAACTGGTGCAGAAGGTGTGCCAGACTATAACTTCCAGAGTGAGCAC
Lewis AGTTTTGACTACAAACTGGTGCAGAAGGTGTGCCAGACTATAACTTCCAGAGTGAGCAC
*****

      P Y F G - 304
DSS  CCCTACTTTGGATAA 915
DSR  CCCTACTTTGGATAA
Lewis CCCTACTTTGGATAA
*****

```

\* indicates nucleotide identity among 3 strains. Amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs containing coding regions from DSS, DSR and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced. A significant mutation and its corresponding amino acid alteration are indicated in larger and bold letters. When a sequence variation was seen, the DNA segment harboring it was independently re-amplified by PCR, and the mutation has been confirmed by re-sequencing.

### Supplement 8. Coding sequence alignment for *Retinol dehydrogenase 2 (Rdh2)* among Dahl salt-sensitive (DSS), Dahl salt-resistant (DSR) and Lewis rats.

```

      M W L Y L L A L V G L W N L L R L F R E 20
DSS  ATGTGGCTGTACCTGCTGGCACTGGTGGCCCTGTGGAACCTCCTGCGCTTGTTCAGGGAG 60
DSR  ATGTGGCTGTACCTGCTGGCACTGGTGGCCCTGTGGAACCTCCTGCGCTTGTTCAGGGAG
Lewis ATGTGGCTGTACCTGCTGGCACTGGTGGCCCTGTGGAACCTCCTGCGCTTGTTCAGGGAG
*****

      R K V V S H L Q D K Y V F I T G C D S G 40
DSS  AGGAAGGTGGTAAGCCATCTCCAAGACAAATATGTCTTCATCACGGGCTGTGACTCAGGC 120
DSR  AGGAAGGTGGTAAGCCATCTCCAAGACAAATATGTCTTCATCACGGGCTGTGACTCAGGC
Lewis AGGAAGATGGTAAGCCATCTCCAAGACAAATATGTCTTCATCACGGGCTGTGACTCAGGC
*****

      M

      F G N L L A R Q L D R R G M R V L A A C 60
DSS  TTTGGGAACCTGCTGGCCAGACAGCTGGACAGGAGAGGCATGAGGGTGTGGCTGCATGT 180
DSR  TTTGGGAACCTGCTGGCCAGACAGCTGGACAGGAGAGGCATGAGGGTGTGGCTGCATGT
Lewis TTTGGGAACCTGCTGGCCAGACAGCTGGACAGGAGAGGCATGAGGGTGTGGCTGCATGT
*****

      L T E K G A E Q L R S K T S D R L E T V 80
DSS  CTGACTGAGAAGGGAGCCGAGCAGCTGAGGAGCAAGACATCGGACAGGCTGGAGACAGTG 240
DSR  CTGACTGAGAAGGGAGCCGAGCAGCTGAGGAGCAAGACATCGGACAGGCTGGAGACAGTG
Lewis CTGACTGAGAAGGGAGCCGAGCAGCTGAGGAGCAAGACATCGGACAGGCTGGAGACAGTG
*****

```

I L D V T K T E S I V A A T Q W V K E R 100  
DSS ATCCTTGATGTCACCAAGACAGAGATTGTGGCAGCCACTCAGTGGGTGAAGGAGCGA 300  
DSR ATCCTTGATGTCACCAAGACAGAGATTGTGGCAGCCACTCAGTGGGTGAAGGAGCGA  
Lewis ATCCTTGATGTCACCAAGACAGAGATTGTGGCAGCCACTCAGTGGGTGAAGGAGCGA  
\*\*\*\*\*

V G N **T** G L W G L V N N A G I S G H L G 120  
DSS GTTGGGAACA**C**AGGACTCTGGGGCCTGGTCAACAATGCTGGCATCTCCGGCCACCTGGGT 360  
DSR GTTGGGAACA**C**AGGACTCTGGGGCCTGGTCAACAATGCTGGCATCTCCGGCCACCTGGGT  
Lewis GTTGGGAACA**G**AGGACTCTGGGGCCTGGTCAACAATGCTGGCATCTCCGGCCACCTGGGT  
\*\*\*\*\*

**R**

P N E W M N K Q N I A S V L D V N L L G 140  
DSS CCCAATGAGTGGATGAACAACAGAACATTGCAAGTGTGCTGGATGTGAACCTGTTGGGC 420  
DSR CCCAATGAGTGGATGAACAACAGAACATTGCAAGTGTGCTGGATGTGAACCTGTTGGGC  
Lewis CCCAATGAGTGGATGAACAACAGAACATTGCAAGTGTGCTGGATGTGAACCTGTTGGGC  
\*\*\*\*\*

M I E V T L S T V P L V R K A R G R V V 160  
DSS ATGATCGAGGTGACTCTGAGCACGGTGCCTTAGTGAGGAAGGCGAGGGCCGTGTGGTC 480  
DSR ATGATCGAGGTGACTCTGAGCACGGTGCCTTAGTGAGGAAGGCGAGGGCCGTGTGGTC  
Lewis ATGATCGAGGTGACTCTGAGCACGGTGCCTTAGTGAGGAAGGCGAGGGCCGTGTGGTC  
\*\*\*\*\*

N V A S I A G R L S F C G G G Y C I S K 180  
DSS AACGTTGCCAGCATCGCAGGCCGACTGTCTTTTGTGGTGGTGGTACTGCATCTCCAAG 540  
DSR AACGTTGCCAGCATCGCAGGCCGACTGTCTTTTGTGGTGGTGGTACTGCATCTCCAAG  
Lewis AACGTTGCCAGCATCGCAGGCCGACTGTCTTTTGTGGTGGTGGTACTGCATCTCCAAG  
\*\*\*\*\*

Y G V K A F S N S L R R E L S Y F G V K 200  
DSS TATGGTGTAAAGGCCCTTCTCAAATCCCTCAGGAGAGAGCTCTCCTATTTTGGGGTCAAG 600  
DSR TATGGTGTAAAGGCCCTTCTCAAATCCCTCAGGAGAGAGCTCTCCTATTTTGGGGTCAAG  
Lewis TATGGTGTAAAGGCCCTTCTCAAATCCCTCAGGAGAGAGCTCTCCTATTTTGGGGTCAAG  
\*\*\*\*\*

V A I V E P G F F R T D V T N G V T L S 220  
DSS GTGGCTATGTAGAGCCTGGCTTCTTCAGGACTGATGTGACCAATGGTGTACATTATCA 660  
DSR GTGGCTATGTAGAGCCTGGCTTCTTCAGGACTGATGTGACCAATGGTGTACATTATCA  
Lewis GTGGCTATGTAGAGCCTGGCTTCTTCAGGACTGATGTGACCAATGGTGTACATTATCA  
\*\*\*\*\*

S N F Q M L W D Q T S S E V R E V Y G E 240  
DSS TCAAACCTCCAGATGCTGTGGGACCAGACCAGCTCAGAAGTCAGGGAAGTCTATGGCGAG 720  
DSR TCAAACCTCCAGATGCTGTGGGACCAGACCAGCTCAGAAGTCAGGGAAGTCTATGGCGAG  
Lewis TCAAACCTCCAGATGCTGTGGGACCAGACCAGCTCAGAAGTCAGGGAAGTCTATGGCGAG  
\*\*\*\*\*

N Y L A S Y L K **T** L N G L D Q R C N K D 260  
DSS AACTACCTGGCATCTTATCTGAAAAC**G**CTAAATGGATTGACCAGAGGTGCAACAAAGAT 780  
DSR AACTACCTGGCATCTTATCTGAAAAC**G**CTAAATGGATTGACCAGAGGTGCAACAAAGAT  
Lewis AACTACCTGGCATCTTATCTGAAAAT**I**GCTAAATGGATTGACCAGAGGTGCAACAAAGAT  
\*\*\*\*\*

**M**

L S L V T D C M E H A L T S C H P R T R 280  
DSS CTGTCTCTGGTACTGACTGCATGGAGCAGCCCTGACTTCTGTACCCCTCGCACCCGG 840  
DSR CTGTCTCTGGTACTGACTGCATGGAGCAGCCCTGACTTCTGTACCCCTCGCACCCGG  
Lewis CTGTCTCTGGTACTGACTGCATGGAGCAGCCCTGACTTCTGTACCCCTCGCACCCGG  
\*\*\*\*\*

Y S A G W D A K F F Y L P M S Y L P T F 300  
DSS TACTCAGCTGGTGGGATGCCAAGTCTTCTACCTCCCCATGAGCTATCTGCCACCTTT 900  
DSR TACTCAGCTGGTGGGATGCCAAGTCTTCTACCTCCCCATGAGCTATCTGCCACCTTT  
Lewis TACTCAGCTGGTGGGATGCCAAGTCTTCTACCTCCCCATGAGCTATCTGCCACCTTT  
\*\*\*\*\*

L V D A L F Y W T S P K P E K A L - 317  
DSS CTTGTGGATGCCCTTTTCTACTGGACTTCTCCAAGCCTGAGAAAGCTCTCTGA 954  
DSR CTTGTGGATGCCCTTTTCTACTGGACTTCTCCAAGCCTGAGAAAGCTCTCTGA  
Lewis CTTGTGGATGCCCTTTTCTACTGGACTTCTCCAAGCCTGAGAAAGCTCTCTGA  
\*\*\*\*\*



\* indicates nucleotide identity among 3 strains. Amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs containing coding regions from DSS, DSR and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced. A significant mutation and its corresponding amino acid alteration are indicated in larger and bold letters. When a nucleotide difference was seen (indicated by shade), it was re-PCRed and sequence confirmed.

**Supplement 9. Coding sequence alignment for *Potassium voltage-gated channel delayed rectifier subfamily S member 2 (Kcns2)* between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats.**

```

M T R Q S L W D L S E T D V E D G E I R
DSS ATGACCCGCCAGAGCCTGTGGACCTGTCTGAGACCGACGTCGAGGATGGAGAGATCCGA 60
Lewis ATGACCCGCCAGAGCCTGTGGACCTGTCTGAGACCGACGTCGAGGATGGAGAGATCCGA
*****
I N V G G F K R R L R S H T L L R F P E
DSS ATCAATGTAGGCGGCTTCAAGAGACGGCTGCGTTCCCACACGCTGCTGCGCTTCCCTGAG 120
Lewis ATCAATGTAGGCGGCTTCAAGAGACGGCTGCGTTCCCACACGCTGCTGCGCTTCCCTGAG
*****
T R L G R L L L C H S R E A I L E L C D
DSS ACACGCCTGGGCCGTCTGCTCCTCTGCCACTCGAGAGAGGCCATTCTGGAACCTGCGAT 180
Lewis ACACGCCTGGGCCGTCTGCTCCTCTGCCACTCGAGAGAGGCCATTCTGGAACCTGCGAT
*****
D Y D D V Q R E F Y F D R N P E L F P Y
DSS GACTACGACGATGCCAGCGTGAGTTCTACTTCGACCGTAACCCTGAGCTCTTCCCTAC 240
Lewis GACTACGACGATGCCAGCGTGAGTTCTACTTCGACCGTAACCCTGAGCTCTTCCCTAC
*****
V L H F Y H T G K L H V M A E L C V F S
DSS GTGTTGCATTTCTACCACACCGGCAAGCTCCATGTCATGGCCGAGCTGTGCGTCTTCTCC 300
Lewis GTGTTGCATTTCTACCACACCGGCAAGCTCCATGTCATGGCCGAGCTGTGCGTCTTCTCC
*****
F S Q E I E Y W G I N E F F I D S C C S
DSS TTCAGCCAGGAGATCGAGTACTGGGGTATCAACGAGTTCTTTATTGACTCTTGCTGCAGC 360
Lewis TTCAGCCAGGAGATCGAGTACTGGGGTATCAACGAGTTCTTTATTGACTCTTGCTGCAGC
*****
Y S Y H G R K V E P E Q E K W D E Q S D
DSS TACAGTATCACGGCCGCAAAGTGAACCTGAGCAGGAGAAGTGGGACGAGCAGAGTGAC 420
Lewis TACAGTATCACGGCCGCAAAGTGAACCTGAGCAGGAGAAGTGGGACGAGCAGAGTGAC
*****
Q E S T T S S F D E I L A F Y N D A S K
DSS CAGGAAAGCACTACTTCCCTCCTCGACGAGATCTTAGCCTTCTATAATGATGCTTCCAAG 480
Lewis CAGGAAAGCACTACTTCCCTCCTCGACGAGATCTTAGCCTTCTATAATGATGCTTCCAAG
*****
F D G Q P L G N F R R Q L W L A L D N P
DSS TTCGATGGGCAACCCTGGGCAACTTCCGCAGGCAGCTGTGGCTGGCGTTGGATAACCCG 540
Lewis TTCGATGGGCAACCCTGGGCAACTTCCGCAGGCAGCTGTGGCTGGCGTTGGATAACCCG
*****
G Y S V L S R V F S V L S I L V V L G S
DSS GGCTACTCAGTCTGAGCAGGGTCTTCAGCGTCTTCCATCTTGGTGGTGTGGGCTCC 600
Lewis GGCTACTCAGTCTGAGCAGGGTCTTCAGCGTCTTCCATCTTGGTGGTGTGGGCTCC
*****
I I T M C L N S L P D F Q I P D S Q G N
DSS ATCATCACCATGTGCCTCAACAGCCTGCCAGACTTCCAGATCCTCCGATAGCCAGGGTAAC 660
Lewis ATCATCACCATGTGCCTCAACAGCCTGCCAGACTTCCAGATCCTCCGATAGCCAGGGTAAC
*****
P G E D P R F E I V E H F G I A W F T F
DSS CCTGGCGAAGACCCAGGTTGAAATCGTGGAGCACTTGGCATTGCCTGGTTCACGTTT 720
Lewis CCTGGCGAAGACCCAGGTTGAAATCGTGGAGCACTTGGCATTGCCTGGTTCACGTTT
*****
E L V A R F A V A P D F L K F F K N A L
DSS GAGTTGGTGGCCAGGTTGCTGTGGCCCTGACTTCTCAAGTTCTTCAAGAATGCCCTA 780
Lewis GAGTTGGTGGCCAGGTTGCTGTGGCCCTGACTTCTCAAGTTCTTCAAGAATGCCCTA
*****
N L I D L M S I V P F Y I T L V V N L V
DSS AACCTTATTGACCTCATGTCCATTGTCCTGTTTACATAACTCTAGTGGTGAACCTGGTG 840

```

```

Lewis      AACCTTATGACCTCATGTCCATTGTCCCCTTTTACATAACTCTAGTGGTGAACTGGTG
*****
          V E S S P T L A N L G R V A Q V L R L M
DSS        GTGGAGAGTTCCGCTACCTTGGCTAACTTGGGCAGGGTGGCTCAAGTCTGAGGCTGATG 900
Lewis      GTGGAGAGTTCCGCTACCTTGGCTAACTTGGGCAGGGTGGCTCAAGTCTGAGGCTGATG
*****

          R I F R I L K L A R H S T G L R S L G A
DSS        AGAATCTTCCGAATTCTCAAGCTGGCCAGACACTCCACTGGCCTCCGGTCTTGGGGGCC 960
Lewis      AGAATCTTCCGAATTCTCAAGCTGGCCAGACACTCCACTGGCCTCCGGTCTTGGGGGCC
*****

          T L K Y S Y K E V G L L L L Y L S V G I
DSS        ACCCTGAAGTACAGCTACAAGGAAGTGGGGTGTCTTGTCTTACCTCTCGGTGGGGATT 1020
Lewis      ACCCTGAAGTACAGCTACAAGGAAGTGGGGTGTCTTGTCTTACCTCTCGGTGGGGATT
*****

          S I F S V V A Y T I E K E E N E G L A T
DSS        TCCATCTTCTGTGGTGGCCTACACCATTGAAAAGGAAGAGAACGAGGGCCTGGCCACC 1080
Lewis      TCCATCTTCTGTGGTGGCCTACACCATTGAAAAGGAAGAGAACGAGGGCCTGGCCACC
*****

          I P A C W W W A T V S M T T V G Y G D V
DSS        ATTCCTGCCTGTGGTGGTGGGCCACGGTCAGCATGACTACCGTTGGGTATGGAGACGTG 1140
Lewis      ATTCCTGCCTGTGGTGGTGGGCCACGGTCAGCATGACTACCGTTGGGTATGGAGACGTG
*****

          V P G T T A G K L T A S A C I L A G I L
DSS        GTCCCAGGGACCACAGCTGGGAAGCTGACTGCCTCTGCCTGCATCTTGGCAGGTATCCTG 1200
Lewis      GTCCCAGGGACCACAGCTGGGAAGCTGACTGCCTCTGCCTGCATCTTGGCAGGTATCCTG
*****

          V V V L P I T L I F N K F S H F Y R R Q
DSS        GTGGTGGTCTTGCCCATCACTTTGATCTTCAATAAGTTCTCCCACTTTTATCGGCGCCAG 1260
Lewis      GTGGTGGTCTTGCCCATCACTTTGATCTTCAATAAGTTCTCCCACTTTTATCGGCGCCAG
*****

          K Q L E S A M R S C D F G D G M K E V P
DSS        AAGCAACTTGAGAGCGCCATGCGCAGCTGTGACTTGGGGATGGAATGAAGGAGGTCCCC 1320
Lewis      AAGCAACTTGAGAGCGCCATGCGCAGCTGTGACTTGGGGATGGAATGAAGGAGGTCCCC
*****

