

Université de Montréal

**Étude d'un locus pour trait quantitatif de l'hypertension sur le chromosome 3 du
rat Dahl *Salt-Sensitive***

par

Ana Palijan

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

En biologie moléculaire

Novembre 2004

© Ana Palijan, 2004

QH

506

U54

2005

V. 011

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude d'un locus pour trait quantitatif de l'hypertension sur le chromosome 3 du
rat Dahl *Salt-Sensitive***

présenté par :

Ana Palijan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur..... Mona Nemer
Directeur de recherche..... Alan Y. Deng
Membre du jury..... Edward Bradley



Mémoire accepté le : _____

Résumé français

L'hypertension essentielle est une conséquence complexe des enjeux de plusieurs altérations génétiques et est affectée par des facteurs environnementaux. Il est estimé que le facteur génétique contribue entre 30 et 50% sur la variance de la pression artérielle (PA) observée. L'identification des gènes qui affectent la PA peut apporter une meilleure compréhension sur la pathophysiologie de la maladie. Ceci permettra une thérapie préventive et un meilleur traitement des individus affectés.

L'objectif de ma recherche est d'identifier les gènes qui affectent la PA pour l'hypertension essentielle. La méthodologie utilisée pour répondre à cet objectif est l'application des lignées congéniques (LC). Pour la fabrication de celles-ci, deux lignées de rats aux traits contrastants pour la PA doivent être utilisées : Dahl *Salt-Sensitif* (S), une lignée de rats hypertendue et Lewis (Lew), une lignée de rat normotendue. Les LC ont pour but de cibler une région chromosomique d'un génome : un segment chromosomique du génome S est remplacé par le segment homologue du génome Lew. Une étude précédente de liaisons génétiques a identifié une région du chromosome 3 (Chr3) à être susceptible aux variations de la PA. Cette région est connue sous le nom de QTL (quantitatif trait loci). J'ai confirmé la présence du QTL sur le Chr3 en montrant qu'il y a une baisse significative de la PA dans ma LC, S.L1 ($p < 0.03$), versus la lignée parentale S. La fabrication de sous-lignées congéniques, S.L2 ($p < 0.03$), S.L3 ($p < 0.03$), S.L4 ($p < 0.04$) et S.L5 ($p > 0.9$), a permis la réduction de la région à QTL et l'identification de deux nouveaux QTL : un QTL qui augmente la PA, nommé +BP QTL, et un QTL qui diminue la PA, nommé -BP QTL. Ces deux QTL sont compris dans la région couverte par ma LC S.L1. J'ai pu ainsi montrer l'existence d'une interaction épistatique entre les deux QTL.

L'application des outils bioinformatiques, m'a permis de faire une carte très précise du Chr3. Ceci permet une meilleure identification du génotype des rats ainsi qu'une meilleure caractérisation de mes LC. Mon travail a aussi démontré la puissance des LC dans l'identification des QTL pour les traits complexes. Il reste à diminuer les régions à QTL du Chr3 pour que le clonage positionnel puisse être entamé.

Mots clés : hypertension essentielle, lignées congéniques, chromosome 3, QTL.

Résumé Anglais

Essential hypertension is a complex disease with genetic, environmental and demographic factors contributing to its prevalence. It is estimated that between 30 and 50% of variance of the disease arises from genetic factors. Identification of the genes that affect the blood pressure (BP) is thus essential for a full comprehension of the pathophysiology of the disease. This will in turn facilitate preventive medicine as well as individualized treatment.

The objective of my research was to identify genes that affect the BP in essential hypertension. Congenic strains (CS) of rats with contrasting effects on BP, hypertensive Dahl Salt-Sensitive (S) and normotensive Lewis (Lew) strains, were used as tools to map loci contributing to BP regulation. Chromosomal segments of the S genome were replaced by homologous segments of the Lew genome to identify loci contributing to BP. A previous linkage study indicated that a region of the chromosome 3 (Chr3) was linked to BP variations. This region is named QTL for quantitative trait loci. I confirmed the presence of a QTL on Chr3 by measuring the BP of my congenic strain, S.L1. There was a significant difference in the BP when compared to the parental S strain ($p < 0.03$). The construction of and measurement of BP in four congenic substrains, S.L2 ($p < 0.03$), S.L3 ($p < 0.03$), S.L4 ($p < 0.04$) and S.L5 ($p > 0.9$), reduced the QTL region and, more importantly, resolved two distinct loci; one QTL that raises BP (+BP QTL) and one that lowers BP (-BP QTL). These two QTLs were included in the region covered by the CS S.L1. Breeding studies revealed an epistatic interaction between the two QTLs, where the +BP QTL is epistatic to the -BP QTL. A dense physical map of Chr3 was constructed using bioinformatic tools, which greatly facilitated genotyping and enhanced precision of the map.

This study demonstrated the power of CS in QTL mapping for complex diseases. Further reduction of the QTL regions through future breeding experiments with CS will be necessary for positional cloning of the loci identified here.

Key words: essential hypertension, congenic strains, chromosome 3, QTL.

Table des matières

	Pages
RÉSUMÉ FRANÇAIS ET MOTS CLEFS	iii
RÉSUMÉ ANGLAIS ET MOTS CLEFS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTES DES ABRÉVIATIONS	xi
DÉDICACE	xiii

Introduction

Chapitre 1- L'hypertension : Les facteurs environnementaux et génétiques	1
1.1 L'hypertension et ses généralités	1
1.2 Les facteurs génétiques et environnementaux	5
1.2.1 L'hypertension chez les Africano-Américains	7
1.2.2 L'hypertension chez les populations industrialisées	8
1.2.3 L'hypertension et l'obésité	8
1.2.4 L'hypertension et la consommation d'alcool	9
1.2.5 L'hypertension chez les femmes	9
1.2.6 L'hypertension et les personnes âgées	10
Chapitre 2- Études génétiques	11
2.1 Approche gène candidat	13
2.2 Études de liaisons génétiques	14
2.3 Ressources génomiques	15
2.4 Modèles animaux	17
2.5 Comparaison génomique	22

Méthodes

Chapitre 3- Études de liaisons génétiques.....	25
Chapitre 4- Lignées congéniques.....	29
Chapitre 5- Cartographie de QTL.....	33
5.1 Microsatellites.....	34
5.2 Carte d'hybride de radiation.....	37
5.3 Carte physique.....	38
5.4 Carte d'homologie.....	39

Résultats

Chapitre 6- Études Précédentes.....	41
Chapitre 7- Projet.....	43
Chapitre 8- Publication.....	47
Chapitre 9- Nouveaux Résultats.....	70
9.1 Nouvelle carte physique du chromosome 3.....	70
9.2 Gènes candidats du BP QTL et du +BP QTL.....	72
Chapitre 10- Étude par micro-puces d'ADN.....	74
10.1 Généralités des micro-puces d'ADN.....	74
10.2 Notre étude de micro-puces d'ADN.....	75
10.2.1 Gène candidat.....	75
10.2.2 Génotypage du gène candidat.....	76

Discussion

Chapitre 11- Discussion.....	79
-------------------------------------	-----------