          S V N L R D Y Y A H K V K S L M A S L T
DSS        TCCGTCAATTTAAGGGACTACTATGCTCATAAAGTTAAGTCCCTCATGGCAAGCCTGACA 1380
Lewis      TCCGTCAATTTAAGGGACTACTATGCTCATAAAGTTAAGTCCCTCATGGCAAGCCTGACA
*****

          N M S R S S P S E L S L D D S L H -
DSS        AATATGAGTAGGAGTTCACCCAGTGAAGTGTAGACTCTCTACATTAG 1434
Lewis      AATATGAGTAGGAGTTCACCCAGTGAAGTGTAGACTCTCTACATTAG
*****

```

\* indicates nucleotide identity between the 2 strains. Amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs containing coding regions from DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced. When a nucleotide difference was seen (indicated by shade), it was re-PCRed and sequence confirmed.

**Supplement 10. Coding sequence alignment for *Cytochrome c oxidase subunit 6c (Cox6c)* between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats.**

```

          M S S G A L L P K P Q M R G L L A K R L
DSS        ATGAGTTCCGGTGTCTGTGGCCGAAACCACAGATGCGTGGTCTTCTGGCCAAGCGTCTG 60
Lewis      ATGAGTTCCGGTGTCTGTGGCCGAAACCACAGATGCGTGGTCTTCTGGCCAAGCGTCTG
*****

          R V H I V G A F V V A L G V A A A Y K F
DSS        CGGGTTCATATGTTGGCGCATTCTGTTGGCCCTAGGAGTGTCTGCTGCCTATAAGTTT 120
Lewis      CGGGTTCATATGTTGGCGCATTCTGTTGGCCCTAGGAGTGTCTGCTGCCTATAAGTTT
*****

          G V A E P R K K A Y A D F Y R N Y D S M
DSS        GGCGTGGCTGAACCAAGAAAGAAGGCTTATGCAGATTCTACAGGAATTATGACTCCATG 180
Lewis      GGCGTGGCTGAACCAAGAAAGAAGGCTTATGCAGATTCTACAGGAATTATGACTCCATG

```

```

*****
K D F E E M R Q A G V F Q S A K -
DSS AAAGATTTTGAAGAGATGAGGCAGGCTGGTGTCTTTTCAGAGTGCGAAGTGA 231
Lewis AAAGATTTTGAAGAGATGAGGCAGGCTGGTGTCTTTTCAGAGTGCGAAGTGA
*****

```

\* indicates nucleotide identity between the 2 strains. Amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs containing coding regions from DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced.

**Supplement 11 . Coding sequence alignment for *Thyrotropin releasing hormone receptor (Trhr)* between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats.**

```

M E N E T V S E L N Q T E L P P Q V A V
DSS ATGGAGAATGAAACCGTCAGTGAAGTGAACCAACCGAGCTCCCGCCGCAAGTAGCCGTG 60
Lewis ATGGAGAATGAAACCGTCAGTGAAGTGAACCAACCGAGCTCCCGCCGCAAGTAGCCGTG
*****
A L E Y Q V V T I L L V V V I C G L G I
DSS GCCCTCGAGTACCAGGTGGTCACCATCTTACTTGTGGTGGTTATCTGTGGACTGGGCATT 120
Lewis GCCCTCGAGTACCAGGTGGTCACCATCTTACTTGTGGTGGTTATCTGTGGACTGGGCATT
*****
V G N I M V V L V V M R T K H M R T A T
DSS GTGGGCAACATCATGGTAGTCCTGGTGGTCATGAGAACGAAGCACATGAGAACCCTACA 180
Lewis GTGGGCAACATCATGGTAGTCCTGGTGGTCATGAGAACGAAGCACATGAGAACCCTACA
*****
N C Y L V S L A V A D L M V L V A A G L
DSS AACTGCTACCTGGTGAAGTCTGGCTGTGGCCGATCTCATGGTCTGGTGGCTGCAGGCCCTC 240
Lewis AACTGCTACCTGGTGAAGTCTGGCTGTGGCCGATCTCATGGTCTGGTGGCTGCAGGCCCTC
*****
P N I T D S I Y G S W V Y G Y V G C L C
DSS CCCAACATCACCGACAGCATCTATGGTTCCTGGGTCTATGGCTATGTTGGCTGCCTCTGC 300
Lewis CCCAACATCACCGACAGCATCTATGGTTCCTGGGTCTATGGCTATGTTGGCTGCCTCTGC
*****
I T Y L Q Y L G I N A S S C S I T A F T
DSS ATCACGTATCTCCAGTACTTAGGAATTAACGCATCTTCATGCTCAATAACAGCCTTTACC 360
Lewis ATCACGTATCTCCAGTACTTAGGAATTAACGCATCTTCATGCTCAATAACAGCCTTTACC
*****
I E R Y I A I C H P I K A Q F L C T F S
DSS ATTGAGAGGTACATAGCAATCTGCCACCCATCAAAGCCCAGTTTCTGTGCACATTTTCC 420
Lewis ATTGAGAGGTACATAGCAATCTGCCACCCATCAAAGCCCAGTTTCTGTGCACATTTTCC
*****
R A K K I I I F V W A F T S I Y C M L W
DSS AGAGCCAAAAAATCATTATCTTTGTCTGGGCCTTTACATCCATTTACTGTATGTGTGG 480
Lewis AGAGCCAAAAAATCATTATCTTTGTCTGGGCCTTTACATCCATTTACTGTATGTGTGG
*****
F F L L D L N I S T Y K D A I V I S C G
DSS TTCTTCTTCTGGATCTCAATATCAGCACCTACAAAGATGCTATTGTGATATCCTGTGGC 540
Lewis TTCTTCTTCTGGATCTCAATATCAGCACCTACAAAGATGCTATTGTGATATCCTGTGGC
*****
Y K I S R N Y Y S P I Y L M D F G V F Y
DSS TACAAGATCTCCCGCAACTACTACTCACCTATTTACCTAATGGACTTTGGCGTCTTTTAT 600
Lewis TACAAGATCTCCCGCAACTACTACTCACCTATTTACCTAATGGACTTTGGCGTCTTTTAT
*****
V M P M I L A T V L Y G F I A R I L F L
DSS GTCATGCCAATGATCCTGGCCACTGTGCTTTACGGGTTTATAGCTAGAATCCTCTCTTTA 660
Lewis GTCATGCCAATGATCCTGGCCACTGTGCTTTACGGGTTTATAGCTAGAATCCTCTCTTTA
*****
N P I P S D P K E N S K T W K N D S T H
DSS AACCCCATTCCTTCAGACCTAAAGAAAACCTAAGACGTGGAAAATGACTCAACCCAT 720
Lewis AACCCCATTCCTTCAGACCTAAAGAAAACCTAAGACGTGGAAAATGACTCAACCCAT
*****
Q N K N M N L N T T N R C F N S T V S S
DSS CAGAACAAGAATATGAATTTAAACACCACCAACAGATGTTTCAACAGCACCGTTTCTTCC 780
Lewis CAGAACAAGAATATGAATTTAAACACCACCAACAGATGTTTCAACAGCACCGTTTCTTCC
*****
R K Q V T K M L A V V V I L F A L L W M
DSS AGGAAGCAGGTACCAAGATGCTTGCAGTGGTGTGTAATTCGTTTGCCTTTTATGGATG 840
Lewis AGGAAGCAGGTACCAAGATGCTTGCAGTGGTGTGTAATTCGTTTGCCTTTTATGGATG
*****
P Y R T L V V V N S F L S S P F Q E N W

```

```

DSS          CCCTACAGGACTCTTGTGGTTGTCAACTCATTCTCTCCAGCCCTTCCAGGAAAATTGG 900
Lewis       CCCTACAGGACTCTTGTGGTTGTCAACTCATTCTCTCCAGCCCTTCCAGGAAAATTGG
*****
          F L L F C R I C I Y L N S A I N P V I Y
DSS          TTCTTGCTCTTTTGCAGAATTGCATTTATCTCAACAGTGCCATCAACCCGGTGATTAC 960
Lewis       TTCTTGCTCTTTTGCAGAATTGCATTTATCTCAACAGTGCCATCAACCCGGTGATTAC
*****

          N L M S Q K F R A A F R K L C N C K Q K
DSS          AACCTCATGTCTCAGAAGTTTCGTGCAGCCTTCAGGAAGCTCTGCAATTGCAAGCAGAAG 1020
Lewis       AACCTCATGTCTCAGAAGTTTCGTGCAGCCTTCAGGAAGCTCTGCAATTGCAAGCAGAAG
*****
          P T E K A A N Y S V A L N Y S V I K E S
DSS          CCCACTGAGAAAGCTGCTAACTACAGTGTGGCCCTAAATTACAGTGTCAATCAAGGAGTCA 1080
Lewis       CCCACTGAGAAAGCTGCTAACTACAGTGTGGCCCTAAATTACAGTGTCAATCAAGGAGTCA
*****
          D R F S T E L D D I T V T D T Y V S T T
DSS          GACCGCTTTAGCACAGAGCTAGATGACATCACCGTCACTGACACGTATGTGTCAACCACA 1140
Lewis       GACCGCTTTAGCACAGAGCTAGATGACATCACCGTCACTGACACGTATGTGTCAACCACA
*****
          K V S F D D T C L A S E K N G P S S C T
DSS          AAAGTATCATTGATGACACCTGCTTGGCCTCCGAGAAGAATGGACCCAGTCTTGTACA 1200
Lewis       AAAGTATCATTGATGACACCTGCTTGGCCTCCGAGAAGAATGGACCCAGTCTTGTACA
*****
          Y G Y S L T A K Q E K I -
DSS          TATGGATATTCTTTGACTGCCAAACAGGAGAAAATATGA 1239
Lewis       TATGGATATTCTTTGACTGCCAAACAGGAGAAAATATGA
*****

```

\* indicates nucleotide identity between the 2 strains. Amino acid sequence is given on top. Genomic DNAs containing coding regions from DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced.

**Supplement 12: Coding sequence alignment for *Potassium channel, subfamily V, member 1 (Kcnv1)* between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats**

```

          M D L S P R N R P L L D S S S L D S G S
DSS
ATGGATCTGTCACCCCGCAACCGCCGCTTCTGGACTCGTCTCGCTGGACAGTGGCTCC 60
Lewis
ATGGATCTGTCACCCCGCAACCGCCGCTTCTGGACTCGTCTCGCTGGACAGTGGCTCC
*****
          L T S L D S S V F C S E G E G E P L A L
DSS
CTGACCTCGCTGGACTCCAGCGTCTTCTGCAGCGAGGGCGAAGGGGAACCCCTGGCTCTG 120
Lewis
CTGACCTCGCTGGACTCCAGCGTCTTCTGCAGCGAGGGCGAAGGGGAACCCCTGGCTCTG
*****
          G D C L T V N V G G S R F V L S Q Q A L
DSS
GGGGACTGCCTTACGGTCAACGTGGGAGGCAGCCGCTTCGTGCTCTCTCAGCAAGCTCTG 180
Lewis
GGGGACTGCCTTACGGTCAACGTGGGAGGCAGCCGCTTCGTGCTCTCTCAGCAAGCTCTG
*****
          S C F P H T R L G K L A V V V A S Y R R
DSS
TCCTGCTTCCCGCACACGCGCCTGGGCAAACCTGGCCGTGGTGGTGGCCTCCTACCGCCGC 240

```

Lewis  
TCCTGCTTCCCGCACACGCGCCTGGGCAAACCTGGCCGTGGTGGTGGCCTCTACCGCCGC

\*\*\*\*\*  
L G A L A A A P S P L E L C D D A N P V

DSS  
CTGGGCGCCCTGGCTGCAGCCCCAGCCCCTTGGAGCTTTGTGATGATGCCAACCCGGTA 300  
Lewis  
CTGGGCGCCCTGGCTGCAGCCCCAGCCCCTTGGAGCTTTGTGATGATGCCAACCCGGTA

\*\*\*\*\*  
D N E Y F F D R S S Q A F R Y V L H Y Y

DSS  
GACAACGAGTACTTCTTCGACCGCAGCTCTCAGGCATTCCGTTATGTCCTACACTATTAT 360  
Lewis  
GACAACGAGTACTTCTTCGACCGCAGCTCTCAGGCATTCCGTTATGTCCTACACTATTAT

\*\*\*\*\*  
R T G R L H V M E Q L C A L S F L Q E I

DSS  
CGCACTGGCCGCTTGCACGTCATGGAGCAGCTCTGTGCACTCTCCTTTCTTCAGGAGATC 420  
Lewis  
CGCACTGGCCGCTTGCACGTCATGGAGCAGCTCTGTGCACTCTCCTTTCTTCAGGAGATC

\*\*\*\*\*  
Q Y W G I D E L S I D S C C R D R Y F R

DSS  
CAGTACTGGGGCATCGATGAACTCAGCATCGACTCCTGCTGCAGGGACAGATACTTCAGA 480  
Lewis  
CAGTACTGGGGCATCGATGAACTCAGCATCGACTCCTGCTGCAGGGACAGATACTTCAGA

\*\*\*\*\*  
R K E L S E T L D F K K D T D D Q E S Q

DSS  
AGAAAGGAGCTGAGTGAAACTCTTGACTTCAAGAAGGACACAGATGACCAGGAAAGTCAA 540  
Lewis  
AGAAAGGAGCTGAGTGAAACTCTTGACTTCAAGAAGGACACAGATGACCAGGAAAGTCAA

\*\*\*\*\*  
H E S E Q D F S Q G P C P T V R Q K L W

DSS  
CATGAGAGTGAACAGGACTTCTCACAAAGGACCTTGTCTACCGTCCGACAAAAGCTCTGG 600  
Lewis  
CATGAGAGTGAACAGGACTTCTCACAAAGGACCTTGTCTACCGTCCGACAAAAGCTCTGG

\*\*\*\*\*  
D I L E K P G S S T A A R I F G V I S I

DSS  
GATATTCTGGAGAAGCCTGGGTCTTCCACAGCAGCCCGGATCTTTGGAGTGATCTCCATC 660  
Lewis  
GATATTCTGGAGAAGCCTGGGTCTTCCACAGCAGCCCGGATCTTTGGAGTGATCTCCATC

\*\*\*\*\*  
I F V A V S I V N M A L M S A E L S W L

DSS  
ATTTTGTGGCAGTGTCCATCGTCAACATGGCCCTGATGTCAGCTGAGCTAAGCTGGCTC 720  
Lewis  
ATTTTGTGGCAGTGTCCATCGTCAACATGGCCCTGATGTCAGCTGAGCTAAGCTGGCTC

```

*****
                N L Q L L E I L E Y V C I S W F T G E F
DSS
AACCTACAGCTGCTGGAGATTTTGGAGTATGTGTGCATCAGTTGGTTCACCGGGGAGTTC 780
Lewis
AACCTACAGCTGCTGGAGATTTTGGAGTATGTGTGCATCAGTTGGTTCACCGGGGAGTTC
*****
                I L R F L C V K D R C H F L R K V P N I
DSS
ATTCTGCGCTTCCTGTGTGTGAAAGACAGGTGCCACTTCTGAGGAAGGTCCAAACATC 840
Lewis
ATTCTGCGCTTCCTGTGTGTGAAAGACAGGTGCCACTTCTGAGGAAGGTCCAAACATC
*****

                I D L L A I L P F Y I T L L V E S L S G
DSS
ATAGACCTCCTTGCCATCTTGCCCTTCTACATAACTCTTCTGGTGGAAAGCCTGAGCGGC 900
Lewis
ATAGACCTCCTTGCCATCTTGCCCTTCTACATAACTCTTCTGGTGGAAAGCCTGAGCGGC
*****
                S H T T Q E L E N V G R L V Q V L R L L
DSS
AGCCACACCACCCAAGAGCTGGAAAATGTAGGACGTCTGGTCCAGGTTTTGAGGCTCCTT 960
Lewis
AGCCACACCACCCAAGAGCTGGAAAATGTAGGACGTCTGGTCCAGGTTTTGAGGCTCCTT
*****
                R A L R M L K L G R H S T G L R S L G M
DSS
AGAGCTCTGCGCATGCTGAAGCTGGGAAGGCATTCTACAGGATTGCGCTCACTTGGGATG 1020
Lewis
AGAGCTCTGCGCATGCTGAAGCTGGGAAGGCATTCTACAGGATTGCGCTCACTTGGGATG
*****
                T I T Q C Y E E V G L L L L F L S V G I
DSS
ACAATCACCCAGTGCTATGAAGAAGTCGGCCTACTGCTCCTGTTTCTATCTGTGGGAATT 1080
Lewis
ACAATCACCCAGTGCTATGAAGAAGTCGGCCTACTGCTCCTGTTTCTATCTGTGGGAATT
*****
                S I F S T I E Y F A E Q S I P D T T F T
DSS
TCTATATTTTCAACAATAGAATACTTTGCAGAGCAAAGCATTCCTGATACAACCTTCACA 1140
Lewis
TCTATATTTTCAACAATAGAATACTTTGCAGAGCAAAGCATTCCTGATACAACCTTCACA
*****
                S V P C A W W W A T T S M T T V G Y G D
DSS
AGTGTTCCTTGTGCATGGTGGTGGGCCACAACATCCATGACTACAGTAGGATATGGGGAC 1200
Lewis
AGTGTTCCTTGTGCATGGTGGTGGGCCACAACATCCATGACTACAGTAGGATATGGGGAC

```

```

*****
                I R P D T T T G K I V A F M C I L S G I
DSS
ATTAGACCAGACACCACGACAGGCAAAATCGTGGCCTTCATGTGTATTCTATCAGGAATC 1260
Lewis
ATTAGACCAGACACCACGACAGGCAAAATCGTGGCCTTCATGTGTATTCTATCAGGAATC
*****
                L V L A L P I A I I N D R F S A C Y F T
DSS
CTTGTCTTGGCCTTGCCATTATTAATGATCGCTTCTCTGCTTGTATTTCACC 1320
Lewis
CTTGTCTTGGCCTTGCCATTATTAATGATCGCTTCTCTGCTTGTATTTCACC
*****
                L K L K E A A V R Q R E A L K K L T K N
DSS
TTGAAACTCAAGGAAGCAGCTGTGAGACAGCGTGAAGCTCTCAAGAAGCTTACCAAGAAT 1380
Lewis
TTGAAACTCAAGGAAGCAGCTGTGAGACAGCGTGAAGCTCTCAAGAAGCTTACCAAGAAT
*****
                I A T D S Y I S V N L R D I Y A R S I M
DSS
ATAGCCACTGACTCATAATTAGTGTAACTGAGGGATATCTATGCCCGGAGCATCATG 1440
Lewis
ATAGCCACTGACTCATAATTAGTGTAACTGAGGGATATCTATGCCCGGAGCATCATG
*****
                E M L R L K G R E R A S T R S S G G D D
DSS
GAGATGCTTCGATTAAAGGGCAGGGAGAGAGCGAGTACTAGAAGCAGTGGTGGAGATGAT 1500
Lewis
GAGATGCTTCGATTAAAGGGCAGGGAGAGAGCGAGTACTAGAAGCAGTGGTGGAGATGAT
*****
                F W F -
DSS
TTCTGGTTTTTAA 1512
Lewis
TTCTGGTTTTTAA
*****

```

Amino acid sequence is given on top. \* indicates nucleotide identity between the 2 strains. Genomic DNAs containing coding regions from DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced.

**Supplement 13. Coding sequence alignment for *Arginine vasopressin receptor 1A (Avpr1a)* between Dahl salt-sensitive (DSS) and Lewis rats.**

```

                M S F P R G S Q D R S V G N S S P W W P
DSS
ATGAGTTTCCCGCAGGGCTCCAGGATCGGTCCGTGGGCAACTCCAGCCCGTGGTGGCCT 60
Lewis
ATGAGTTTCCCGCAGGGCTCCAGGATCGGTCCGTGGGCAACTCCAGCCCGTGGTGGCCT
*****
                L T T E G S N G S Q E A A R L G E G D S
DSS
CTAACCACCGAGGGCTCCAACGGCAGTCAGGAGGCAGCCAGGCTTGGGGAAGGTGACAGC 120
Lewis
CTAACCACCGAGGGCTCCAACGGCAGTCAGGAGGCAGCCAGGCTTGGGGAAGGTGACAGC
*****

```

P L G D V R N E E L A K L E I A V L A V  
 DSS CCGCTGGGGGACGTACGCAATGAGGAGCTGGCCAAACTGAAATCGCTGTGCTGGCAGTG 180  
 Lewis CCGCTGGGGGACGTACGCAATGAGGAGCTGGCCAAACTGAAATCGCTGTGCTGGCAGTG  
 \*\*\*\*\*  
 I F V V A V L G N S S V L L A L H R T P  
 DSS ATTTTGTGGTGGCTGTGCTGGGCAATAGCAGTGTGCTGTGGCGCTGCATCGCACGCCA 240  
 Lewis ATTTTGTGGTGGCTGTGCTGGGCAATAGCAGTGTGCTGTGGCGCTGCATCGCACGCCA  
 \*\*\*\*\*  
 R K T S R M H L F I R H L S L A D L A V  
 DSS CGCAAGACATCCCGCATGCACCTCTTTATCCGACACCTCAGCCTGGCAGACCTGGCGGTC 300  
 Lewis CGCAAGACATCCCGCATGCACCTCTTTATCCGACACCTCAGCCTGGCAGACCTGGCGGTC  
 \*\*\*\*\*  
 A F F Q V L P Q L C W D I T Y R F R G P  
 DSS GCCTTCTTCCAAGTATTACCGCAGCTATGCTGGGACATCACCTACCGCTTCCGCGGGCCG 360  
 Lewis GCCTTCTTCCAAGTATTACCGCAGCTATGCTGGGACATCACCTACCGCTTCCGCGGGCCG  
 \*\*\*\*\*  
 D W L C R V V K H L Q V F A M F A S A Y  
 DSS GACTGGCTGTGCCCGTGGTGAAGCACCTGCAGGTGTTTGCCATGTTTCGCGTCTGCCTAT 420  
 Lewis GACTGGCTGTGCCCGTGGTGAAGCACCTGCAGGTGTTTGCCATGTTTCGCGTCTGCCTAT  
 \*\*\*\*\*  
 M L V V M T A D R Y I A V C H P L K T L  
 DSS ATGCTGGTGGTGTGATGACAGCCGACCGCTACATCGCCGTGTGCCACCCGCTCAAGACCCCTG 480  
 Lewis ATGCTGGTGGTGTGATGACAGCCGACCGCTACATCGCCGTGTGCCACCCGCTCAAGACCCCTG  
 \*\*\*\*\*  
 Q Q P A R R S R L M I A T S W V L S F I  
 DSS CAGCAGCCGGCGCCGCTCGCGCCTCATGATCGCCACCTCTGGGTGCTGAGTTTCATA 540  
 Lewis CAGCAGCCGGCGCCGCTCGCGCCTCATGATCGCCACCTCTGGGTGCTGAGTTTCATA  
 \*\*\*\*\*  
 L S T P Q Y F I F S V I E I E V N N G T  
 DSS CTAAGCACGCCACAGTACTTTATATTCTCTGTGATCGAAATCGAGGTGAACAATGGCACT 600  
 Lewis CTAAGCACGCCACAGTACTTTATATTCTCTGTGATCGAAATCGAGGTGAACAATGGCACT  
 \*\*\*\*\*  
 K T Q D C W A T F I Q P W G T R A Y V T  
 DSS AAAACCCAAGACTGTGGGTACCTTCATCCAGCCCTGGGGTACCCGCGCCTACGTGACC 660  
 Lewis AAAACCCAAGACTGTGGGTACCTTCATCCAGCCCTGGGGTACCCGCGCCTACGTGACC  
 \*\*\*\*\*  
 W M T S G V F V A P V V V L G T C Y G F  
 DSS TGGATGACCAGCGGTGTCTTCGTGGCACCTGTGGTCTTGGGTACATGCTATGGCTTC 720  
 Lewis TGGATGACCAGCGGTGTCTTCGTGGCACCTGTGGTCTTGGGTACATGCTATGGCTTC  
 \*\*\*\*\*  
 I C Y H I W R N I R G K T A S S R H S K  
 DSS ATCTGCTACCACATCTGGCGCAACATCCCGGAAAGACAGCGTCTCGCGACACAGCAAG 780  
 Lewis ATCTGCTACCACATCTGGCGCAACATCCCGGAAAGACAGCGTCTCGCGACACAGCAAG  
 \*\*\*\*\*  
 G D K G S G E A V G P F H K G L L V T P  
 DSS GGTGACAAGGGCTCTGGGGAGGCGTGGGTCCCTTTCATAAGGGGCTTTTGGTTACACCT 840  
 Lewis GGTGACAAGGGCTCTGGGGAGGCGTGGGTCCCTTTCATAAGGGGCTTTTGGTTACACCT  
 \*\*\*\*\*  
 C V S S V K S I S R A K I R T V K M T F  
 DSS TGTGTGACGAGCGTGAAGAGCATTTCGCGCCCAAGATCCGCACCTGTGAAGATGACCTTT 900  
 Lewis TGTGTGACGAGCGTGAAGAGCATTTCGCGCCCAAGATCCGCACCTGTGAAGATGACCTTT  
 \*\*\*\*\*  
 V I V S A Y I L C W A P F F I V Q M W S  
 DSS GTGATGTAAGCGCCTACATCCTTTGCTGGGCGCCTTCTTCATTGTCCAGATGTGGTCA 960  
 Lewis GTGATGTAAGCGCCTACATCCTTTGCTGGGCGCCTTCTTCATTGTCCAGATGTGGTCA  
 \*\*\*\*\*  
 V W D E N F I W T D S E N P S I T I T A  
 DSS GTCTGGGATGAGAATTTTCATCTGGACCGATTTCAGAAAACCCCTCCATCACAATCACGGCG 1020  
 Lewis GTCTGGGATGAGAATTTTCATCTGGACCGATTTCAGAAAACCCCTCCATCACAATCACGGCG  
 \*\*\*\*\*  
 L L A S L N S C C N P W I Y M F F S G H  
 DSS TTGCTGGCTTCCTTGAACAGCTGCTGCAACCCGTGGATATACATGTTTTTCAGTGGCCAT 1080  
 Lewis TTGCTGGCTTCCTTGAACAGCTGCTGCAACCCGTGGATATACATGTTTTTCAGTGGCCAT  
 \*\*\*\*\*  
 L L Q D C V Q S F P C C H S M A Q K F A  
 DSS CTCCTGCAAGACTGCGTCCAAAGTTTCCCATGCTGCCACAGCATGGCGCAGAAATTCGCC 1140  
 Lewis CTCCTGCAAGACTGCGTCCAAAGTTTCCCATGCTGCCACAGCATGGCGCAGAAATTCGCC  
 \*\*\*\*\*  
 K D D S D S M S R R Q T S Y S N N R S P  
 DSS AAGGATGACTCCGATAGCATGAGCCGAAGACAGACTTCTTATTCTAACACCGGAGCCCA 1200  
 Lewis AAGGATGACTCCGATAGCATGAGCCGAAGACAGACTTCTTATTCTAACACCGGAGCCCA  
 \*\*\*\*\*