Conclusion

Chapitre 12- Perspectives et conclusion.....	83
---	-----------

Annexe A	84
-----------------------	-----------

Annexe B	95
-----------------------	-----------

Annexe C	111
-----------------------	------------

Annexe D	113
-----------------------	------------

Bibliographie	118
----------------------------	------------

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : Le système rénine-angiotensine.....	4
Figure 2 : Schéma représentant l'interaction des facteurs influençant l'hypertension essentielle	5
Figure 2 : Schéma montrant le ciblage d'une région chromosomique par la méthodologie de lignées congéniques	14
Figure 3 : Exemple d'outils génétiques chez le rat.....	18
Figure 4 : Carte d'homologie entre le rat, la souris et l'homme.....	23
Figure 5 : Schéma basé sur une représentation de l'article de Rapp.(1) Ce schéma montre la coségrégation lors d'une étude de liaisons génétiques	26
Figure 6 : Représentation schématique de la fabrication de lignées congéniques.....	31
Figure 7 : Schéma représentant la méthodologie de lignées congéniques rapides.....	32
Figure 8 : Représentation cartographique des lignées congéniques du chromosome 3.....	44
Figure 9 : Représentation des données de PA publiées dans l'article (chapitre 2).....	45
Figure 10 : Représentation schématique de l'interaction épistatique entre le -BP QTL et le +BP QTL.....	46
Figure 11 : Nouvelle version de la carte génétique du chromosome 3. Cette nouvelle carte est basée sur la nouvelle version de la séquence génomique du rat, apparue sur le site de NCBI en octobre 2003.....	71

Figure 12 : Photo du gel agarose 4% sur lequel le marqueur pour le gène F2 a migré. Le marqueur a été génotypé sur les lignées S.L.4 et S.L.5. Ces deux lignées sont homozygotes pour Lew.....

Liste de Tableaux

	Pages
Tableau 1 : Exemples de formes monogéniques de l'hypertension	7
Tableau 2 : Exemples de lignées de rats disponibles.....	21
Tableau 3 : Exemples de sites d'Internet	36
Tableau 4 : Résultats pour F2 de micro-puces d'ADN	76

Liste des abréviations

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Agtr1l	<i>Angiotensin receptor-like 1</i>
AME	<i>Syndrome of apparent mineralocorticoid excess</i>
ANG I	Angiotensine I
ANG II	Angiotensine II
ARN	Acide ribonucléique
AT ₁	<i>Angiotensine receptor 1</i>
AT ₂	<i>Angiotensine receptor 2</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BN	<i>Brown Norway</i>
cM	centi-Morgan
cR	centi-Rad
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i>
F2	<i>Coagulation Factor II</i>
GRA	<i>Glucocorticoid-remediable aldosternism</i>
11 β-HSD	<i>11 β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>
JG	Juxtaglomérulaire
KAT-1	<i>Kynurenine aminotransferase 1</i>
Kynu	<i>Kynureninase</i>
Lew	Rat Lewis
Mb	Mega paires de bases (6 x 10 ⁶ pb)
mmHg	Millimètres de mercure
MNS	<i>Milan Normotensive</i>
MR	<i>Mineralocorticoid receptor</i>
Na ⁺	Sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	Centre national pour l'information en biotechnologie

PA	Pression artérielle
pb	Paires de bases
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PHAI	<i>Pseudohypoaldosteronism type II</i>
Ptgs1	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
R	Rat Dahl <i>Salt-Resistant</i>
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
S	Rat Dahl <i>Salt-Sensitive</i>
Scn1a	<i>Sodium channel, voltage-gated, type 1, alpha polypeptide</i>
Scn6a	<i>Sodium channel, voltage-gated, type 6, alpha polypeptide</i>
Scn9a	<i>Sodium channel, voltage-gated, type 9, alpha polypeptide</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SHRP	<i>Spontaneously hypertensive rat stroke-prone</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
WKY	Rat Wistar-Kyoto
WNK1	Member 1 of WNK kinase family
WNK24	Member 4 of WNK kinase family
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>

« C'est la vie! »

- Dr. Alan Y. Deng

Introduction

Chapitre 1

L'hypertension : les facteurs environnementaux et génétiques

1.1 L'hypertension et ses généralités

L'hypertension est une maladie complexe et multifactorielle avec des facteurs génétiques, environnementaux et démographiques (1 ;2). L'hypertension peut être séparée en deux groupes : l'hypertension dite mendélienne et l'hypertension essentielle (3). Il est important de bien différencier ces deux types d'hypertension. L'hypertension mendélienne est nommée ainsi en raison de la transmission héréditaire parmi les membres d'une famille atteints par cette maladie. Cette forme d'hypertension est attribuable aux mutations de locus d'un seul gène. En d'autres termes, c'est une forme monogénique de la maladie. L'hypertension essentielle, à l'instar de l'hypertension mendélienne, est une conséquence complexe des enjeux de plusieurs altérations génétiques et est affectée par des facteurs environnementaux. En raison de cet enjeu complexe, la propagation de l'hypertension essentielle ne suit pas une forme mendélienne, mais plutôt une agrégation de cas parmi les membres d'une famille.

La PA doit bien être régulée pour permettre une perfusion constante dans les organes vitaux. Chez les humains, 70ml de sang sont propulsés à chaque cycle cardiaque, amenant ainsi de l'oxygène et des nutriments aux organes. La pression est dépendante de la pression cardiaque et de la résistance vasculaire. Une variation périodique de la pression des vaisseaux est observée en raison des cycles de contraction cardiaque : la pression est plus élevée lors de la contraction des ventricules et est plus basse entre les contractions du cœur (4). Les pressions à ces deux stades sont respectivement nommées systolique et diastolique. La pression systolique doit être maintenue à moins de 140 mmHg et la pression diastolique doit être maintenue à moins de 90 mmHg (5). Lorsque la PA est élevée, cela provoque des dommages aux vaisseaux sanguins et aux organes (4).

Un des systèmes biologiques contrôllant la PA le mieux défini est le système rénine-angiotensine (Figure 1) (1). Le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans le contrôle de l'osmoralité et de la PA. Deux stimuli entraînent l'excrétion de la rénine dans le sang par l'appareil juxtaglomérulaire : une chute de la PA dans l'artériole glomérulaire afférente ou une faible concentration sanguine de Na^+ (6). À la suite d'une activation par la rénine, l'angiotensinogène (une glucoprotéine plasmatique) prend sa forme active, l'ANG II (1 ; 6). Cette dernière est une hormone multifonctionnelle qui augmente la concentration sanguine de Na^+ et élève la PA. L'ANG II provoque une constriction des artérioles qui à leurs tours augmentent la vitesse de filtration du sang. L'ANG II incite les glandes surrénales à libérer une autre hormone : L'aldostérone qui stimule la réabsorption de Na^+ (6). L'aldostérone augmente également la PA et le volume sanguin.

Les enzymes et hormones impliquées dans le système rénine-angiotensine ont fait l'objet de plusieurs études. Il est connu que l'ANG II agit sur deux récepteurs : AT_1 et AT_2 (7). Des études sur ces récepteurs ont montré que les effets de l'ANG II observées dans le système rénine-angiotensine résultent de son effet agoniste sur le récepteur AT_1 (7). Récemment, deux isoformes de ce récepteur ont été identifiées chez les rongeurs : AT_{1A} et AT_{1B} (2;7). L'équipe de Crowley a pu caractériser les deux isoformes de AT_1 en utilisant la méthodologie de ciblage génétique (7). Ceci complique l'étude des effets de l'ANG II car il est très difficile de différencier les deux isoformes dû à leur forte homologie de séquence. Une seule isoforme a été identifiée chez l'homme, rendant ainsi l'extrapolation des résultats observés chez les animaux difficile.

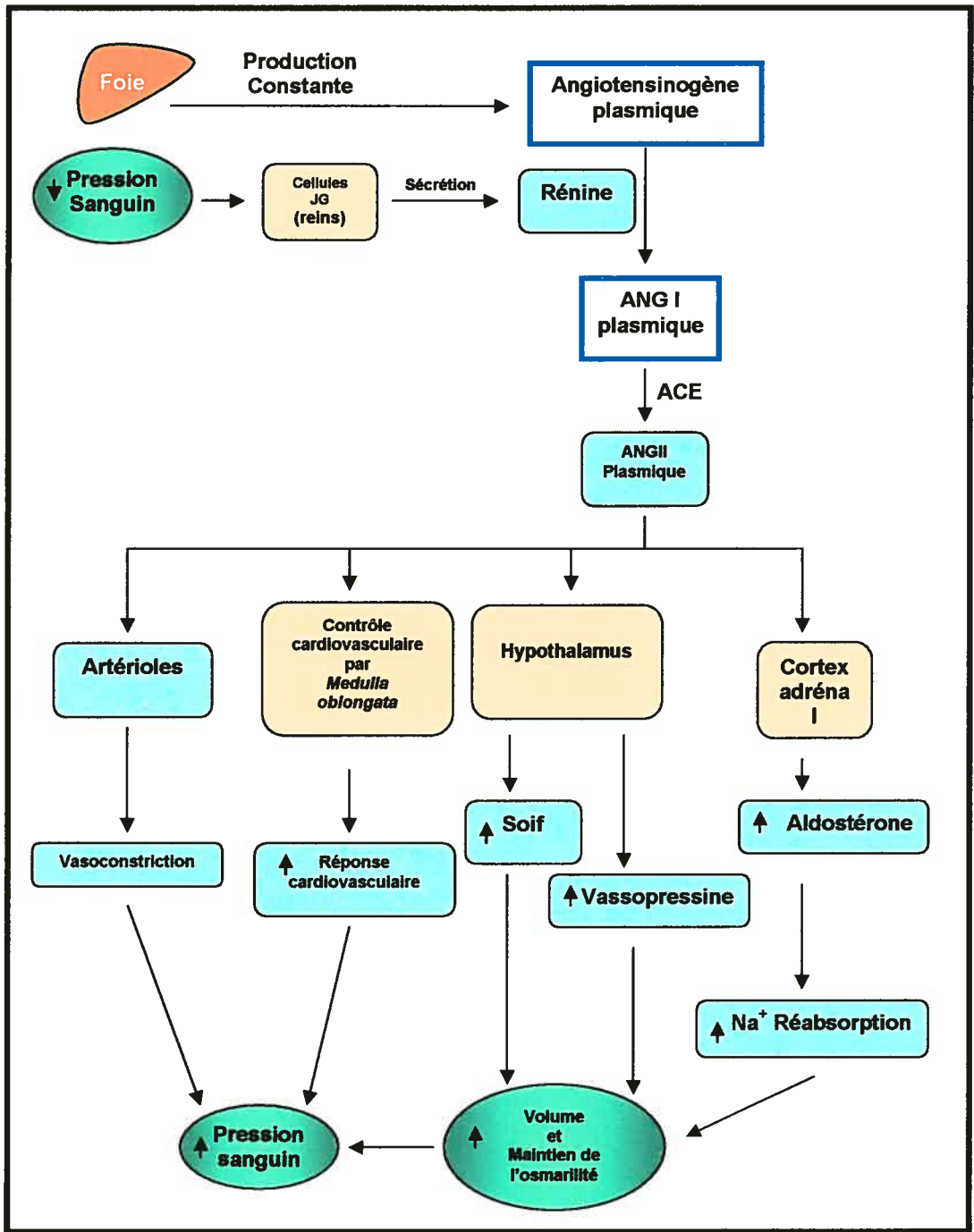


Figure 1- Le système rénine-angiotensine. Cette figure est une représentation schématique du contrôle de la PA et de l'osmolarité par les voies endocriniennes. Ce schéma est basé sur une figure est tirée du livre Human Physiology, figure 20-13 (8).

Malgré la multitude d'étude sur l'hypertension, que ce soit au niveau pathophysiologique ou thérapeutique, les statistiques indiquent qu'il y a près de 50 millions de personnes souffrant d'hypertension aux États-Unis (5). La phase 2 de l'étude NHANES III (*National Health and Nutrition Examination Survey*), réalisée aux États-Unis entre 1991 et 1994, indique que seulement 53,7% des personnes souffrant d'hypertension sont traitées et que seulement 27,4% d'entre elles contrôlent leur PA (5).

1.2 Les facteurs génétiques et environnementaux

Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux affectent l'hypertension : sexe, âge, race, démographie, régime alimentaire, consommation de tabac et d'alcool, etc (Figure 2) (9; 12). L'effet individuel des gènes impliqués peut être additif ou plus complexe et épistatique. Les interactions gène-gène et gène-environnement, ainsi que la relation entre ces deux groupes d'interactions, rendent l'étude de ce trait complexe difficile (13).

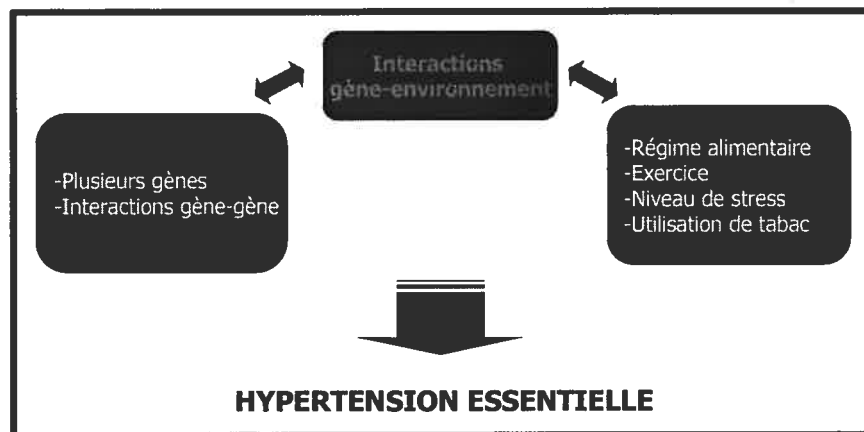


Figure 2- Schéma représentant l'interaction des facteurs influençant l'hypertension essentielle

Il est estimé que le facteur génétique contribue de 30 à 50% sur la variation de la PA observée (2). L'identification des gènes qui affectent la PA peut apporter une meilleure compréhension de la pathophysiologie de cette maladie. Cette information peut alors être utilisée pour identifier et étudier la relation entre les gènes et les facteurs environnementaux (2). L'identification de ces gènes permettra de reconnaître les individus susceptibles à cette maladie avant la manifestation physiologique de celle-ci, ainsi créant une thérapie préventive. Les connaissances génétiques de la maladie permettront aussi un meilleur traitement en prescrivant des médicaments qui répondent aux besoins spécifiques de l'individu affecté.