```

      T N S T G M W K D S P K S S K S I R F I
DSS   ACGAACAGCACTGGGATGTGGAAGGACTCGCCCAAATCTTCCAAATCCATCAGATTCATT 1260
Lewis ACGAACAGCACTGGGATGTGGAAGGACTCGCCCAAATCTTCCAAATCCATCAGATTCATT
*****
      P V S T -
DSS   CCTGTCTCCACTTGA 1275
Lewis CCTGTCTCCACTTGA
*****

```

Amino acid sequence is given on top. \* indicates nucleotide identity between the 2 strains. Genomic DNAs from DSS and Lewis were first amplified by PCR and then sequenced.

# **VIII-2 Hypertension Suppression, Not a Cumulative Thrust of Quantitative Trait Loci, Predisposes Blood Pressure Homeostasis to Normotension**

**Kimberley Crespo, Annie Ménard, Alan Y. Deng**

**Publié dans *Circulation, Cardiovascular Genetics* (2015), Aug;8(4):610-7**

Ma contribution à cet article, en tant que première auteure, repose sur le génotypage des génomes entiers des souches congéniques et des rats issus des croisements en retour réalisés. Annie Ménard s'est occupée de la réalisation des souches congéniques et des croisements en retour à la base de ces travaux.

Ma contribution aux figures et tableaux de l'article en pourcentage:

Figure 1: 100%

Tableau: 100%

# Hypertension Suppression, Not a Cumulative Thrust of Quantitative Trait Loci, Predisposes Blood Pressure Homeostasis to Normotension

Kimberley Crespo, BS; Annie Ménard, MS; Alan Y. Deng, PhD

**Background**—Genetics of high blood pressure (BP) has revealed causes of hypertension. The cause of normotension, however, is poorly understood. Inbred Lewis rats sustain normotension despite a genetic push in altering BP. It was unknown whether this rigid resistance to BP changes is because of an insufficient hypertensive impact from limited alleles of quantitative trait loci (QTLs) or because of an existence of a master control superseding the combined strength of hypertensive QTL alleles.

**Methods and Results**—Currently, BP-elevating QTL alleles from hypertensive Dahl salt-sensitive rats (DSS) replaced those of Lewis on chromosomes 7, 8, 10, and 17 on the Lewis background. These hypertensive QTL alleles were then merged to systematically achieve multiple combinations. Results showed that there was no quantitative correlation between BP variations and the number of hypertensive QTL alleles, and that BP was only slightly elevated from a combined force of normotensive alleles from 7 QTLs. Thus, a genetic factor aside from the known QTLs seemed to be at play in preserving normotension and act as a hypertension suppressor. A follow-up study using consecutive backcrosses from Dahl salt-sensitive rats and Lewis identified a chromosome segment where a hypertension suppressor might reside.

**Conclusions**—Our results provide the first evidence that normotension is not enacted via a numeric advantage of BP-lowering QTL alleles, and instead can be achieved by a particular genetic component actively suppressing hypertensive QTL alleles. The identification of this hypertension suppressor could result in formulating unique diagnostic and therapeutic targets, and above all, preventive measures against essential hypertension. (*Circ Cardiovasc Genet.* 2015;8:610-617. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000965.)

**Key Words:** blood pressure ■ chromosomes ■ genetics ■ models, animal ■ rats

Essential hypertension is one of the most prominent disorders leading to fatal cardiovascular and renal diseases and is known to be polygenic.<sup>1</sup> The genetic architecture of polygenic hypertension has long been thought to be composed of individual constituents known as quantitative trait loci (QTLs) for blood pressure (BP).<sup>2,3</sup> These QTLs, and mostly because of them, are expected to be genetically responsible for linearly increasing or decreasing BP by a cumulative-of-miniscule-effect formula.<sup>2,3</sup> Although this assumption follows statistical calculations well, the actual biological impact of BP QTLs, in reality and functionally, acts according to modularity rather than accumulatively aggregating independent individual units when experimentally combined in an animal model, the hypertensive Dahl salt-sensitive rats (DSS).<sup>4</sup>

## Editorial see p 541 Clinical Perspective on p 617

A qualifying caveat in this line of work is that experimentally combining QTLs was successfully performed exclusively in the genetic background of DSS, which has lost the capacity of buffering BP changes.<sup>5</sup> The reverse is not expected

to be informative if the work was to be done in the normotensive Lewis genetic background. How can this be? What is so special about the Lewis genetic background?

Hypertensive animal models are widely appreciated as potent tools for comprehending the pathogenesis of essential hypertension. In comparison, normotensive animals, beyond their usefulness as controls for hypertensive models, have received little recognition capable of unmasking critical mechanisms that can prevent hypertension. For example, genome regulations in Lewis are so powerful that the ability of QTLs in raising and diminishing BP can be annulled.<sup>5</sup> Thus, a thorough understanding of the pathogenesis of hypertension requires the identification of individual QTLs. Conversely, the elucidation of mechanisms sustaining normotension demands our comprehension of the genetic element(s) that can nullify the impact of hypertensive QTL alleles.

Although contributions from BP-increasing alleles of QTLs to hypertension are well recognized,<sup>2,3,6</sup> little is known about the nature of genome regulations on QTLs that can over-ride their impact on BP.<sup>6,7</sup> An obvious question to address is what is the genetic basis of these genome regulations?

Received November 20, 2014; accepted May 4, 2015.

From the Department of Medicine, Research Centre-Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

The Data Supplement is available at <http://circgenetics.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000965/-/DC1>.

Correspondence to Alan Y. Deng, PhD, Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Technopôle Angus, 2901 Rachel St E, Room 312, Montréal, Québec H1W 4A4, Canada.

© 2015 American Heart Association, Inc.

*Circ Cardiovasc Genet* is available at <http://circgenetics.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000965

Downloaded from <http://circgenetics.ahajournals.org/> by guest on September 17, 2015

Because they can negate the effects of BP QTLs,<sup>5</sup> it seems most likely that a suppressor would function in the Lewis genome, but it would be either dysfunctional or missing in the DSS genome.<sup>6,7</sup> Alternatively, an inadequate accumulation of hypertensive QTL alleles could not be ruled out.

The current investigation had 3 objectives. First, an analysis was to be performed to ascertain the BP influence of various hypertensive QTL alleles on different chromosomes on the Lewis genetic background. Second, because BP is a quantitative trait, if no BP effect could be achieved from a single QTL from 1 chromosome, double and multiple QTL combinations from several chromosomes were to be made. Finally, genomic segment(s) that potentially contain a hypertension suppressor(s) (HSs), whether it is a QTL or not, was to be defined.

## Methods

### Animals

Protocols for handling as well as maintaining animals were approved by our institutional animal committee (CIPA). The DSS and Lewis strains are the same as used previously.<sup>5</sup>

### Construction of New Congenic Strains

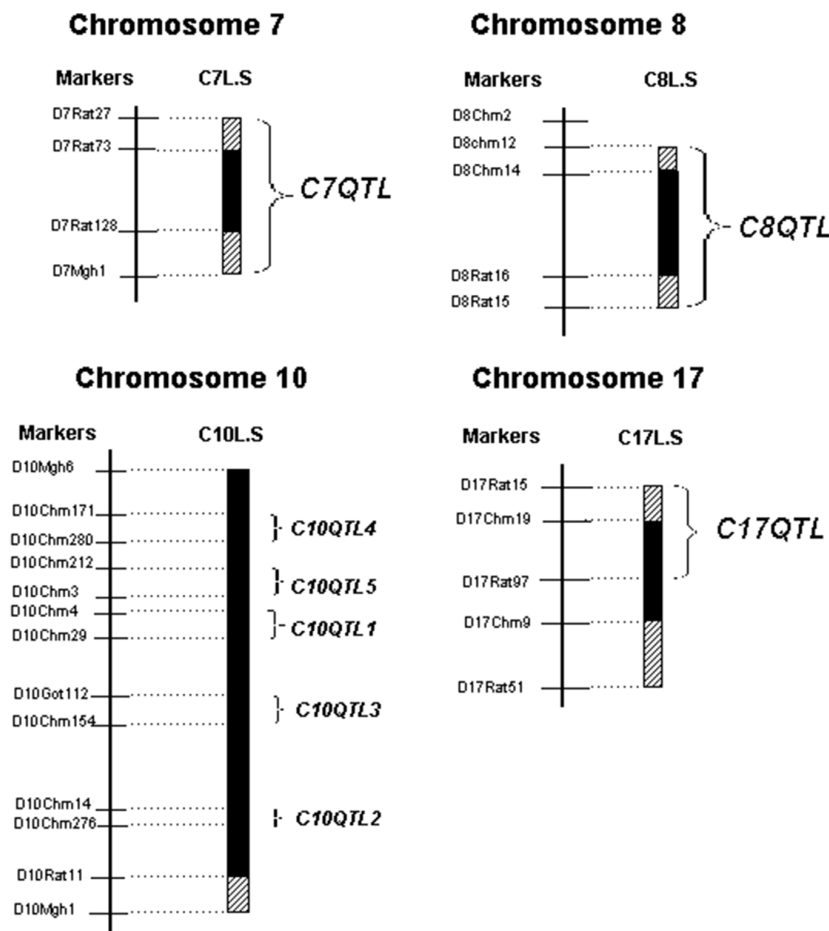
Congenic strains bear different segments of Lewis chromosomes that are replaced by the homologues of DSS. The breeding and screening procedures in this process were similar to those reported previously.<sup>4,5</sup> For the present work, 4 new congenic strains were produced (Figure 1), designated: Lewis.DSS-(D7Rat27-D7Mgh1)/Lt (abbreviated as C7L.S), Lewis.DSS-(D8Chm12-D8Rat15)/Lt (abbreviated as C8L.S), Lewis.DSS-(D10Mgh6-D10Mgh1)/Lt (abbreviated as C10L.S), and Lewis.DSS-(D17Rat15-D17Rat51)/Lt (abbreviated as C17L.S). Rats for chromosomes 1 and 16 failed to reproduce in the last round of breeding to build LL homozygotes, and consequently no congenic strains were established for these chromosomes.

### Manufacture of Congenic Combinations

A congenic strain for 1 chromosome was coalesced with another from a separate chromosome to synthesize a double or multiple QTL aggregate.

### Generation of Backcross Animals

The process was similar to that of creating a congenic strain,<sup>5</sup> except that no chromosome segments were selected. Briefly, DSS was bred with Lewis to produce F<sub>1</sub> progeny. F<sub>1</sub>s were backcrossed to DSS to



**Figure 1.** Chromosome coverage of 4 congenic strains and quantitative trait loci (QTL) placements within them. Solid bars under congenic strains symbolize the chromosome fragments that have been replaced by those of Dahl salt-sensitive rats. Hatched bars on ends of solid bars indicate the ambiguities of crossover breakpoints between markers. The actual mean arterial pressures for Lewis and congenic strains are given in Figure I in the Data Supplement. The full names are given in the Construction of new congenic strains section. The placements of the blood pressure QTLs are marked in the right by brackets. The data defining these QTLs are given in Figure II in the Data Supplement.

beget backcross 1 (BC1) offspring, then BC2, and so on. BPs of rats from F<sub>1</sub> and each BC generation were measured.

### Animal Protocols, BP Measurement, and Statistical Analyses

Breeding protocols, dietary treatments, implantation, and BP measurement schedules were virtually the same as documented previously.<sup>5</sup> Briefly, male rats were weaned at 21 days of age, maintained on a low-salt diet (0.2% NaCl, Harlan Teklad 7034) and followed by a high-salt diet (2% NaCl, Harlan Teklad 94217) starting from 35 days of age until the end of the experiment. Telemetry probes were implanted at 56 days of age (namely 3 weeks from the time of the high-salt diet).

Repeated measures ANOVA followed by Dunnett test, which corrects for multiple comparisons and unequal sample sizes, was used to compare a parameter in mean arterial pressure (MAP) between 2 groups, a congenic and Lewis strains, as reported previously.<sup>4,5</sup> The Systat 9 program from SPSS Science was used. The power of such an analysis with 5 to 10 rats in each group is high enough to detect BP differences by telemetry.<sup>4,5</sup> The study provides 85% power for detecting BP differences between 2 strains.

## Results

### Nomenclature Clarifications

First, a single gene is presumed to be responsible for 1 QTL.<sup>8</sup> Second, BP, MAP, or hypertension is interchangeably used to designate a QTL, because all the QTLs in our studies simultaneously affect MAP, systolic arterial and diastolic arterial pressures.

### Rationale and Study Design

Two types of genetic factors could be a HS in short: (1) one (or several) of the Lewis BP QTL alleles themselves and (2) one (or several) of Lewis alleles other than BP QTLs. If a Lewis BP QTL allele was such a HS, a congenic strain with each of other QTLs in double and multiple combinations would provide some insights. If a HS was a gene other than a BP QTL, it would be necessary to pinpoint the chromosome segment in the genome harboring it in a manner unprejudiced toward, and nonprescribed by, QTLs.

### BP Effects of Single Congenic Strains

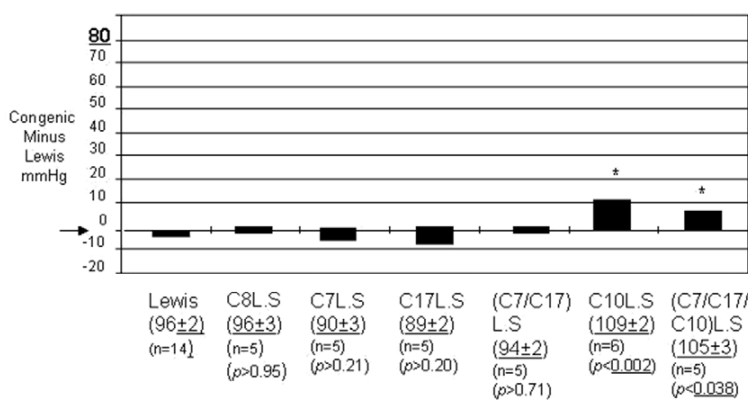
Figure I in the Data Supplement displays MAPs for each of 4 congenic strains, C7L.S, C8L.S, C17L.S, and C10L.S, as well as for each congenic combination. In designating a congenic strain, for example, C7 refers to chromosome 7, L preceding S indicates that the former provided the recipient background and L and S refer to Lewis and DSS chromosome segments, respectively. Because systolic arterial pressures and diastolic arterial pressures were consistent (data not shown) with MAPs of all the strains, only their MAPs are presented.

The congenic strain made in the Lewis genetic background, that is, C8L.S, did not show a BP different from that of Lewis (Figure IA in the Data Supplement; Figure 2). Similarly, C7L.S and C17L.S cannot singularly change BP from the level of Lewis (Figure I in the Data Supplement; Figure 2), despite that each of them (Figure 1) carries the hypertensive DSS alleles from at least 1 BP QTL<sup>4</sup> and the magnitude of the BP response from each QTL is considerable when placed in the DSS background (Figure II in the Data Supplement). This fact signifies that the HS is not the alleles from any one of the QTLs nor do they belong to any of other genes residing in the chromosome region specified by each of the 3 congenic strains, C7L.S, C8L.S, and C17L.S.

C10L.S slightly, but significantly, increased BP (ANOVA  $P<0.002$ ) from the Lewis comparing strain (Figure IE in the Data Supplement; Figure 2), indicating that DSS alleles from 5 BP QTLs<sup>4,9</sup> conveyed by the congenic strain partially overcame the control of a HS. Whether a HS was Lewis alleles from 1 of 5 BP QTLs could not be established.

### Combining QTLs to Ascertain the Possibility That the Lewis Alleles From a BP QTL Could be a HS

The congenic strains built in the Lewis background could be combined progressively and with one increment at a time. First, if with a specific combination, a significant BP impact was seen, the Lewis QTL alleles on the chromosome could be implicated as a HS. Second, if a BP effect was observed



**Figure 2.** Mean arterial pressure (MAP) changes in congenic strains in the Lewis background. The arrow points at the Lewis background as the reference group. MAP of Dahl salt sensitive rats (DSS) minus Lewis is  $\approx 80$  mmHg as underlined and in bold on the y axis. The actual MAPs for Lewis and congenic strains are given in Figure I in the Data Supplement. The chromosome coverage of each congenic strain is indicated in Figure 1. The quantitative trait loci (QTL) on each chromosome were defined by congenic strains made in the DSS background. Their MAPs are provided in Figure IIA in the Data Supplement. The magnitude of effects on blood pressure from these QTLs is displayed in Figure IIB in the Data Supplement. On the x axis, numbers underlined and below the strain indicates the averaged MAP for that rat strain as derived from the actual MAP data shown in Figure I in the Data Supplement.  $\pm$  indicates SEM; n, number of rats in each group; and P, ANOVA+Dunnett comparing that group with Lewis in MAP.

and increased proportionately to the number of DSS alleles of QTLs added onto it, it could mean that it were the quantitative accumulations of the QTL alleles that regulated BP.

C7L.S was first combined with C17L.S to form a combination of (C7C17)L.S. Its BP was not different from that of C7L.S or C17L.S alone (ANOVA  $P>0.28$ ; Figure 2; Figure I in the Data Supplement). This lack of effect indicates that neither C7QTL nor C17QTL Lewis alleles can be a HS for each other and HS, if anything, cannot be attributed to a quantitative accumulation of the Lewis alleles from the 2 QTLs.

Because C10L.S that lodges DSS alleles from 5 QTLs (Figure 1) exhibited an augmentation in BP compared with Lewis (Figure IE in the Data Supplement; Figure 2), 2 issues emerged. First, the alleles from each QTL might only be able to exert a minor, but insignificant amount of, influence and it was only in summation from the DSS alleles from multiple QTLs could they reach a threshold to change BP. In this scenario, one expects BP would multiply proportionately with the addition of more DSS alleles from additional QTLs in (C7/C17/C10)L.S, as the threshold seemed to have been overcome in C10L.S. Alternatively, the Lewis alleles from 1 of 5 QTLs could act as a HS. In this case, (C7/C17/C10)L.S should show an increase in BP from C10L.S.

As shown in Figure 2 and Figure I in the Data Supplement, BP of (C7/C17/C10)L.S was not different from that of C10L.S alone (ANOVA  $P=0.28$ ; Figure IG in the Data Supplement). This outcome demonstrated that the impact of all the hypertensive alleles from 7 QTLs were blunted by the suppressive effect of a HS, and it is the action of a HS, not a quantitative aggregation of QTL alleles that controlled BP changes in the Lewis background. The HS cannot be the Lewis alleles from any of the 5 QTLs replaced in C10L.S.

Because of these results, no additional combinations of DSS QTL alleles were pursued. The HS seemed to be composed of a Lewis gene other than the Lewis alleles of the known BP QTLs. It would be more informative, then, that an approach not selecting for QTLs should be adopted to locate the HS.

### Identifying a Chromosome Region Possibly Harboring a HS

An intercross between DSS and Lewis yielded  $F_1$  progeny, that is,  $F_1$ (DSS×Lewis), and their BP was not different from that of Lewis (Figure III in the Data Supplement). This outcome showed complete dominance of the Lewis genome and is consistent with our previous evidence that most heterozygous congenic strains possessed the same BP effect as homozygotes.<sup>10</sup> Thus, the most direct and efficient strategy to identify chromosome regions harboring a HS appeared to be the following.