La génétique joue un rôle important dans la recherche d'identification de cause pour l'hypertension alors que les études physiologiques se sont montrées insuffisantes (4). Les études de populations ont montré l'aspect génétique de la maladie. Il y a une plus grande ressemblance de la PA entre les membres d'une même famille versus les membres de familles différentes. Des études réalisées avec des jumeaux et des enfants adoptés ont montré la prédominance des facteurs génétiques sur les facteurs environnementaux (4).

Les chercheurs se sont posés la question suivante : L'hypertension essentielle est-elle simplement la pointe extrême de la distribution de la PA dans la population (3)? Les études de populations décrites précédemment combinées aux statistiques indiquent que les personnes de moins de 55 ans ayant une PA élevée proviennent 3,8 fois plus souvent de familles ayant une histoire d'hypertension que de familles n'ayant aucune.

Jusqu'à présent, l'identification des gènes impliqués dans la forme monogénique (Mendélienne) de l'hypertension a connu beaucoup plus de succès (2;14). Lors de l'étude d'un trait monogénique, la première étape consiste à localiser précisément le gène dans le génome. Puisqu'il y a une forte relation entre le phénotype et le génotype, ceci se fait sans trop de difficulté et à un intervalle de 1cM (cette mesure est nommée centimorgan qui est défini en tant que possibilité de recombinaison de 1% par 1 000 000 bp qui séparent les deux loci sur le même chromosome) (15). Pour cette raison, trouver une

mutation dans un des gènes candidats de la région est suffisant pour identifier le gène (13). Le Tableau 1 est un résumé des formes monogéniques connus.

Tableau 1- Exemples de formes monogéniques de l'hypertension

Noms	Mutations	Forme d'hérédité
Syndrôme de Liddle	β ENaC γ ENaC	Dominant autosomique
<i>AME</i>	11 β -HSD	Récessif autosomique
<i>GRA</i>	11 β -hydroxylase	Dominant autosomique
Mutation d'activation de <i>MR</i>	S810L	Dominant autosomique
PHAI	WNK1 WNK4	Dominant autosomique

Descriptions des maladies basées sur l'article de Tanira et al. (2004) (2) et Lifton et al. (2001) (6)

1.2.1 L'hypertension chez les Africano-Américains

Des études montrent que l'hypertension commence à un âge plus jeune et est plus sévère chez les Africano-Américains (11;16). En comparant les mêmes groupes d'âges, 33% plus d'hommes Africano-Américains sont atteints d'hypertension. Cette différence est plus marquée chez les femmes où nous observons une différence de 50% (16). Le taux de maladies coronariennes chez les Africano-Américains est parmi les plus élevés au monde.

1.2.2 L'hypertension chez les populations industrialisées

Il y a quatre points importants à noter au sujet de l'évolution de la PA dans la population. Premièrement, la pression systolique augmente avec l'âge, alors que la pression diastolique atteint un plateau autour de l'âge de 60 ans. Chez les adultes des deux sexes, cette dernière a même tendance à diminuer une fois le plateau atteint. Deuxièmement, les jeunes hommes ont une PA légèrement supérieure à celle des femmes du même groupe d'âge. Ceci est observé jusqu'à l'âge de 50 ans où la situation s'inverse (17). Cette inversion est marquée par le début de la ménopause chez les femmes. Troisièmement, l'augmentation de la PA avec l'âge n'est pas observée dans les populations où la consommation de sel est faible. Finalement, les plus hauts niveaux de PA sont observés dans les populations où le taux de maladies cardiovasculaires est élevé.

Plusieurs analyses de population ont montré une corrélation entre la PA et le milieu de vie. Les personnes habitant dans des milieux industrialisés ont une PA qui augmente avec l'âge. En revanche, les personnes vivant dans des milieux non industrialisés ont une PA qui reste constante (17).

Il est intéressant de noter que la perception du stress au travail n'a pas d'effet sur la PA. Ceci a été observé lors d'une étude étalée sur 5 ans (18). Même si le stress psychologique est considéré un des facteurs les plus liés à l'hypertension, cette étude a montré que ceci n'est pas le facteur dominant.

1.2.3 L'hypertension et l'obésité

Des études ont montré que près de la moitié de personnes obèses souffrent d'hypertension (12 ;19). Ces statistiques soulignent la forte relation entre l'obésité et la PA. L'obésité entraîne des changements physiologiques tels qu'une augmentation de la résistance des vaisseaux et de l'hypertrophie cardiaque (19).

Même si nous ne comprenons pas encore tous les détails reliant l'obésité et ses effets sur la PA, des études menées sur des chiens obèses ont montré que l'obésité entraîne une augmentation de l'activité du système neural sympathique et du système rénine-angiotensine. Cela a pour conséquence la compression médullaire rénale et résulte en une augmentation de l'absorption rénale de sodium ce qui des lésions rénales (16).

1.2.4 L'hypertension et la consommation d'alcool

Il y a corrélation entre la consommation d'alcool et une haute PA (12). À ce jour, il n'y a pas de voie de signalisation connue permettant d'expliquer clairement ce lien. Parmi les populations blanches, les hommes ont une pression systolique et diastolique qui augmente avec la quantité d'alcool consommée. Cette tendance est aussi observée chez les femmes, mais l'augmentation de la PA est moins prononcée (20). Dans les populations Africano-Américaines, les hommes avaient une augmentation constante de la pression diastolique pour la même consommation d'alcool.

1.2.5 L'hypertension chez les femmes

Comme indiqué dans une section précédente, les hommes en général ont une pression systolique et diastolique plus élevées que les femmes. Ceci est observé jusqu'à l'âge de 60 ans. Malgré ce fait, les deux sexes montrent le même nombres incidences d'hypertension (21). En raison d'une réponse moins positive aux médicaments anti-hypertensifs chez la femme, la recherche sur l'hypertension est primordiale (22).

À un jeune âge, les deux sexes montrent des PA semblables. C'est lors de l'adolescence et à l'âge adulte que nous observons un écart dans la PA entre les deux sexes (21). La raison de cet écart reste toujours inconnue. L'oestrogène chez la femme semble avoir une influence sur la PA inférieure. Ceci est relié à la quantité d'incidence d'hypertension supérieure chez les femmes post-ménopausées versus les femmes pré-

ménopausées (21). À la ménopause, le taux d'estrogène chute, ce qui résulte en une perte de protection contre l'hypertension. Il est important de préciser qu'une prise de poids chez la femme a un plus grand effet sur la PA que chez l'homme.

1.2.6 L'hypertension et les personnes âgées

Dans les milieux industrialisés, la pression systolique augmente jusqu'à l'âge de 70-80 ans, alors que la pression diastolique augmente jusqu'à l'âge de 50-60 ans (23). Il a été observé que le système rénine-angiotensine devient moins actif avec l'âge. Ceci résulte d'une réduction d'activité du système neural sympathique (12). Malgré cette observation, le lien entre cette baisse d'activité et l'hypertension n'est toujours pas compris.

Chapitre 2

Études génétiques

La stratégie principale dans la recherche des gènes impliqués dans l'hypertension est l'identification des QTL (*quantitatif trait loci*) responsables des variations de la PA observées. Les gènes qui contribuent à un trait complexe quantitatif sont connus sous le nom de QTL (24;25). Le trait quantitatif de l'hypertension est la PA. Les unités de mesure de la PA sont les mmHg. Une des difficultés dans l'identification des QTL pour l'hypertension est l'interaction de ces derniers dans le génome (interactions additives ou épistatiques) (24;26). Puisqu'un QTL est responsable pour seulement une fraction du trait observé, la corrélation phénotype-génotype est faible (4).

Une interaction épistatique se produit lorsque l'effet combinatoire de deux ou plusieurs gènes sur un phénotype ne peut être prédit par une simple addition de leurs effets (13 ;27-28). L'influence des gènes épistatiques sur les traits complexes n'est pas très bien comprise en raison de la complexité des traits étudiés.

Une définition plus précise pour une interaction épistatique a été émise par Bateson : une interaction épistatique se produit lorsqu'un gène interfère sur le phénotype d'un autre gène situé sur une autre allèle, de sorte que le phénotype est déterminé par le premier gène, et non le dernier (28). Les interactions épistatiques jouent un rôle important dans l'évolution. Ceci est très ressenti dans les petites populations, comme dans les lignées de modèles d'animaux utilisés dans la recherche créés artificiellement par une sélection pour un phénotype spécifique (28). Il y a aussi de fortes évidences d'interactions épistatiques entre les allèles d'une lignée avec le fond génomique d'une autre lignée lorsque deux lignées aux phénotypes contrastant sont croisés (28).

Il y a un très petit nombre de cas d'interactions épistatiques dans les études de traits complexes. Ceci est dû aux outils d'analyses utilisés. La grande majorité des outils utilisés pour faire les calculs et la localisation de QTL dans l'étude des traits complexes,

comme le programme MAPMAKER/QTL, calcule l'effet général des QTL sur le phénotype et non l'effet d'interaction de plusieurs QTL (28).

Malgré les difficultés d'identification des interactions épistatiques, il existe quelques exemples. Ohno et al. ont montré la présence d'interactions épistatique entre l'hypertension et le gène *SrcaII* (*sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺-dependant ATPase II*) (13). L'équipe de Rapp a démontré la possibilité d'interaction épistatique entre deux QTL à PA (31). Ils ont localisé un QTL à PA sur le chromosome 2 et sur le chromosome 10. Par des études de liaisons génétiques, ils ont observé une ségrégation faible de la population F₂ entre les QTL du chromosome 2 et du chromosome 10. Pour prouver la présence d'une interaction entre ces deux QTL, ils ont fabriqué un double congénique. Un double congénique est une lignée congénique où deux régions sont ciblées : le fond génomique a le génotype d'une lignée alors que les régions à QTL du chromosome 2 et du chromosome 10 ont le génotype de l'autre lignée. Le QTL du chromosome 2 augmente la PA versus la lignée parentale hypertendue. Le QTL du chromosome 10 a le même effet sur la PA que celui du chromosome 2. Logiquement, on penserait que la combinaison des deux QTL dans la même lignée congénique amplifierait l'effet sur la PA : le QTL du chromosome 2 augmente la PA de 8 mmHg, le QTL du chromosome 10 augmente la PA de 15 mmHg (29). Si l'interaction entre ces deux QTL est additive, on s'attend à observer une augmentation de la PA de 23 mmHg. Cependant, une augmentation de 47 mmHg est observée (29). Ceci démontre que le -BP QTL est épistatique du +BP QTL.

Les avancements dans le domaine de la biologie moléculaire et les techniques génomiques, ainsi que la combinaison de ceux-ci avec la physiologie, ont donné naissance à la génomique fonctionnelle (26 ;30). La génomique fonctionnelle est défini en tant qu'une approche multidisciplinaire dans l'étude des gènes, de leurs produits et de leurs interactions (30). Plusieurs technologies sont mises en place qui facilitent l'exploitation de ces grandes bases de données : analyses par micropuces, études d'association par SNPs et la protéomique (31-35).

Des stratégies sont mises en place pour identifier les gènes de susceptibilité à l'hypertension (2):

1. Approche gène candidat
2. Études de liaison génétiques
3. Criblage génomique
4. Modèles animaux
5. Comparaison génomique

2.1 Approche gène candidat

Une grande majorité des études ont adopté l'approche gènes candidats. Un gène est considéré en tant que candidat soit parce qu'il est localisé dans une région détecté par un balayage systématique quelconque (liaison génétique, association, etc.) ou parce qu'il est relié à la maladie étudié par sa fonction (36). Cette stratégie était majoritairement utilisée dans l'identification des gènes responsables des formes monogéniques de l'hypertension. Lors de l'étude d'un trait monogénique, la première étape consiste à localiser précisément le gène sur le génome. Puisqu'il y a une forte relation entre le phénotype et le génotype, la localisation du gène candidat se fait sans trop de difficulté et à un intervalle d'environ 1cM. Trouver une mutation dans un des gènes candidats est suffisant pour identifier le gène responsable de la maladie (13). Dans le cas de l'hypertension essentielle, une maladie multigénique où plus de 50 gènes/loci sont décrits comme ayant une influence sur le trait, une autre stratégie est nécessaire pour identifier un QTL (2).

Les analyses de liaison génétique et d'association facilitent la localisation des QTL sur le génome (24). La méthode de liaison génétique estime les paramètres génétiques du trait étudié et offre un modèle d'héritage des phénotypes et génotypes du pedigree observé (2). Pour avoir une bonne qualité de liaison génétique, un grand nombre de marqueurs doivent être utilisés. Ceci permet une meilleure localisation du QTL et

détection de liaison entre le trait étudié et la population (37-40). Les études d'association sont plus effectives que les analyses de liaison génétique (2). Elles offrent une puissance de statistique supérieure à celle des analyses de liaison génétique pour la détection de gènes qui engendrent de petits effets sur le trait étudié (35;36;41).

L'approche gène candidat est limitée par nos connaissances de la pathophysiologie de la maladie étudiée : nous sommes limités aux gènes connus pour contribuer à un effet sur le trait complexe. Cette approche ne nous permet pas d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la pathogénèse de la maladie étudiée (26).

2.2 Études de liaison génétiques

Les études de liaisons génétiques sont très courantes dans l'étude de trait complexe. La diversité biologique est maintenue lors de la méiose par un mélange non-arbitraire des chromosomes parentaux et par des recombinaisons (croisement entre deux chromosomes homologues). La probabilité de croisement entre deux loci est dépendante de la distance chromosomique qui les sépare. La liaison génétique calcule la fréquence de recombinaison entre deux loci (15).

Une étude de liaison génétique réalisée par Williams a montré comment l'interaction de plusieurs loci affecte les résultats obtenus pour une population (42). L'équipe de Sharma a fait une étude de liaison génétique pour l'hypertension essentielle sur une population humaine. Leurs résultats montrent qu'aucune région du génome humain prise individuellement cause l'hypertension essentielle au niveau que nous la connaissons. Chaque région prise individuellement a un petit effet sur la PA (43). C'est sûrement l'effet combinatoire de ces régions qui entraîne à une haute PA chez les personnes souffrant d'hypertension essentielle.