Backcrosses were to be made to progressively increase the DSS genome content until a BP effect could be seen. One could then correlate the BP change with the genome segments that were SL heterozygotes in 1 backcross generation, but SS in the immediately after backcross generation. Consequently, one could deduce the Lewis genome composition which, when replaced by that of DSS, may have removed the suppressive control on the DSS BP QTL alleles. Consequently, one could locate a HS.

$F_1$ , BC1, BC2, and BC3 generations carry, on average, 50%, 25%, 12.5%, and 6.25% of the Lewis genome, respectively. BPs of BC1 and BC2 are not significantly different from those of Lewis and  $F_1$  (Figure III in the Data Supplement), indicating that the remaining 6.25% Lewis genome should contain a HS. Indeed, BP of BC3 rats turned sharply higher than that of BC2 rats (Figure III in the Data Supplement). Because each rat in BC2 or BC3 was different from one another, a thorough genotype comparison among all the rats individually was performed along with their BPs. A total genome scan (Table) revealed SL and SS regions in BC2 and BC3 rats. BC2 rats were further divided into 2 groups on the basis of their BP readings, that is, BC2 high BP (HBP) rats and BC2 low BP (LBP) rats.

The criterion of selecting the appropriate chromosome fragments potentially carrying a HS was established as follows: all the rats with low BP comparable with that of BC1 should be SL in BC2, which still possessed a suppressive capability, and all the rats with a BP increase in BC2 and BC3 should be SS, which seemed to have lost the suppressive capability.

According to this strict criterion, only 1 chromosome region qualified for a lodging a HS. This segment was designated as C18HS, and its size was  $\approx 20$  cM<sup>5</sup> between 2 newly generated markers, C18Chm238 and C18Chm126, without accounting for the ambiguous regions. C18Chm126 and D18Chm238 are situated between D18Mit8 and D18Mgh3, and between D18Rat1 and the end of Chr 18, respectively.<sup>5</sup> The Table shows that C18HS was SS in all BC3 rats as well as in the 3 BC2 HBP rats, that is, BC2 HBP<sub>a</sub>, BC2 HBP<sub>b</sub>, and BC2 HBP<sub>c</sub>. C18HS was SL in all BC2 LBP rats, namely BC2 LBP<sub>a</sub>, BC2 LBP<sub>b</sub>, and BC2 LBP<sub>c</sub>. Thus, being SL seemed to be required for C18HS to retain its suppressive capacity, which was lost when C18HS became SS. Coincidentally, a congenic strain, C18L.S, was LL in C18HS,<sup>5</sup> thus explaining its lack of BP impact. The extent of C18HS is delimited to the section between C18Chm238 and not lower than C18Mit8 (Table), because BC2 HBP<sub>b</sub>, which has lost the suppressive capability, was SS for C18Chm126, but SL for D18Mit8.

The section between C18Mit8 and C18Wox7 can be excluded to harbor a HS, because C18L.S did not exhibit a BP influence,<sup>5</sup> in spite of the presence of DSS alleles from 2 separate BP QTLs. If any of these 2 QTLs were a HS, one would expect to see a BP increase in C18L.S, because these 2 QTL alleles were SS in genotypes.

Based on the criterion of selecting a HS-containing segment defined previously, most regions did not qualify because they were either SS in BC2 LBP rats or SL in BC3, or both (Table). An analysis of contradictory correlation disqualified other chromosome segments. For instance, D1Uia12 was SL for BC2 LBP<sub>a</sub> and BC2 LBP<sub>b</sub>, but SS for BC2 LBP<sub>c</sub>. D1Uia12 was SL for BC2 HBP<sub>a</sub> and BC2 HBP<sub>b</sub>, despite being SS for BC3 rats. A similar process of disqualification was applied to the chromosome fragments marked by chromosome markers such as D3Rat66, D6Mit1, D7Mgh1, and D11Mit1.

### Discussion

Principal revelations from the current work are (1) a singular or aggregated impact toward hypertension from DSS QTL

**Table. Identification of a Chromosome 18 Region Potentially Containing a Hypertension Suppressor in the Lewis Genome by a Total Genome Scan of Backcross Rats With Dahl Salt-Sensitive Rats**

Chr	Markers	BC2						BC3						
		LBP <sub>a</sub>	LBP <sub>b</sub>	LBP <sub>c</sub>	HBP <sub>a</sub>	HBP <sub>b</sub>	HBP <sub>c</sub>	a	b	c	d	e	f	g
MAP		87	105	105	131	125	132	133	130	130	157	137	140	136
Chr 1	D1Wox25	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS
	D1Rat304	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS
	D1Mco27	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL
	<i>Sa</i>	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS
	D1Uia12	SL	SL	SS	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D1Arb33	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SL	SL	SL	SS
	D1Rat19	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SL	SS
Chr 2	<i>Camk</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	<i>Gca</i>	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS
	D2Rat302	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS
	<i>Cpb</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D2Rat199	SS	SL	SS	SL	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS
Chr 3	D2Uia5	SS	SL	SL	SL	SS	SL	SL	SL	SL	SS	SL	SS	SS
	D3Rat107	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS
	D3Rat17	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL
	D3Rat24	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D3Rat66	SS	SL	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS
	D3Wox3	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D3Rat52	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	L
Chr 4	D4Mgh1	SL	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D4Mgh16	SS	SS	SL	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SL	SS	SL	SS
	D4Uia1	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SL	SL	SL	SS
	D4Mit17	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SL	SL	SS	SS
	D4Uia4	SS	SS	SL	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS
Chr 5	D5Rat130	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D5Uia8	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SS	SS	SS
	D5Mco2	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS
Chr 6	<i>Ela2</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS
	D6Rat105	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D6Mit1	SL	SL	SS	SL	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Chr 7	D6Mgh3	SS	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS
	D7Mgh1	SL	SL	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D7Rat152	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D7Rat44	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D7Rat110	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D7Rat18	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D7Rat128	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Chr 8	D7Rat115	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D8Mgh11	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D8Rat134	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D8Rat43	SS	SL	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D8Uia2	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Chr 9	D8Rat55	SS	SS	SL	SL	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS
	D9Rat64	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	D9Uia9	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS
	D9Wox23	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS

(Continued)



Table. Continued

Chr	Markers	BC2						BC3							
		LBP <sub>a</sub>	LBP <sub>b</sub>	LBP <sub>c</sub>	HBP <sub>a</sub>	HBP <sub>b</sub>	HBP <sub>c</sub>	a	b	c	d	e	f	g	
Chr 10	D10Mco10	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL
	D10Mco17	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS
	D10Mgh6	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SS	SS	SL	SS	SS	
	D10Wox6	SL	SS	SL	SL	SS	SS	SL	SL	SS	SS	SL	SS	SS	
	D10M11Mit58	SL	SS	SS	SL	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	
Chr 11	D11Rat50	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D11Mit1	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D11Uiai	SS	SS	SL	SS	SL	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
Chr 12	D12Mit6	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D12Rat32	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D12Mit4	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	
Chr 13	D13Mgh4	SL	SL	SL	SS	SS	SL	SS	SL	SS	SL	SL	SS	SS	
	D13Uia3	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SS	SS	SS	
	D13Uia8	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SS	SL	SL	
Chr 14	D14Wox10	SL	SS	SS	SL	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D14Uia2	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D14Uia1	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
Chr 15	D15Uia8	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D15Mgh2	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D15Rat126	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	
Chr 16	D16Rat14	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D16Rat67	SL	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	
	D16Uia2	SL	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SL	
	D16Mit2	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	
Chr 17	D17Rat65	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SL	SS	SS	
	D17Mit5	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	SL	SS	SS	
	D17Mgh5	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	SS	SS	
	<i>Edn1</i>	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SL	SS	SS	
Chr 18	D18Chm237	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	
	D18Chm238	SL*	SL*	SL*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	
	D18Rat1	SL*	SL*	SL*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	
	D18Uia6	SL*	SL*	SL*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	
	D18Rat45	SL*	SL*	SL*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	
	D18Mgh3	SL*	SL*	SL*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	
	D18Chm126	SL*	SL*	SL*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	SS*	
	D18Mit8	SL	SL	SL	SS	SL	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	
	D18Mco6	SL	SL	SL	SS	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	
	D18Wox7	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SS	
Chr 19	D19Rat82	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SL	SL	SS	SS	SS	SS	
	D19Rat25	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SL	SL	SS	SS	SS	SS	
	D19Rat57	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SS	SS	
Chr 20	D20Wox3	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SS	SL	SS	
	D20Wox1	SS	SS	SS	SS	SL	SS	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SS	
	D20Mgh1	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SL	SL	SS	SS	SS	SS	SL	
Chr X	DXUia2	LL	LL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	LL	SS	SS	SS	
	DXMco1	SS	LL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	LL	SS	SS	SS	SS	
	DXRat93	SS	LL	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	LL	SS	

The sequence of marker appearances reflects their order on the map of each chromosome. BC indicates backcross; HBP, high blood pressure; LBP, low blood pressure; and MAP, mean arterial pressure.

\*The genotypes define C18HS and are SL in genotype for all the BC2 low BP rats, but SS in genotype for all the BC2 high BP rats and all the BC3 rats. MAP for each rat is given in millimeter of mercury.



alleles is suppressed by the Lewis background, indicating that BP as a quantitative trait is not strictly determined by the cumulative-of miniscule-effect assumption. (2) A HS exists in the Lewis genome and does not belong to the alleles of any of the known BP QTLs. (3) A previously undefined segment on chromosome 18 might harbor such a HS and no BP QTL is known to be responsible for it.

### HS Regulates the Function of BP QTLs

A systematic assembly of BP-raising alleles from multiple QTLs originating from DSS revealed that a hierarchical genetic regulation plays a dominant part in how BP QTLs behave. The genetic study in backcross animals with a gradual removal of the suppressive control (Table) accentuated and provisionally isolated a chromosome section possibly harboring a HS. The unified results from the 2 lines of investigation established and then reinforced the existence of a HS and thus represents a significant advancement in revealing potential mechanisms beyond a simple description of a QTL dependence on a genetic background.

As to the nature of the HS, it could serve as a regulator at any level controlling BP QTLs ranging from transcription, post-transcription, translation, post-translation to protein interactions, although a possibility cannot be ruled out that the HS could play a dual role in regulating other QTLs as well as being a QTL itself. This HS might be absent or defective in the DSS so that the stabilizing mastery of QTLs on BP variations is lost.

The emerging conceptual HS may conflict with the prevailing conventional wisdom. Namely, the determinant to achieve either hypertension or normotension might be the balancing act of the number of alleles in BP-increasing and BP-lowering QTLs in the genome. In the DSS genome, BP-raising QTL alleles outnumber BP-reducing QTL alleles,<sup>4</sup> possibly rendering DSS hypertensive. Conversely, in the Lewis genome, BP-decreasing QTL alleles exceed BP-rising QTL alleles,<sup>4</sup> tilting the overall BP toward normotension. Although the numeric account of BP-raising and diminishing QTL alleles may be true, the genetic machinery that forces the functional change in actual BP performs differently.

Evidently, the replacement of BP-increasing by BP-decreasing alleles at 1 QTL alone (Figure II in the Data Supplement), for example, on Chr 17,<sup>11</sup> is sufficient to decrease the overall BP, in spite of an overwhelming computational advantage of BP-augmenting QTLs presumably counteracting it in the DSS background.<sup>6</sup> Thus, the balancing theory remains mostly conjectural. In contrast, the presence of a HS is experimentally prescribed and should expedite our understanding of the master control that stands higher in the regulatory hierarchy than hypertension QTL alleles in accumulation.

### Cumulative Aggregation of QTLs Does Not Correlate Quantitatively With a BP Consequence

As BP is a quantitative trait, every time when no BP effect can be generated from a congenic strain replacing QTL alleles known to decrease BP, an intuitive suspicion falls instantly on the possibility that not enough BP-increasing QTL alleles may be involved. As proved in the current work, amassing more BP-augmenting alleles from more QTLs such as C7L.S plus

C17L.S could not budge BP. Therefore, in the Lewis background, the BP quantitative trait is not summarily determined by additivity of QTL alleles. The marginal BP rise in C10L.S can be interpreted as an additive influence of QTL alleles from 2 epistatic modules, not by a mere increment in QTL numbers.<sup>4</sup>

### Creative Genetic Approach Leads Us to Tentatively Locating a HS

Although sophisticated permutation tests are available for comprehensively analyzing interactions in permutation between all pairs of markers in a  $F_2$  population ([www.jax.org/research/churchill](http://www.jax.org/research/churchill)), this approach was not adopted for the following reason. Because the Lewis genome is completely dominant over that of DSS shown in  $F_1$  (DSS×Lewis; Figure III in the Data Supplement), we were seeking, instead, to demonstrate a direct cause–effect relationship between a chromosome fragment and the presence of a HS by removing a L allele from it. In locating the HS (Table), the correlation was qualitative and 100%, not merely statistically supported, between the chromosome segment and the presence or absence of a BP suppressive effect. The interim assignment of a HS residing in C18SH validated the proximate applicability of this approach.

Although several BP QTLs have been defined by DSS-based congenic strains<sup>5,12</sup> in the vicinity of the region containing the putative HS, they cannot be responsible for the action of the HS. This is because a congenic strain made in the Lewis background, C18L.S, cumulatively carries hypertensive alleles of 3 QTLs, *C18QTL1*, *C18QTL2*, and *C18QTL3*.<sup>5,12</sup> In spite of it, no change in BP ensued. This result has 2 implications. First, although it cannot be excluded that the HS may still be a BP QTL, it cannot be any of *C18QTL1*, *C18QTL2*, and *C18QTL3*. Second, an accumulation of BP-lowering alleles from multiple QTLs such as *C18QTL1*, *C18QTL2*, and *C18QTL3* cannot be a cause of normotension.

The location of the HS (Table) falls in the section not covered by C18L.S,<sup>5</sup> and thus represents a new region.

### Prospect

The existence of a HS or a QTL regulator supplies a prerequisite first step both conceptually and experimentally toward its ultimate identification, much like the QTL identification itself.<sup>8</sup>