Puisque les études de liaisons génétiques pour un trait complexe n'ont toujours pas permis d'identifier les gènes impliqués, Doris a proposé une nouvelle méthode pour résoudre ce problème. Il propose l'utilisation des SNP (polymorphisme de simple nucléotide) (34). Un grand nombre de marqueurs génétiques localisés sur le génome permet l'identification directe des variances de la séquence génétique qui cause un trait complexe. La variance la plus stable et la plus commune du génome est présente sous forme de SNP. Trois études de liaisons génétiques utilisant ces marqueurs sont déjà en cours. Cette méthode a déjà portée ces fruits dans la recherche sur la maladie d'Alzheimer où le gène ApoE e4 est un candidat (34).

2.3 Ressources génomiques

Des ressources génomiques pour une analyse génétique des QTL d'un trait complexe sont primordiales. Plusieurs ressources génomiques ont été mises en place au cours des dernières années dans le but de faciliter ces analyses génétiques. La plus importante étant le séquençage du génome du rat, terminé en 2003 (44).

Le séquençage du génome du rat a été terminé en 2003 avec plus de 90% du génome séquencé. Cette séquence est disponible sur le site de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En avril 2004, un article publié dans la revue scientifique Nature explique les points importants de ce séquençage (44). Ces points vont être revue dans cette section. Le projet du séquençage génomique du rat, connu sous le nom de RGSP pour *Rat Genome Sequencing Projet*, a commencé il y a déjà plusieurs années. Puisque le rat est très utilisé dans les études physiologiques et pharmacologiques, il y avait un réel besoin de connaître sa séquence génomique (44), malgré que ce dernier et la souris sont morphologiquement très semblables et très rapprochés du point de vue de l'évolution.

Contrairement au séquençage génomique de la souris et de l'homme, qui sont des séquençages entiers, le séquençage du rat ne sera jamais finalisé. Ceci signifie que toute erreur présente dans la séquence ne sera pas corrigée à une date ultérieure. Pour cette raison, il était très important de garder un haut standard de la qualité du séquençage dans le but de minimaliser les erreurs.

Un réseau de centres dirigé par BCM-HGSC, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, a produit les résultats. L'analyse des séquences a été réalisée par 20 équipes de six pays différents. La grande majorité de la séquence provient de deux rats femelles, et que la séquence du chromosome Y provient d'un rat mâle. Par contre, cette dernière n'est pas incluse dans la séquence publiée. Toutes les prédictions de gènes et de protéines sont faites avec le programme *Ensembl*.

La séquence génomique peut être visualisée sur NCBI par un programme nommé Map Viewer, trouvé sur le site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=10116, où la séquence génomique d'un chromosome peut être visualisé individuellement. Une partie du séquençage a été accompli en reliant les bouts de BAC (*bacterial artificial chromosome*). En joignant les bouts, des plus grandes structures sont formées : bactigs, superbactigs et ultrabactigs. Ces structures, par la suite, sont alignées aux chromosomes. Ceci va de même pour les YAC (*yeast artificial chromosome*).

La grandeur du génome du rat est de 2.75Gb. Ceci est inférieur au génome humain, 2.9Gb, mais supérieure à celui de la souris, 2.6Gb (44). Il est important de se souvenir que l'assemblage génomique prédit une grandeur du génome toujours inférieure à la grandeur réelle. Ceci est causé en majeure partie par les difficultés de séquençage et d'assemblage des morceaux séquencés.

Il est intéressant de noter que les génomes du rat, de la souris et de l'homme contiennent le même nombre de gènes. Un aspect impourtant pour la recherche est que

les gènes connus associés à des maladies chez l'homme ont des homologues chez la souris.

Jusqu'à présent, il y avait beaucoup d'obstacles dans la recherche génétique utilisant le rat comme modèle. La plupart de ces obstacles seront levés par l'arrivée de la séquence génomique du rat.

2.4 Modèles animaux

L'hétérogénéité génétique observée dans les études génétiques humaines peut être réduite par l'utilisation d'animaux de souche (26). En plus de l'homogénéité génétique, les études génétiques sur les animaux facilitent le contrôle des facteurs environnementaux, la production d'un grand nombre de croisements et l'analyse d'une grande population de progénitures. La courte période de gestation et la facilité de croisement offrent un avantage dans la dissection génétique de phénotypes complexes et des interactions gène-gène (26).

Plusieurs lignées de rats et de souris ont été établies pour étudier les traits complexes : lignées consomiques, lignées congéniques, lignées recombinantes, etc. Ceux-ci ont été croisés entre frères et sœurs pendant des générations (pour obtenir une bonne homogénéité du génome, ce type de croisement est fait sur une période de vingt générations) dans le but de créer des lignées riches en allèles à haute PA (24). Lorsque ces lignées ont été sélectionnées pour leur haute PA, d'autres lignées ont été sélectionnées pour leur basse PA (45). Plusieurs laboratoires utilisent les rats pour l'étude génétique de l'hypertension (46).

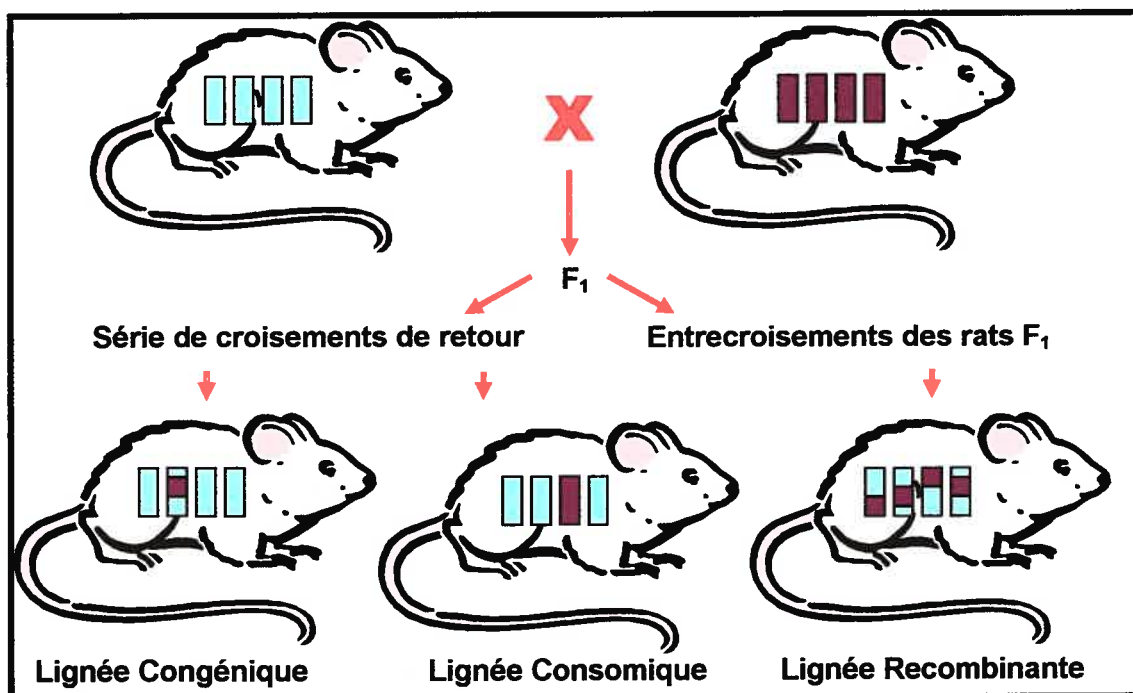


Figure 3- Exemple d'outils génétiques chez le rat. Schéma basé sur une représentation de l'article de McBride et al. (2003) (26)

Les modèles transgéniques permettent l'étude de la fonction d'un gène candidat en altérant le niveau d'expression de ce dernier (7). Le ciblage de l'expression du gène candidat peut être tissu spécifique ou non (ciblage de gène simple) (47). La technique de ciblage de gène simple permet d'abolir la fonction d'un gène ou de dupliquer le gène d'intérêt. Plusieurs chercheurs ont appliqué ces modèles : la duplication du gène d'angiotensinogène a démontré son rôle dans l'augmentation de la PA chez la souris, l'élimination de la rénine a permis d'identifier une système de régulation sous forme de rétro-contrôle (47). Le phénotype léthal est un désavantage de la méthodologie d'élimination génétique. Ce problème peut être contourné en ciblant le gène d'intérêt dans un tissu de l'animal. L'équipe de Baltatu a ciblé le gène de l'angiotensinogène dans le cerveau de rats transgéniques (48). L'objectif de l'expérience était de déterminer la fonction physiologique du système rénine-angiotensine dans le cerveau et son rôle dans la pathophysiologie. Ils ont pu démontrer que le système rénine-angiotensine affecte la

sécrétion de la rénine en présence de stress. Cette stratégie a aussi permis la caractérisation et de la fonction du récepteur AT1 dans le système rénine-angiotensine (7). La souris est un modèle animal très utilisé en recherche. Ceci a permis la mise en place d'un grand nombre d'outils d'analyse pour ce modèle ce qui donne beaucoup de puissance à ce dernier. La première application du modèle transgénique chez la souris pour l'hypertension était l'examen des gènes candidats connus pour leurs implications dans les voies de signalisation du contrôle de la PA (47). Près d'une dizaine de gènes du système rénine-angiotensine ont été analysés par cette méthode (47).

De plus en plus de chercheurs utilisent des modèles animaux, tels que les rats, pour la recherche de l'hypertension. Plusieurs lignées de rats existent, chacune d'elles offrant des caractéristiques spécifiques et utiles (tableau 2). Les lignées recombinantes sont un outils puissant dans la localisation des traits mendéliens (26). Les lignées consomiques et congéniques facilitent le ciblage des régions chromosomiques à QTL. Dans les lignées consomiques il y a substitution d'un chromosome entier alors que dans les lignées congéniques il y a substitution d'un segment chromosomique (24;26). Les lignées consomiques sont très utilisées dans l'étude de l'effet du chromosome Y sur la PA (26;49). Ces lignées, par la suite, peuvent être facilement converties en lignées congéniques. Les lignées congéniques ont l'avantage de cibler directement la région à QTL prédéterminée par les études de liaisons génétiques. Les régions à QTL peuvent être facilement réduite par la fabrication de sous-lignées congéniques.

Les rats utilisés dans les laboratoires sont nommées *Rattus norvegicus* (44). Le rat est la première espèce de mammifères à avoir été utilisée pour la recherche en laboratoire. Les premières études génétiques sur le rat ont été réalisées en 1877 par Crampe. Sa recherche consistait à déterminer l'aspect génétique de la transmission de la couleur de fourrure du rat. En 1909, nous avons vu l'apparition de la première lignée de rat produite par croisements frères-sœurs. Cette même année, la première lignée de croisements frères-sœurs créée chez la souris a été décrite. Malgré un début optimiste pour le rat, la souris est devenu le modèle de choix pour les études génétiques chez les mammifères (44). Par contre, le rat reste le modèle de choix pour les recherches en

physiologie, nutrition, ainsi que d'autres recherches biomédicales, où plus de 234 lignées de rats sont mises utilisées pour ces études (44).

Le rat Dahl *Salt-Sensitive* est un exemple de lignée disponible pour la recherche sur l'hypertension. En 1963, Dahl a commencé des croisements de rats qui étaient sélectionnés par leur sensibilité (rats S) et résistance au sodium (rats R) (46). Rapp a par la suite créé des lignées de croisements frères-sœurs, faisant ainsi de cette lignée de rat un modèle prototype pour l'étude de l'hypertension (46). Les rats S développent une hypertension lors d'une diète réduite en sel. Cependant, cette hypertension est augmentée significativement par une diète à forte teneur en sel (2 à 8% NaCl).

Malgré le fait que, lors de la sélection des rats sensibles au sel, certains ont été sélectionnés spécifiquement pour leur résistance au sodium, la lignée de rat Lewis (Lew) démontre une plus grande résistance (45). Ceci est surprenant puisque les rats Lew n'avaient pas été sélectionnés pour leur résistance au sodium. En plus d'une résistance supérieure au sodium, 45% des microsatellites du génome Lew sont polymorphiques avec ceux du génome S. Dans le cas des rats R, seulement 18% des microsatellites sont polymorphiques avec ceux du génome S (45). Un plus grand taux de polymorphisme des microsatellites augmente la qualité des études de liaison génétique.

Tableau 2- Exemples de lignées de rats disponibles

Nom de la lignée	Description de la lignée	Type de lignée
BN	<i>Brown Norway</i>	PARENTALE
SS	<i>Dahl Salt-Sensitive</i>	PARENTALE
FHH	<i>Fawn-Hooded Hypertensive</i>	PARENTALE
LEW	<i>Lewis</i>	INBRED
CDF	<i>Fischer CDF</i>	INBRED
CD@IGS	<i>CD. IGS</i>	OUTBRED
GH	<i>GH Genetically Hypertensive Rats</i>	INBRED
LE/BluGill	<i>Long Evans Outbred rats</i>	INBRED
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>	INBRED
SPRD	<i>Sprague Dawley</i>	OUTBRED
WKY	<i>WKY/NCrIBR</i>	INBRED
SS-2 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 2	CONSOMIQUE
SS-4 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 4	CONSOMIQUE
SS-6 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 6	CONSOMIQUE
SS-7 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 7	CONSOMIQUE
SS.BN-(D8rat163-D8rat81)/Mcwi	SS fond génomique avec segment BN chr. 8	CONGÉNIQUE
SS-9 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 9	CONSOMIQUE
SS-10 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 10	CONSOMIQUE
SS-11 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 11	CONSOMIQUE
SS.BN-(D12arb13-D12rat79)/Mcwi	SS fond génomique avec segment BN chr. 12	CONGÉNIQUE
SS-13 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 13	CONSOMIQUE
SS.BN-(D13Mgh13-D13Mit4)/Mcwi	SS fond génomique avec segment BN chr. 13	CONGÉNIQUE
SS-14 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 14	CONSOMIQUE
SS-16 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 16	CONSOMIQUE
SS-18 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 18	CONSOMIQUE
SS-20 ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. 20	CONSOMIQUE
SS-Y ^{BN} /Mcwi	SS fond génomique avec BN chr. Y	CONSOMIQUE
FHH-1 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 1	CONSOMIQUE
FHH-8 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 8	CONSOMIQUE
FHH-12 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 12	CONSOMIQUE
FHH-13 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 13	CONSOMIQUE
FHH-16 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 16	CONSOMIQUE
FHH-17 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 17	CONSOMIQUE
FHH-18 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 18	CONSOMIQUE
FHH-19 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 19	CONSOMIQUE
FHH-20 ^{BN} /Mcwi	FHH fond génomique avec BN chr. 20	CONSOMIQUE

Tableau reproduit du site http://pga.mcw.edu/pga-bin/strain_desc.cgi

2.5 Comparaison génomique

Le but des études réalisées sur des modèles mammifères est d'appliquer les nouvelles connaissances obtenues à l'homme. Dans les études génétiques, une bonne méthode pour relier le modèle animal à l'homme est la fabrication d'une carte d'homologie (50 ;51).