### Summary

An ordered analysis of QTLs and their combinations have unveiled that, beyond QTL modularity, performances of QTLs can actually be over-ridden by genetic regulatory elements above them in the hierarchy. In the context of BP homeostasis, the undertaking of these elements prohibits hypertension. Further genetic analyses have corroborated this notion and provisionally pinpointed the genome location where a HS might reside. A molecular identification of a HS will reveal a novel mechanism that could provide a master control over the QTLs directly modulating the BP internal stability. It is, therefore, likely that genetic, molecular, and physiological studies of the HS may yield innovative diagnostic tools, relief measures, and, more importantly, preventive means against essential hypertension.

### Sources of Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to A.Y. Deng and a doctoral fellowship to K. Crespo (Fond de recherche en sante du Quebec).

### Disclosures

None.

### References

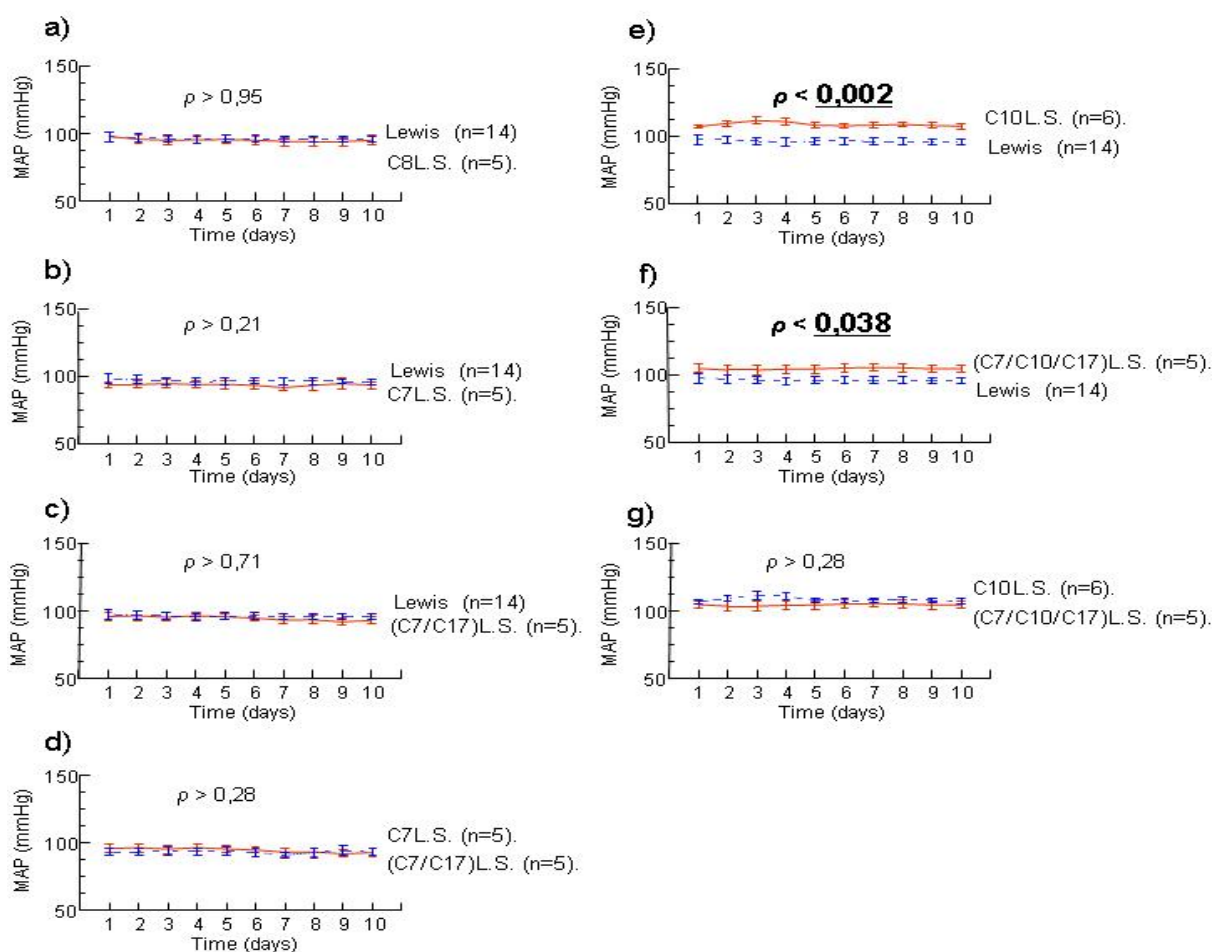
1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127:e6–e245. doi: 10.1161/CIR.0b013e31828124ad.
2. International BP Consortium. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011;478:103–109.
3. Munroe PB, Barnes MR, Caulfield MJ. Advances in blood pressure genomics. *Circ Res*. 2013;112:1365–1379. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300387.
4. Chauvet C, Crespo K, Ménard A, Roy J, Deng AY. Modularization and epistatic hierarchy determine homeostatic actions of multiple blood pressure quantitative trait loci. *Hum Mol Genet*. 2013;22:4451–4459. doi: 10.1093/hmg/ddt294.
5. Charron S, Lambert R, Eliopoulos V, Duong C, Ménard A, Roy J, et al. A loss of genome buffering capacity of Dahl salt-sensitive model to modulate blood pressure as a cause of hypertension. *Hum Mol Genet*. 2005;14:3877–3884. doi: 10.1093/hmg/ddi412.
6. Deng AY. Genetic basis of polygenic hypertension. *Hum Mol Genet*. 2007;16 Spec No. 2:R195–R202. doi: 10.1093/hmg/ddm126.
7. Deng AY. Genetic mechanisms of polygenic hypertension: fundamental insights from experimental models. *J Hypertens*. 2015;33:669–680. doi: 10.1097/HJH.0000000000000479.
8. Deng AY. Positional cloning of quantitative trait Loci for blood pressure: how close are we?: a critical perspective. *Hypertension*. 2007;49:740–747. doi: 10.1161/01.HYP.0000259105.09235.56.
9. Chauvet C, Ménard A, Xiao C, Aguila B, Blain M, Roy J, et al. Novel genes as primary triggers for polygenic hypertension. *J Hypertens*. 2012;30:81–86. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834d4db1.
10. Duong C, Charron S, Deng Y, Xiao C, Ménard A, Roy J, et al. Individual QTLs controlling quantitative variation in blood pressure inherited in a Mendelian mode. *Heredity (Edinb)*. 2007;98:165–171. doi: 10.1038/sj.hdy.6800920.
11. Grondin M, Eliopoulos V, Lambert R, Deng Y, Ariyaratna A, Moujahidine M, et al. Complete and overlapping congenics proving the existence of a quantitative trait locus for blood pressure on Dahl rat chromosome 17. *Physiol Genomics*. 2005;21:112–116. doi: 10.1152/physiolgenomics.00275.2004.
12. Chauvet C, Crespo K, Ménard A, Wu Y, Xiao C, Blain M, et al.  $\alpha$ -Kinase 2 is a novel candidate gene for inherited hypertension in Dahl rats. *J Hypertens*. 2011;29:1320–1326. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834705e4.

### CLINICAL PERSPECTIVE

Most of the scientific and clinical research in hypertension focuses on uncovering causes of hypertension. As an antithesis to hypertension, normotension seems more frequent than hypertension in  $\approx 70\%$  of the general population and is sustained. Despite of this fact, little attention has been paid to understanding mechanisms of achieving and maintaining normotension as well as opposing hypertension. The current article documents the results of an original approach in the genetics of normotension. First, by systematically increasing the number of hypertensive quantitative trait loci alleles in the resistant background, a slight blood pressure augmentation was seen, but not in proportion to the quantity of hypertensive quantitative trait loci alleles. Second, by gradually decreasing the resistant genome in backcrosses between the susceptible and resistant genetic backgrounds, we were able to detect a chromosome region associated with blood pressure changes. Thus, a potential hypertension suppressor is thought to exist in the resistant genetic background. Thus, a cumulative thrust from multiple hypertensive quantitative trait loci alleles does not drive blood pressure changes and cannot overcome the power of the genome that resists the rise in blood pressure. A novel concept emerges that a hypertension suppressor exists in the normotensive genome. Consequently, an antihypertensive genetic locus may exist. Its molecular identification will likely result in formulating a novel diagnostic and therapeutic strategy in preventing or resisting hypertension. This strategy may over-ride the hypertensive influences from genetic elements. Consequently, a novel and hierarchical avenue of antihypertensive drugs can be developed beyond targeting renin–angiotensin systems,  $\beta$ -blockers, and diuretics.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

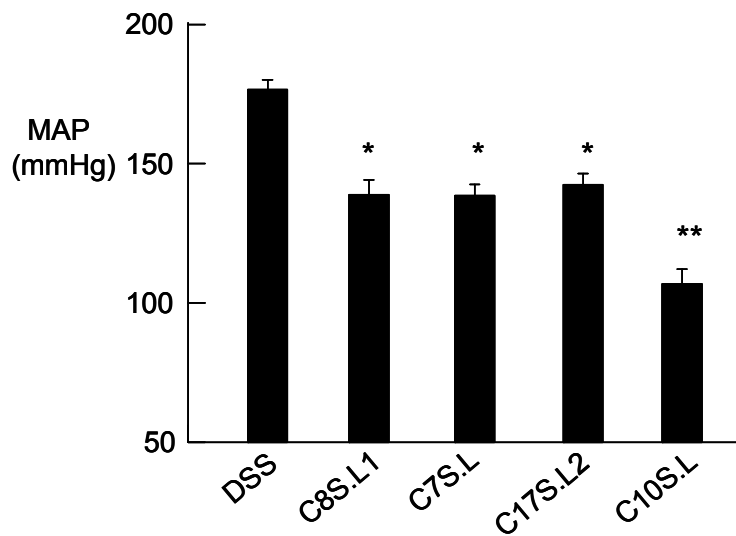
**Supplement 1. Mean arterial pressures (MAPs) of single, double and multiple congenic combinations.** The MAPs were averaged readings for the rat strains during the course of the measurements. The congenic strain designations were given in detail in the method section under Construction of new congenic strains. The chromosome span for each congenic strain is denoted in Figure 1. Statistic analyses were given in methods. p, repeated measures ANOVA followed by Dunnett; n, number of rats, error bars represent SEM for each rat strain.



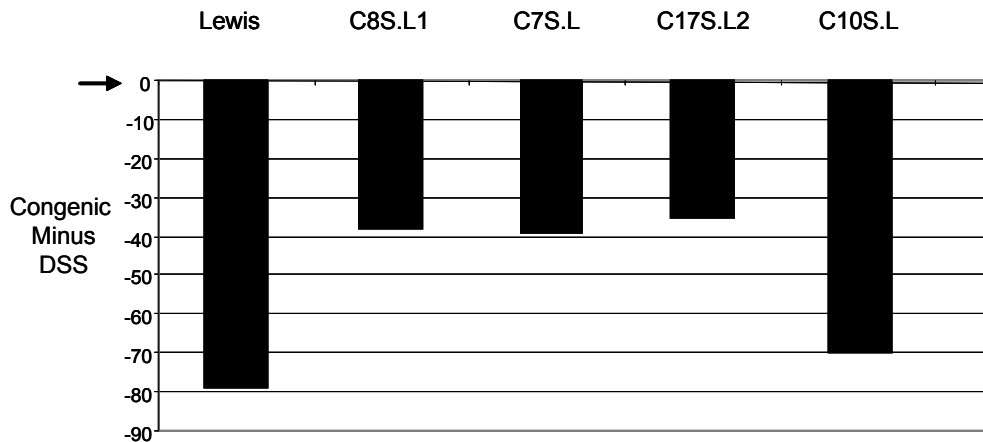
## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Supplement 2. Mean arterial pressures (MAPs) and their changes in congenic strains built in the Dahl-salt sensitive (DSS) background.** MAPs were averaged readings for the strains during the course of the measurements. The number of rats for the strains ranged from 6-15. The BP results were published for Chromosome (Chr) 8 (*J. Hypertens* 2004;22:1495), 17 (*Physiol. Genomics* 2005;21:112) and 10 (*Hypertension* 2005;46:1300). The chromosome span lodging each QTL is denoted in Figure 1. a). The actual MAPs measured. \* denotes a difference in MAPs between DSS and a congenic strain. \*\* signifies differences in MAP between that congenic strain and other congenic strains as well as DSS. b) A change in the MAP (mmHg) of congenic minus DSS rats. The arrow indicates the DSS background as 0. The Lewis column indicates the MAP difference in Lewis minus DSS as a point of reference.

a)

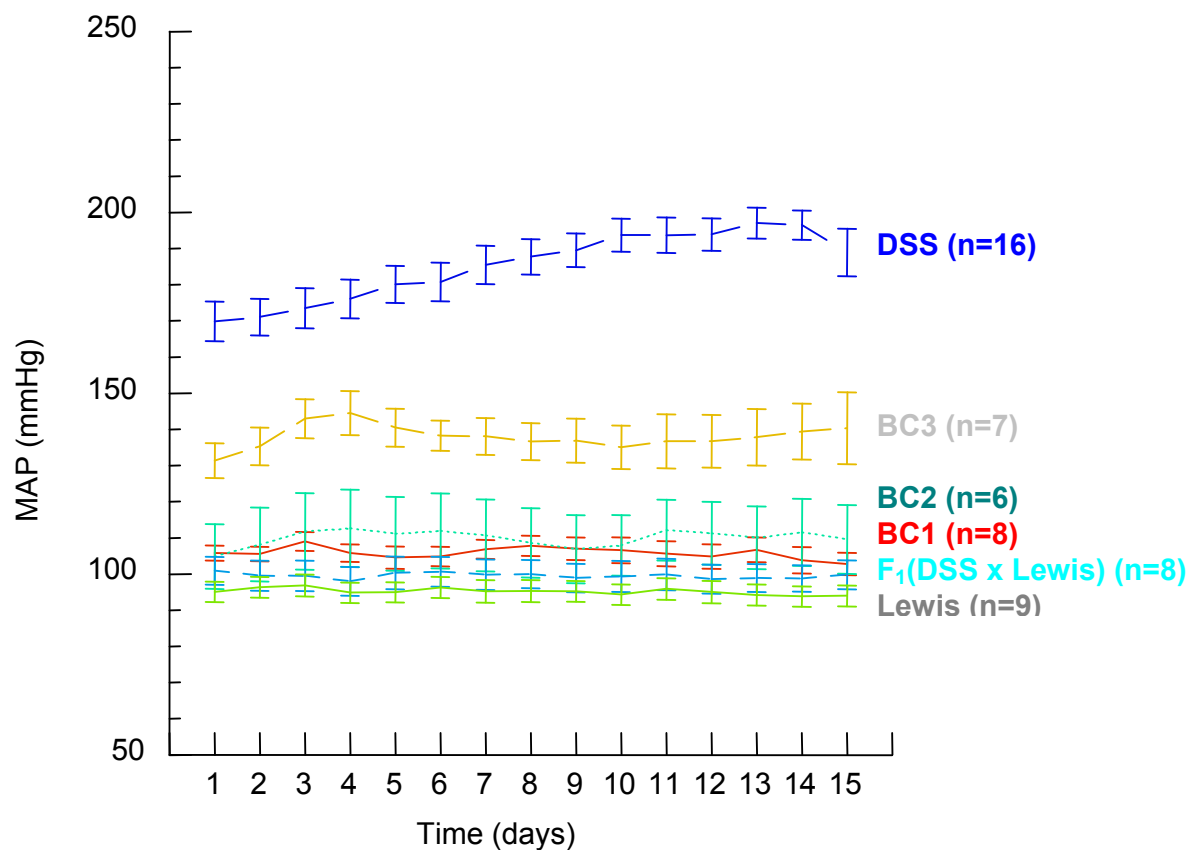


b)



## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Supplement 3. Changes in mean arterial pressures (MAPs) in successive backcrosses (BC) to DSS.** MAPs were measured in Dahl salt-sensitive (DSS) rats, Lewis rats, F<sub>1</sub>(DSS x Lewis), and each BC generation. Rats in F<sub>1</sub>(DSS x Lewis), BC1, BC2 and BC3 were randomly chosen. Error bars represent SEM. n refers to the number of rats. Each point on the BP tracings represents a 24-hour readings. On average throughout the measurements, MAPs for Lewis, F<sub>1</sub>(DSS x Lewis), BC1, BC2 and BC3 were 98 ± 2, 97 ± 4, 106 ± 2, 106 ± 7, and 133 ± 2 respectively (± SEM). There seemed to be a gradual increase in MAP from BC1 to BC2, although MAPs among Lewis, F<sub>1</sub>(DSS x Lewis), BC1 and BC2, are not significant (p>0.089). In contrast, MAPs between BC2 and BC3 are significantly different (p<0.01). Individuals BC2 and BC3 rats were genotyped by a total genome scan and their genotypes and MAPs are presented in the Table in the text of the manuscript.



### VIII-3 Les transporteurs des acides aminés

Les acides aminés provenant de la digestion des protéines par l'intestin arrivent, entre autre, dans les reins où ils vont être filtrés puis réabsorbés.

Le transport des acides aminés à travers la membrane plasmique des néphrons peut être sodium-dépendante ou indépendante et utilise la charge et le gradient de concentration de ces derniers. Sauf rares exceptions, les acides aminés sont transportés via différents systèmes permettant un sauvetage en cas d'inactivation mutationnelle d'un des transporteurs (Bröer S., 2008). Parmi ces transporteurs, la famille SLC7 (*solute carrier family 7*) se divise en deux sous familles: les transporteurs d'acides aminés cationiques (CATs) et ceux de type « L » (LATs) qui représentent la sous-unité légère ou catalytique des transporteurs hétérodimériques (HATs) qui sont liés à la sous-unité lourde de l'antigène 4F2, 4F2hc (SLC3A2) ou rBAT (SLC3A1) via un pont disulfide. Ces deux sous-unités sont des glycoprotéines formant la famille SLC3. La plupart des CATs sont bien caractérisés et permettent une diffusion facilitée des acides aminés cationiques. Ces derniers jouent un rôle dans le transport de la L-arginine dans certaines cellules permettant la synthèse de NO. Les HATs, quant à eux, sont principalement des échangeurs d'acides aminés neutres (système L et asc), aromatiques (arpAT), anioniques (système X<sub>c</sub><sup>-</sup>), cationiques plus neutres (systèmes y<sup>+</sup>L et b<sup>0,+</sup>) et jouent un rôle important dans la réabsorption rénale et dans l'équilibre redox. Les transporteurs y<sup>+</sup>L sont les seuls membres HATs co-transporteurs de Na<sup>+</sup> et d'acides aminés neutres. On distingue six LATs formant des hétérodimères avec 4F2hc (SLC3A2): LAT1-2 (SLC7A5, SLC7A8), y<sup>+</sup>LAT1-2 (SLC7A7, SLC7A6), l'antiporteur cystine/glutamate (xCT, SLC7A11) et le transporteur alanine-serine-cysteine 1 (Asc-1, SLC7A10). Seul b<sup>0,+</sup>AT (SLC7A9) forme des hétérodimères avec rBAT. arpAT (Slc7a15) s'hétérodimérise avec 4F2hc et rBAT. Deux autres LATs, AGT1 (SLC7A13) et Asc-2 (Slc7a12) s'associent avec des sous-unités lourdes qui n'ont pas encore été identifiées. Ces derniers présentent une homologie de séquence protéique avec les autres LATs d'environ 45% et seulement 23-32%, respectivement (Fotiadis D. *et al*, 2013).

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Lewis, O. (1994). Stephen Hales and the measurement of blood pressure. *Journal of Human Hypertension*, 8(12), 865–71.
2. Sherwood L., Ectors F. (2015), *Physiologie humaine, 3<sup>ème</sup> édition*. Juin 2015. Chapitre 9, page 241
3. Beevers, G., Lip, G. Y., & O'Brien, E. (2001). ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 322(7291), 912–6.
4. Benetos, A., Safar, M., Rudnichi, A., Smulyan, H., Richard, J.-L., Ducimetiere, P., & Guize, L. (1997). Pulse Pressure : A Predictor of Long-term Cardiovascular Mortality in a French Male Population. *Hypertension*, 30(6), 1410–1415.
5. La Fondation Canadienne du Rein, 2004, <http://www.rein.ca>
6. Sesso, H. D., Stampfer, M. J., Rosner, B., Hennekens, C. H., Gaziano, J. M., Manson, J. E., & Glynn, R. J. (2000). Systolic and Diastolic Blood Pressure, Pulse Pressure, and Mean Arterial Pressure as Predictors of Cardiovascular Disease Risk in Men. *Hypertension*, 36(5), 801–807.
7. Shea, S. A., Hilton, M. F., Hu, K., & Scheer, F. A. J. L. (2011). Existence of an endogenous circadian blood pressure rhythm in humans that peaks in the evening. *Circulation Research*, 108(8), 980–4.
8. Pickering, T. G., Hall, J. E., Appel, L. J., Falkner, B. E., Graves, J., Hill, M. N., ... Roccella, E. J. (2005). Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Cou. *Circulation*, 111(5), 697–716.
9. Fouët X.A., (1999). *Cardiologie sous la direction de Xavier André-Fouët, 1er, 2ème et 3ème de médecine générale, préparation au concours de l'internat. Collège des enseignants de cardiologie, Université Claude-Bernard, Lyon 1. Presse universitaire de Lyon. ISBN 2-7297-0636-4*
10. Guénard, H. (2001). *Physiologie humaine. Wolters Kluwer France.*



11. Navaneethan, S. D., Lohmeier, T. E., & Bisognano, J. D. Baroreflex stimulation: A novel treatment option for resistant hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, 2008, 3(1), 69–74.
12. Mullins, L. J., Bailey, M. A., & Mullins, J. J. (2006). Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiological Reviews*, 86(2), 709–746.
13. Lemarié, C. A., Tharaux, P.-L., & Lehoux, S. (2010). Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(3), 433–9.
14. Chapleau, M. W., Li, Z., Meyrelles, S.S., Ma, X., & Abboud, F. M. (2006). Mechanisms Determining Sensitivity of Baroreceptor Afferents in Health and Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001, 940(1), 1–19.
15. Lifton, R.P., A.G. Gharavi, and D.S. Geller (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 104(4): 545-56
16. Chopra, S., Baby, C., & Jacob, J. J. (2011). Neuro-endocrine regulation of blood pressure. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15 Suppl 4, S281–8
17. Mannelli, M., Pupilli, C., Lanzillotti, R., Ianni, L., & Serio, M. (1990). Catecholamines and blood pressure regulation. *Hormone Research*, 34(3-4), 156–60.
18. Krzesinski J-M., Saint Remy A. (2012). Les maladies complexes: l’hypertension artérielle *Rev Med Liège*; 67 : 5-6 : 279-285
19. Krzesinski J-M. (2003). Nouvelles directives américaines et européennes en 2003 pour la prise en charge de l’hypertension artérielle. *Rev Med Liege*; 58 : 9 : 563-571
20. Kater, C. E., & Biglieri, E. G. (1994). Disorders of steroid 17 alpha-hydroxylase deficiency. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 23(2), 341–57.
21. Persson, P. B. (2003). Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 3), 667–71.
22. Lote, C. (2012). *Principles of Renal Physiology*. Springer Science & Business Media.
23. Backris G, 2014, *Merk Manuals*, <http://www.merckmanuals.com/professional/cardiovascular-disorders/hypertension/overview-of-hypertension>

24. Jeunemaitre X, Julien J, Michel J-B, « HYPERTENSION », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 30 juillet 2015, <http://www.universalis.fr/encyclopedie/hypertension/>
25. Chung M.K, Rich M.W. (1990), Introduction to the cardiovascular system. *Alcohol Health and Research World*. 14(4), 269.
26. Lorenz, J. N. (2010). Chymase: the other ACE? *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 298(1), F35–6.
27. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 2003;24:261–71
28. Sandoo, A., Van Zanten, J. J. C. S. V., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4, 302–12.
29. Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10), 1285–95.
30. Jose, P. A., Eisner, G. M., & Felder, R. A. (2003). Regulation of blood pressure by dopamine receptors. *Nephron. Physiology*, 95(2), p19–27.
31. Fleming, I. (2002). To Move or Not To Move?: Cytochrome P450 Products and Cell Migration. *Circulation Research*, 90(9), 936–938.
32. Elbekai, R. H., & El-Kadi, A. O. S. (2006). Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(2), 564–587.
33. Xiao, Y. F., Huang, L., & Morgan, J. P. (1998). Cytochrome P450: A novel system modulating Ca<sup>2+</sup> channels and contraction in mammalian heart cells. *Journal of Physiology*, 508(3), 777–792.
34. Ponnuchamy, B., & Khalil, R. A. (2009). Cellular mediators of renal vascular dysfunction in hypertension. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(4), R1001–18.
35. Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2013), Panorama mondiale de l'hypertension, un « tueur silencieux » responsable d'une crise de santé publique mondiale. Journée mondiale de la santé 2013.

36. Hypertension Canada (Juin 2015): <https://www.hypertension.ca/fr/hypertension/what-do-i-need-to-know/know-my-number> (revue par les paires)
37. Sandberg, K., & Ji, H. (2012). Sex differences in primary hypertension. *Biology of Sex Differences*, 3(1), 7.
38. Dempsey, J. A., Veasey, S. C., Morgan, B. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiological Reviews*, 90(1), 47–112.
39. Sohn, V., Herbert, G., Arthurs, Z., Starnes, B., & Andersen, C. (2007). Coarctation de l'aorte thoraco-abdominale et hypertension réno-vasculaire chez une jeune fille irakienne de 14 ans : les pièges du diagnostic et du traitement chirurgical. *Annales de Chirurgie Vasculaire*, 21(5), 278–282.
40. Grzegorzewski Y. (2000). *Hypertyroïdie et hypertension artérielle pulmonaire: analyse à partir de deux cas identifiés au centre hospitalier de Douai et revue de la littérature*
41. Modellar, S., Decagny, B., Fournier, A., & Slama, M. (2003). Hypertension artérielle maligne Malignant hypertension. *Réanimation*, 12(4), 297–305.
42. Berris, B., & Owen, T. (1965). Unusual manifestations of myxoedema. *Canadian Medical Association Journal*, 93, 21–5.
43. Bondonno, C. P., Yang, X., Croft, K. D., Considine, M. J., Ward, N. C., Rich, L., ... Hodgson, J. M. (2012). Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women: a randomized controlled trial. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(1), 95–102.
44. Higashi, Y., Sasaki, S., Kurisu, S., Yoshimizu, A., Sasaki, N., Matsuura, H., ... Oshima, T. (1999). Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*, 100(11), 1194–202.
45. Bacon, S. L., Campbell, T. S., Arsenault, A., & Lavoie, K. L. (2014). The impact of mood and anxiety disorders on incident hypertension at one year. *International Journal of Hypertension*, 2014, 953094.

46. Damasceno, A., Caupers, P., Santos, A., Lobo, E., Sevene, E., Bicho, M., & Polónia, J. (2000). Influence of salt intake on the daytime-nighttime blood pressure variation in normotensive and hypertensive black subjects. *Portuguese Journal of Cardiology : An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology*, 19(3), 315–29.
47. Ferrannini, E., & Cushman, W. C. (2012). Diabetes and hypertension: The bad companions. *The Lancet*, 380(9841), 601–610.
48. Dorresteijn, J. a N., Visseren, F. L. J., & Spiering, W. (2012). Mechanisms linking obesity to hypertension. *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 13(1), 17–26.
49. Arora, P., & Newton-Cheh, C. (2010). Blood pressure and human genetic variation in the general population. *Current Opinion in Cardiology*, 25(3), 229–237.
50. Société Québécoise d'Hypertension Artérielle (SQHA) (2015): <http://www.hypertension.qc.ca/content.asp?node=4>, juin 2015
51. Agence de santé publique du Canada, 2009, [http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/cvd-mcv/hypertension\\_figures-fra.php](http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/cvd-mcv/hypertension_figures-fra.php)
52. Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109(3), 433–8.
53. Penna, G. L. de A., Garbero, R. de F., Neves, M. F., Oigman, W., Bottino, D. A., & Bouskela, E. (2008). Treatment of essential hypertension does not normalize capillary rarefaction. *Clinics (São Paulo, Brazil)*, 63(5), 613–8.
54. Murfee, W. L., & Schmid-Schönbein, G. W. (2008). Chapter 12. Structure of microvascular networks in genetic hypertension. *Methods in Enzymology*, 444, 271–84.
55. Lehoux, S., Castier, Y., & Tedgui, A. (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *Journal of Internal Medicine*, 259(4), 381–92.

56. Koh, K. K., Han, S. H., Oh, P. C., Shin, E. K., & Quon, M. J. (2010). Combination therapy for treatment or prevention of atherosclerosis: focus on the lipid-RAAS interaction. *Atherosclerosis*, 209(2), 307–13.
57. Alexander, R. W. (1995). Hypertension and the Pathogenesis of Atherosclerosis : Oxidative Stress and the Mediation of Arterial Inflammatory Response: A New Perspective. *Hypertension*, 25(2), 155–161.
58. Fondation des maladies du coeur et de l'AVC, 2015, <http://www.fmcoeur.qc.ca/site/apps/nlnet/content2.aspx?c=kplQKVOxFoG&b=4289839&ct=6059295>
59. Brutsaert, D. L., & De Keulenaer, G. W. (2006). Diastolic heart failure: a myth. *Current Opinion in Cardiology*, 21(3), 240–248.
60. Krier, J. D., Crane, J. A., Eirin, A., Zhu, X.-Y., Lerman, A., & Lerman, L. O. (2013). Hemodynamic determinants of perivascular collateral development in swine renal artery stenosis. *American Journal of Hypertension*, 26(2), 209–17.
61. Plomin, R., Haworth, C. M. A., & Davis, O. S. P. (2009). Common disorders are quantitative traits. *Nature Reviews. Genetics*, 10(12), 872–8.
62. Mansour-Chemaly, M., Haddy, N., Siest, G., & Visvikis, S. (2002). Family studies: their role in the evaluation of genetic cardiovascular risk factors. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, 40(11), 1085–96.
63. Ehret, G. B. (2010). Genome-wide association studies: Contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Current Hypertension Reports*.
64. Barroso, I., Gurnell, M., Crowley, V. E., Agostini, M., Schwabe, J. W., Soos, M. a, ... O'Rahilly, S. (1999). Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature*, 402(6764), 880–3.
65. Cowley, A. W. (2006). The genetic dissection of essential hypertension. *Nature Reviews. Genetics*, 7(11), 829–40.

66. Lee, W. K., Padmanabhan, S., & Dominiczak, A. F. (2000). Genetics of hypertension: from experimental models to clinical applications. *Journal of Human Hypertension*, 14(10/11), 631–647.
67. Maass, P. G., Aydin, A., Luft, F. C., Schächterle, C., Weise, A., Stricker, S., ... Bähring, S. (2015). PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nature Genetics*, 47(6), 647–53.
68. Wilson, F. H., Hariri, A., Farhi, A., Zhao, H., Falk, K., Toka, H. R., ... Lifton, R. P. (2004). A Cluster of Metabolic Defects Caused by Mutation in a Mitochondrial tRNA. *Science*, 306(5699), 1190–1194.
69. Pulst, S. M. (1999). Genetic Linkage Analysis. *Archives of Neurology*, 56(6), 667.
70. NIH, 2015, <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=haploinsufficiency>
71. Ott, J., Wang, J., & Leal, S. M. (2015). Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 16.
72. Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman.
73. Creighton, H. B., & McClintock, B. (1931). A Correlation of Cytological and Genetical Crossing-Over in Zea Mays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 17(8), 492–7.
74. Allaby M. "haplotype." A Dictionary of Ecology. 2004. *Encyclopedia.com*. (August 5, 2015). <http://www.encyclopedia.com/doc/1O14-haplotype.html>
75. Suarez, B. K., Rice, J., & Reich, T. (1978). The generalized sib pair IBD distribution: its use in the detection of linkage. *Annals of Human Genetics*, 42(1), 87–94.
76. Norrgard, K. (2008) Genetic variation and disease: GWAS. *Nature Education* 1(1):87
77. Shifman, S., Jane Kuypers, Mark Kokoris, Benjamin Yakir and Ariel Darvasi (2003). Linkage disequilibrium patterns of the human genome across populations. *Human Molecular Genetics*, 12(7), 771–776.

78. Evans, D. M., & Cardon, L. R. (2005). A comparison of linkage disequilibrium patterns and estimated population recombination rates across multiple populations. *American Journal of Human Genetics*, 76(4), 681–7.
79. Slatkin, M. (2008). Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews. Genetics*, 9(6), 477–85.
80. Newton-Cheh, C., Johnson, T., Gateva, V., Tobin, M. D., Bochud, M., Coin, L., ... Munroe, P. B. (2009). Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nature Genetics*, 41(6), 666–676.
81. Levy, D., Ehret, G. B., Rice, K., Verwoert, G. C., Launer, L. J., Dehghan, A., ... van Duijn, C. M. (2009). Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nature Genetics*, 41(6), 677–687.
82. Kato, N., Takeuchi, F., Tabara, Y., Kelly, T. N., Go, M. J., Sim, X., ... He, J. (2011). Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nature Genetics*, 43(6), 531–538.
83. Wain, L. V, Verwoert, G. C., O'Reilly, P. F., Shi, G., Johnson, T., Johnson, A. D., ... van Duijn, C. M. (2011). Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure. *Nature Genetics*, 43(10), 1005–11.
84. Simino, J., Shi, G., Bis, J. C., Chasman, D. I., Ehret, G. B., Gu, X., ... Rao, D. C. (2014). Gene-age interactions in blood pressure regulation: a large-scale investigation with the CHARGE, Global BPgen, and ICBP Consortia. *American Journal of Human Genetics*, 95(1), 24–38.
85. Tragante, V., Barnes, M. R., Ganesh, S. K., Lanktree, M. B., Guo, W., Franceschini, N., ... Keating, B. J. (2014). Gene-centric meta-analysis in 87,736 individuals of European ancestry identifies multiple blood-pressure-related loci. *American Journal of Human Genetics*, 94(3), 349–60.
86. Miles, C. & Wayne, M. (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1(1):208

87. Franceschini, N., & Le, T. H. (2014). Genetics of hypertension: discoveries from the bench to human populations. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 306(1), F1–F11.
88. Tabor, H. K., Risch, N. J., & Myers, R. M. (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews. Genetics*, 3(5), 391–7.
89. Cheyssac, C., Dina, C., Leprêtre, F., Vasseur-Delannoy, V., Dechaume, A., Lobbens, S., ... Froguel, P. (2006). EIF4A2 is a positional candidate gene at the 3q27 locus linked to type 2 diabetes in French families. *Diabetes*, 55(4), 1171–6.
90. Wilkening, S., Chen, B., Bermejo, J. L., & Canzian, F. (2009). Is there still a need for candidate gene approaches in the era of genome-wide association studies? *Genomics*, 93(5), 415–9.
91. Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., Zumbo, P., ... Lifton, R. P. (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19096–101.
92. Fisher R.A. (1918), The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance, *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 52: 399-433, <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/15097>
93. Read, A., & Donnai, D. (2008). *Génétique médicale: De la biologie à la pratique clinique*. De Boeck Supérieur.
94. Nature education, 2015, <http://www.nature.com/subjects/quantitative-trait>
95. Koike G, Jacobs H.J, *Principles of Molecular Medicine*. (1998). Springer Science & Business Media. Section II, chapter 6 : Hypertension pp 145-155
96. Grisel, J. E. (2000). Quantitative trait locus analysis. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 24(3), 169–174.
97. Genetics home reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=locus>



98. Deng, A. Y. (2007). Genetic basis of polygenic hypertension. *Human Molecular Genetics*, 16(R2), 669–680. (a)
99. Pinto, Y. (1998). Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research*, 39(1), 77–88.
100. Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., ... Collins, F. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428(6982), 493–521.
101. Doggrell, S. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, 39(1), 89–105.
102. Rapp, J. P. (2000). Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiological Reviews*, 80(1), 135–172.
103. Garrett, M. R., Dene, H., Walder, R., Zhang, Q. Y., Cicila, G. T., Assadnia, S., ... Rapp, J. P. (1998). Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Research*, 8(7), 711–723.
104. Rapp JP, Dene H (1985). Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* 7: 340-349
105. Zicha, J., Dobešová, Z., Vokurková, M., Rauchová, H., Hojná, S., Kadlecová, M., ... Kuneš, J. (2012). Age-dependent salt hypertension in dahl rats: Fifty years of research. *Physiological Research*, 61 (Suppl. 1): S35-S87
106. Charron, S., Lambert, R., Eliopoulos, V., Duong, C., Ménard, A., Roy, J., & Deng, A. Y. (2005). A loss of genome buffering capacity of Dahl salt-sensitive model to modulate blood pressure as a cause of hypertension. *Human Molecular Genetics*, 14(24), 3877–3884.
107. Cicila GT, Rapp JP, Wang JM, St Lezin E, Ng SC, Kurtz TW.(1993) Linkage of 11 beta-hydroxylase mutations with altered steroid biosynthesis and blood pressure in the Dahl rat. *Nature Genetics* 3:346–353.

108. **Crespo, K.**, Chauvet, C., Ménard, A., Roy, J., Shi, Y., Gelinás, D., ... Deng, A. Y. (2013 (b)). Combining distinctive and novel loci doubles BP reduction, reverses diastolic dysfunction and mitigates LV hypertrophy. *Journal of Hypertension*, 31(5), 927–35.
109. Chauvet, C., **Crespo, K.**, Shi, Y., Gelinás, D., Duval, F., L'Heureux, N., ... Deng, A. Y. (2013 (c)). Unique Quantitative Trait Loci in Synergy Permanently Improve Diastolic Dysfunction. *Canadian Journal of Cardiology*, 29(10), 1302–1309.
110. **Crespo, K.**, Chauvet, C., Blain, M., Ménard, A., Roy, J., & Deng, A. Y. (2011). Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes. *Journal of Hypertension*, 29(3), 460–465.
111. **Crespo, K.**, Ménard, A., & Deng, A. Y. (2015). Hypertension Suppression, Not a Cumulative Thrust of Quantitative Trait Loci, Predisposes Blood Pressure Homeostasis to Normotension. *Circulation. Cardiovascular Genetics*.
112. Deng, A. Y., Ménard, A., Xiao, C., & Roy, J. (2008). Sexual dimorphism on hypertension of quantitative trait loci entrapped in Dahl congenic rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 30(7), 511–519.
113. Deng, A. Y. (1998). In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats. *Journal of Hypertension*, 16(12 Pt 1), 1707–1717.
114. Duong, C., Charron, S., Xiao, C., Ménard, A., Roy, J., & Deng, A. Y. (2007). Individual QTLs controlling quantitative variation in blood pressure inherited in a Mendelian mode. *Heredity*, 98(3), 165–171.
115. Ji, W., Foo, J. N., O'Roak, B. J., Zhao, H., Larson, M. G., Simon, D. B., ... Lifton, R. P. (2008). Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nature Genetics*, 40(5), 592–9.
116. Ariyarajah, A., Palijan, A., Dutil, J., Prithiviraj, K. & Deng, A. Y. (2004). Dissecting quantitative trait loci into opposite blood pressure effects on Dahl rat chromosome 8 by congenic strains. *Journal of Hypertension*, 22(8), 1495–1502.

117. Eliopoulos, V., Dutil, J., Deng, Y., Grondin, M., & Deng, A. Y. (2005). Severe hypertension caused by alleles from normotensive Lewis for a quantitative trait locus on chromosome 2. *Physiological Genomics*, 22(1), 70–75.
118. Palijan, A., Lambert, R., Dutil, J., Sivo, Z., & Deng, A. Y. (2003). Comprehensive congenic coverage revealing multiple blood pressure quantitative trait loci on Dahl rat chromosome 10. *Hypertension*, 42(4 I), 515–522.
119. Palijan, A., Dutil, J., & Deng, A. Y. (2003). Quantitative trait loci with opposing blood pressure effects demonstrating epistasis on Dahl rat chromosome 3. *Physiological Genomics*, 15(1), 1–8.
120. Dutil, J., Eliopoulos, V., Tremblay, J., Hamet, P., Charron, S., & Deng, A. Y. (2005). Multiple quantitative trait loci for blood pressure interacting epistatically and additively on Dahl rat chromosome 2. *Hypertension*, 45(4), 557–564.
121. Bateson, W. (1909) Mendel's Principles of Heredity. *Cambridge University Press*, Cambridge.
122. Avery, L., & Wasserman, S. (1992). Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies. *Trends in Genetics : TIG*, 8(9), 312–6.
123. Hodgkin, J. (1990). Sex determination compared in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Nature*, 344(6268), 721–8.
124. McLaren A. (1988). Sex determination in mammals. *Trends in Genetics*, 4(6), 153–157.
125. Hereford, L. M., & Hartwell, L. H. (1974). Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 84(3), 445–61.
126. Schüpbach, T. (1987). Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 49(5), 699–707.
127. Ferguson, E. L., Sternberg, P. W., & Horvitz, H. R. (1987) A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 326(6110), 259–67.

128. Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817–29.
129. Lynch, A. I., Tang, W., Shi, G., Devereux, R. B., Eckfeldt, J. H., & Arnett, D. K. (2012). Epistatic effects of ACE I/D and AGT gene variants on left ventricular mass in hypertensive patients: the HyperGEN study. *Journal of Human Hypertension*, 26(2), 133–40.
130. Nabika, T., Kobayashi, Y., & Yamori, Y. (2000). Congenic Rats For Hypertension: How Useful Are They For The Hunting Of Hypertension Genes? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27(4), 251–256.
131. Rapp, J. P., Garrett, M. R., & Deng, A. Y. (1998). Construction of a double congenic strain to prove an epistatic interaction on blood pressure between rat chromosomes 2 and 10. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1591–5.
132. Parasuraman, S., & Raveendran, R. (2012). Measurement of invasive blood pressure in rats. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 3(2), 172–7.
133. Van Vliet, B. N., Chafe, L. L., Antic, V., Schnyder-Candrian, S., & Montani, J.-P. (2000). Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(2), 361–373.
134. Deng, A. Y. (2015). Genetic mechanisms of polygenic hypertension: fundamental insights from experimental models. *Journal of Hypertension*, 33(4), 669–80.
135. Rapp, J. P., & Deng, A. Y. (1995). Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? Identifying the genes for genetic hypertension. *Hypertension*, 25(6), 1121–1128.
136. Eichler, E. E., Flint, J., Gibson, G., Kong, A., Leal, S. M., Moore, J. H., & Nadeau, J. H. (2010). Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nature Reviews. Genetics*, 11(6), 446–450.
137. Nemos, C., Bursztejn, A.-C., & Jonveaux, P. (2008). [Management of the CNVs in constitutional human genetics using array CGH]. *Pathologie-Biologie*, 56(6), 354–61.

- 138.Kong, A., Steinthorsdottir, V., Masson, G., Thorleifsson, G., Sulem, P., Besenbacher, S., ... Stefansson, K. (2009). Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature*, 462(7275), 868–874.
- 139.Cordell, H. J. (2002). Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2463–2468.
- 140.Phillips, P. C. (2008). Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews. Genetics*, 9(11), 855–67.
- 141.Wei, W.-H., Hemani, G., & Haley, C. S. (2014). Detecting epistasis in human complex traits. *Nature Reviews. Genetics*, 15(11), 722–33.
- 142.Deng, A. Y. (2007) (a). Positional cloning of quantitative trait loci for blood pressure: How close are we? A critical perspective. *Hypertension*, 49(4), 740–747.
- 143.Flint, J., Valdar, W., Shifman, S., & Mott, R. (2005). Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nature Reviews. Genetics*, 6(4), 271–86.
- 144.Frantz, S., Clemitson, J.R., Bihoreau, M.T., Gauguier, D. and Samani, N.J. (2001) Genetic dissection of region around the Sa gene on rat chromosome 1: evidence for multiple loci affecting blood pressure. *Hypertension*, 38, 216 – 221
- 145.Saad, Y., Garrett, M.R., Manickavasagam, E., Yerga-Woolwine, S., Farms, P., Radecki, T. and Joe, B. (2007) Fine-mapping and comprehensive transcript analysis reveals nonsynonymous variants within a novel 1.17 Mb blood pressure QTL region on rat chromosome 10. *Genomics*, 89, 343 – 353.
- 146.Lee, S.J., Liu, J., Westcott, A.M., Vieth, J.A., DeRaedt, S.J., Yang, S., Joe, B. and Cicila, G.T. (2006) Substitution mapping in dahl rats identifies two distinct blood pressure quantitative trait loci within 1.12- and 1.25-mb intervals on chromosome 3. *Genetics*, 174, 2203–2213.
- 147.Roman, R. J. (2002). P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Control of Cardiovascular Function. *Physiol Rev*, 82(1), 131–185.

148. Jiang, J., Stec, D.E., Drummond, H., Simon, J.S., Koike, G., Jacob, H.J. and Roman, R.J. (1997) Transfer of a salt-resistant renin allele raises blood pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, 29, 619–627.
149. Garrett, M.R. and Rapp, J.P. (2002) Two closely linked interactive blood pressure QTL on rat chromosome 5 defined using congenic Dahl rats. *Physiol. Genomics*, 8, 81–86.
150. Deng, A. Y. (1998). In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats. *Journal of Hypertension*, 16(12 Pt 1), 1707–1717.
151. Ohno, Y., Tanase, H., Nabika, T., Otsuka, K., Sasaki, T., Suzawa, T., ... Saruta, T. (2000). Selective genotyping with epistasis can be utilized for a major quantitative trait locus mapping in hypertension in rats. *Genetics*, 155(2), 785–92.
152. Monti, J., Ralph Plehm<sup>1</sup>, Herbert Schultz, Detlev Ganten, Reinhold Kreutz and Norbert Hübner (2003). Interaction between blood pressure quantitative trait loci in rats in which trait variation at chromosome 1 is conditional upon a specific allele at chromosome 10. *Human Molecular Genetics*, 12(4), 435–439.
153. Pillai, R., Waghulde, H., Nie, Y., Gopalakrishnan, K., Kumarasamy, S., Farms, P., ... Joe, B. (2013). Isolation and high-throughput sequencing of two closely linked epistatic hypertension susceptibility loci with a panel of bicongenic strains. *Physiological Genomics*, 45(16), 729–36.
154. Koh-Tan, H. H. C., McBride, M. W., McClure, J. D., Beattie, E., Young, B., Dominiczak, A. F., & Graham, D. (2013). Interaction between chromosome 2 and 3 regulates pulse pressure in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 62(1), 33–40.
155. Van Dijk, S. J., Specht, P. A. C., Lazar, J., Jacob, H. J., & Provoost, A. P. (2006). Synergistic QTL interactions between Rf-1 and Rf-3 increase renal damage susceptibility in double congenic rats. *Kidney International*, 69(8), 1369–76.
156. Van Dijk, S. J., Specht, P. A. C., Lutz, M. M., Lazar, J., Jacob, H. J., & Provoost, A. P. (2005). Interaction between Rf-1 and Rf-4 quantitative trait loci increases susceptibility to renal damage in double congenic rats. *Kidney International*, 68(6), 2462–72.

157. Ndiaye, N. C., Said, E. S., Stathopoulou, M. G., Siest, G., Tsai, M. Y., & Visvikis-Siest, S. (2013). Epistatic study reveals two genetic interactions in blood pressure regulation. *BMC Medical Genetics*, 14(1), 2.
158. Kumar, R., Nejatizadeh, A., Gupta, M., Markan, A., Tyagi, S., Jain, S. K., & Pasha, M. A. Q. (2012). The epistasis between vascular homeostasis genes is apparent in essential hypertension. *Atherosclerosis*, 220(2), 418–24.
159. Baker, B. S., & Ridge, K. A. (1980). Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 94(2), 383–423.
160. Iwai, N., Tsujita, Y. and Kinoshita, M. (1998) Isolation of a chromosome 1 region that contributes to high blood pressure and salt sensitivity. *Hypertension*, 32, 636 – 638.
161. Iwai, N., Kurtz, T. W., & Inagami, T. (1992). Further evidence of the sa gene as a candidate gene contributing to the hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188(1), 64–69.
162. Hubner, N., Lee, Y.-A., Lindpaintner, K., Ganten, D., & Kreutz, R. (1999). Congenic Substitution Mapping Excludes Sa as a Candidate Gene Locus for a Blood Pressure Quantitative Trait Locus on Rat Chromosome 1. *Hypertension*, 34(4), 643–648.
163. Schork, N. J., Krieger, J. E., Trolliet, M. R., Franchini, K. G., Koike, G., Krieger, E. M., ... Jacob, H. J. (1995). A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome Research*, 5(2), 164–72.
164. Moujahidine, M., Dutil, J., Hamet, P., & Deng, A. Y. (2002). Congenic mapping of a blood pressure QTL on chromosome 16 of Dahl rats. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 13(3), 153–6.
165. Harten, S. K., Bruxner, T. J., Bharti, V., Blewitt, M., Nguyen, T.-M.-T., Whitelaw, E., & Epp, T. (2014). The first mouse mutants of D14Abb1e (Fam208a) show that it is critical for early development. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 25(7-8), 293–303.

- 166.Li, Q., Wen, H., & Ao, S. (2000). Identification and cloning of the cDNA of a Rb-associated protein RAP140a. *Science in China. Series C, Life Sciences / Chinese Academy of Sciences*, 43(6), 637–647.
- 167.Benedict, W. F., Xu, H. J., Hu, S. X., & Takahashi, R. (1990). Role of the retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 85(4), 988–93.
- 168.Shan, B., Zhu, X., Chen, P. L., Durfee, T., Yang, Y., Sharp, D., & Lee, W. H. (1992). Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5620–31.
- 169.Sengupta, S., & William Henry, R. (2015). Regulation of the retinoblastoma-E2F pathway by the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- 170.Du, W., & Pogoriler, J. (2006). Retinoblastoma family genes. *Oncogene*, 25(38), 5190–200.
- 171.Hillmer, A. M., Hanneken, S., Ritzmann, S., Becker, T., Freudenberg, J., Brockschmidt, F. F., ... Nothen, M. M. (2005). Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia. *American Journal of Human Genetics*, 77(1), 140–8.
- 172.Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G. P. V., & Barrack, E. R. (2005). Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *The Prostate*, 62(2), 133–9.
- 173.Chairoungdua, A., Kanai, Y., Matsuo, H., Inatomi, J., Kim, D. K., & Endou, H. (2001). Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49390–9.
- 174.Blondeau, J.-P. (2002). Homologues of amino acid permeases: cloning and tissue expression of XAT1 and XAT2. *Gene*, 286(2), 241–248.



175. Verrey, F., Closs, E. I., Wagner, C. A., Palacin, M., Endou, H., & Kanai, Y. (2004). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 447(5), 532–42.
176. Komers, R., Xu, B., Fu, Y., McClelland, A., Kantharidis, P., Mittal, A., ... Cohen, D. M. (2014). Transcriptome-based analysis of kidney gene expression changes associated with diabetes in OVE26 mice, in the presence and absence of losartan treatment. *PloS One*, 9(5), e96987.
177. Pinto, V., Pinho, M. J., & Soares-da-Silva, P. (2013). Renal amino acid transport systems and essential hypertension. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(8), 2927–38.
178. Zheng, S., Noonan, W. T., Metreveli, N. S., Coventry, S., Kralik, P. M., Carlson, E. C., & Epstein, P. N. (2004). Development of Late-Stage Diabetic Nephropathy in OVE26 Diabetic Mice. *Diabetes*, 53(12), 3248–3257.
179. Rapp JP. (2013) Theoretical model for gene-gene, gene-environment, and gene- sex interactions based on congenic-strain analysis of blood pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Physiol Genomics*, 45: 737–750.
180. Ferguson, E. L., Sternberg, P. W., & Horvitz, H. R. (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 326(6110), 259–67.
181. Neigeborn, L., & Carlson, M. (1987). Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast: genetic interactions with *snf* mutations. *Genetics*, 115(2), 247–53.
182. Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., & Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1193–8.
183. National Institute of Health (NIH), National Human Genome Research Institute, 2015, <https://www.genome.gov/20019523>
184. Bröer, S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological Reviews*, 88(1), 249–86.

185. Fotiadis, D., Kanai, Y., & Palacín, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 139–58.
186. Deng, Y., & Rapp, J. P. (1992). Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nature Genetics*, 1(4), 267–72.
187. Deng, A. Y. (2007) (c). Genetics of Polygenic Hypertension from Animal Models to Humans.. *Current Hypertension Reviews*, 3, 284-297.

# Curriculum Vitae

## KIMBERLEY CRESPO

### EDUCATION:

**2011- present** : Ph.D candidate in Molecular Genetics laboratory led by Alan Deng, Ph.D  
Department of Medicine - Molecular biology - University of Montreal

Thesis: An epistatic hierarchy determining homeostatic actions of multiple blood pressure quantitative trait loci discovered by modularization and study of candidate genes for arterial hypertension.

This Ph.D project enabled us to localize and identify potential candidate genes in *Quantitative Trait Loci (QTLs)* implied in regulation of blood pressure in rats. The analysis of the interactions between the QTLs (epistasis) allowed us to elucidate a potential genetic architectural organization responsible for hypertension in salt-sensitive hypertensive rats. New blood pressure regulation pathways should emerge from these findings, leading in identifying new potential targets for hypertension.

**2009-2011** : Master's in Molecular Genetics laboratory led by Alan Deng, Ph.D (with direct passage to Ph.D) - Department of Medicine - Molecular Biology - University of Montreal

**2008-2009**: Six months training in the Institute of Clinical Research of Montreal (IRCM) in the experimental cardiology laboratory led by Christian Deschepper, Ph.D - University of Montreal

Subject: The effect of chromosome Y polymorphism on cardiac genes response to post pubertal testosterone in the study of cardiac hypertrophy.

#### Practical abilities (2008-2015):

*Genetic mapping on congenic strains of rats (designing of microsatellites; genotyping, rat genome scan); sequencing analysis (NCBI, UCSC, RGD databases, etc...); DNA, RNA, protein extraction; RNA clean up for microarrays,*

*PCR, rt-PCR, QRT-PCR ; electrophoresis, use of restriction enzyme; Western Blot ; MNT Blot ; Genetic cloning, cell culture on primary culture and cell lines, transfection, Knock Down by siRNA, cell microscopy, luciferase enzymatic assays, liver microsomes realization, ELISA assays, extraction of adrenal catecholamines, etc...*

**2007-2008:** Third year of Bachelor's in Biomedical Sciences - University of Montréal with training in clinical Research - Infertility - Saint-Luc Hospital - Gilles Bleau's laboratory

Subject: Determination of male fertility potency and evaluation of success of pregnancy by homologous insemination in couples experiencing infertility.

Practical abilities (2007-2008):

*Sperm analysis, DNA fragmentation studies with radio-isotopes, new coloration method of the sperm etc...*

**2006-2007:** Second year of Bachelor's - Genetics and Developmental Biology - University Claude Bernard Lyon 1 (France)

**2004-2006:** First year of medical school (PCEM1) – Paul Sabatier's University – Toulouse 3 (France) - Faculty of Medicine

**2001-2004:** Scientific French “Baccalaureate”- specialty Biology - Lycée Français de Valence (Spain)

Spanish “Selectividad” - Lycée Français de Valence (Spain)

#### AWARDS AND SCHOLARSHIPS:

**2013-2015:** Two year doctoral scholarship - FRQS (*Fond de Recherche du Québec en Santé*, Health Research Québec Fund)

**2012-2013:** Doctoral scholarship - University of Montreal - Molecular Biology program

**2012:** Community agency scholarship - Ometz (<http://www.ometz.ca>)

**2011-2012:** Doctoral scholarship - University of Montreal - Molecular Biology program

**2011:** Master's category award for the best poster presentation - 19<sup>th</sup> SQHA annual reunion (*Société Québécoise d'Hypertension Artérielle*, Quebec Society of Arterial Hypertension)

**2010-2011:** Master's scholarship - University of Montreal - Molecular biology program

PUBLICATIONS :

Published manuscripts

**Crespo, K.**, Chauvet, C., Blain, M., Ménard, A., Roy, J., & Deng, A. Y. (2011). Normotension in Lewis and Dahl salt-resistant rats is governed by different genes. *Journal of Hypertension*, 29(3), 460–465.

Chauvet, C., **Crespo, K.**, Ménard, A., Wu, Y., Xiao, C., Blain, M., ... Deng, A. Y. (2011).  $\alpha$ -Kinase 2 is a novel candidate gene for inherited hypertension in Dahl rats. *Journal of Hypertension*, 29(7), 1320–1326.

**Crespo, K.**, Chauvet, C., Ménard, A., Roy, J., Shi, Y., Gelinas, D., ... Deng, A. Y. (2013). Combining distinctive and novel loci doubles BP reduction, reverses diastolic dysfunction and mitigates LV hypertrophy. *Journal of Hypertension*, 31(5), 927–35.

Chauvet, C., **Crespo, K.**, Shi, Y., Gelinas, D., Duval, F., L'Heureux, N., ... Deng, A. Y. (2013). Unique Quantitative Trait Loci in Synergy Permanently Improve Diastolic Dysfunction. *Canadian Journal of Cardiology*, 29(10), 1302–1309.

Chauvet, C., **Crespo, K.**, Ménard, A., Roy, J., & Deng, A. Y. (2013). Modularization and epistatic hierarchy determine homeostatic actions of multiple blood pressure quantitative trait loci. *Human Molecular Genetics*, 22(22), 4451–4459.

**Crespo, K.**, Ménard, A., & Deng, A. Y. (2015). Hypertension Suppression, Not a Cumulative Thrust of Quantitative Trait Loci, Predisposes Blood Pressure Homeostasis to Normotension. *Circulation, Cardiovascular Genetics* (2015), Aug;8(4):610-7

Accepted manuscripts

**Crespo K**, Ménard A, Deng AY. (2016 Feb) Retinoblastoma-associated protein 140 as a candidate for a novel etiological gene to hypertension. *Clinical and Experimental hypertension*.

## Posters

- 12<sup>th</sup> Annual Student Congress – Research Center of the Montreal University Hospital Center (CRCHUM), December 2009, *Identification of genes implied in arterial hypertension in rats.*
- 18<sup>th</sup> Annual Scientific Reunion of the Quebec Society of Arterial Hypertension (Société Québécoise d’Hypertension Artérielle, SQHA), Québec, January 2010, *Identification of genes implied in arterial hypertension in rats.*
- XVI Molecular Biology programs scientific day, May 2010, Montreal Clinical Research Institute (IRCM), *Identification of genes implied in arterial hypertension in rats.*
- 6<sup>th</sup> International Congress of Pathophysiology and the 14<sup>th</sup> International SHR Symposium, September 2010, *Normotension in Lewis and Dahl-Salt-Resistant rats is governed by different genes.*
- 13<sup>th</sup> Annual Student Congress – Research Center of the Montreal University Hospital Center (CRCHUM), December 2010, *Normotension in Lewis and Dahl-Salt-Resistant rats is governed by different genes.*
- 19<sup>th</sup> Annual Scientific Reunion of the Quebec Society of Arterial Hypertension (Société Québécoise d’Hypertension Artérielle, SQHA), Québec, January 2011, *Normotension in Lewis and Dahl-Salt-Resistant rats is governed by different genes . **SQHA’s Award of the Master’s category***
- XVII Molecular Biology programs scientific day, April 2011, CRCHUM, Notre-Dame Hospital, *A polymorphism in a glycine repetition between Dahl-Salt-Sensitive and Lewis would explain the existence of a blood pressure QTL on chromosome 16.*
- Annual scientific meeting, Canadian Hypertension Congress, Global atherosclerosis risk reduction : hypertension and beyond, Alliston, Ontario, October 2011, *A candidate gene for hypertension on chromosome 2 in rat.*
- 1<sup>th</sup> Annual Symposium from the cardiometabolic axis, Montréal, October 2011, *A candidate gene for hypertension on chromosome 2 in rat.*
- 14<sup>th</sup> Annual Student Congress – Research Center of the Montreal University Hospital Center (CRCHUM), December 2011, *A candidate gene for hypertension on chromosome 2 in rat.*
- 20<sup>th</sup> Annual Scientific Reunion of the Quebec Society of Arterial Hypertension (Société Québécoise d’Hypertension Artérielle, SQHA), Québec, January 2012, *A candidate gene for hypertension on chromosome 2 in rat.*

- Annual scientific meeting, Canadian Hypertension Congress, Global atherosclerosis risk reduction : hypertension and beyond, Toronto, Ontario, October 2012, *Modularization effectuates homeostatic design organizing blood pressure quantitative trait loci.*
- 15<sup>th</sup> Annual Student Congress – Research Center of the Montreal University Hospital Center (CRCHUM), December 2012, *Modularization effectuates homeostatic design organizing blood pressure quantitative trait loci.*
- 21<sup>th</sup> Annual Scientific Reunion of the Quebec Society of Arterial Hypertension (Société Québécoise d’Hypertension Artérielle, SQHA), January 2013. *Modularization effectuates homeostatic design organizing blood pressure quantitative trait loci.*
- XXI Molecular Biology programs scientific day, May 2015, CRCHUM, *Hypertension suppression, not a cumulative thrust of quantitative trait loci predisposes multiple blood pressure homeostasis to normotension.*