Cette approche permet de cibler les régions de QTL potentiels entre les espèces (2). Plus de 70 études de populations chez l'homme ont identifié des régions à QTL sur le génome (2). Lorsque des modèles animaux sont utilisés, une comparaison génomique doit être appliquée pour pouvoir localiser les régions homologues sur le génome animal. Cette méthode permet aussi de confirmer les résultats observés chez les animaux : lorsqu'une région à QTL est localisée sur le génome animal, la pertinence de ce QTL peut être vérifiée s'il y a chevauchement de ce dernier avec une région à QTL déjà identifiée chez l'homme (Figure 4).

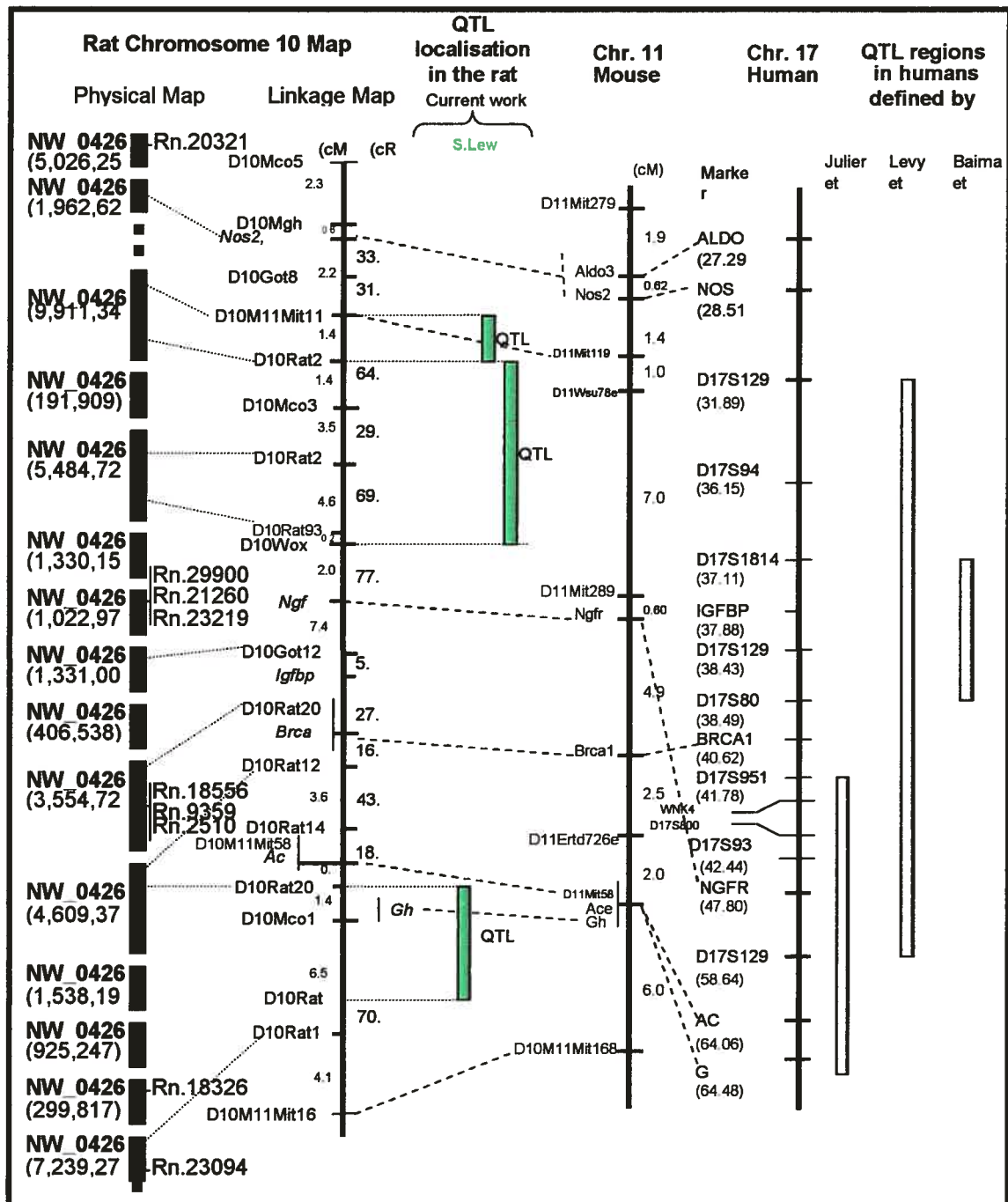


Figure 4- Carte d'homologie entre le rat, la souris et l'humme. Cette figure démontre la conservation des régions homologues chromosomiques et la localisation des QTL entre les espèces. Ce schéma est basé sur une figure publiée dans l'article de Palijan et al. (2003) (52).

Méthodes

Chapitre 3

Études de liaisons génétiques

Une étude de liaison génétique est basée sur la coségrégation à l'intérieur d'une population. Pour expliquer la coségrégation et la liaison génétique chez les modèles de mammifères, Rapp a donné l'exemple de deux lignées aux effets contrastants pour le phénotype étudié, dans ce cas-ci la PA, nommés P_1 et P_2 (24). Le marqueur M est un microsatellite pour le locus M qui est lié au QTL A pour la PA (Figure 5). L'allèle A_1 de la lignée P_1 est l'allèle qui diminue la PA, alors que l'allèle A_2 de la lignée P_2 est l'allèle qui augmente la PA. Dans cet exemple, nous avons le marqueur M_1 qui est lié au QTL A sur l'allèle A_1 qui diminue la PA et le marqueur M_2 qui est lié au QTL A sur l'allèle A_2 qui augmente la PA. Puisque ces deux lignées sont faites à partir des croisements frères-sœurs pour plusieurs générations, les marqueurs et loci de QTL sont homozygotes pour leurs allèles.

Une grande population est nécessaire pour faire une étude de liaison génétique. Une population F_1 est obtenue en croisant les lignées P_1 et P_2 . La population F_2 est obtenue en entrecroisant la population F_1 . La population F_2 est phénotypée pour la PA (dans le cas de notre laboratoire par télémétrie) et génotypée par PCR avec le microsatellite pour le locus. Lors de ces croisements, les marqueurs et les allèles ségréguent de manière mendélienne (1 :2 :1) Les PA observées sont comparées en utilisant des outils de statistiques (par exemple, ANOVA) Dans cet exemple, des différences de PA vont être observées puisque le marqueur est lié au QTL de PA. Plus la distance entre le marqueur et le QTL est grande, plus la possibilité de recombinaison est grande. Ceci diminue la possibilité de coségrégation de M avec la PA.

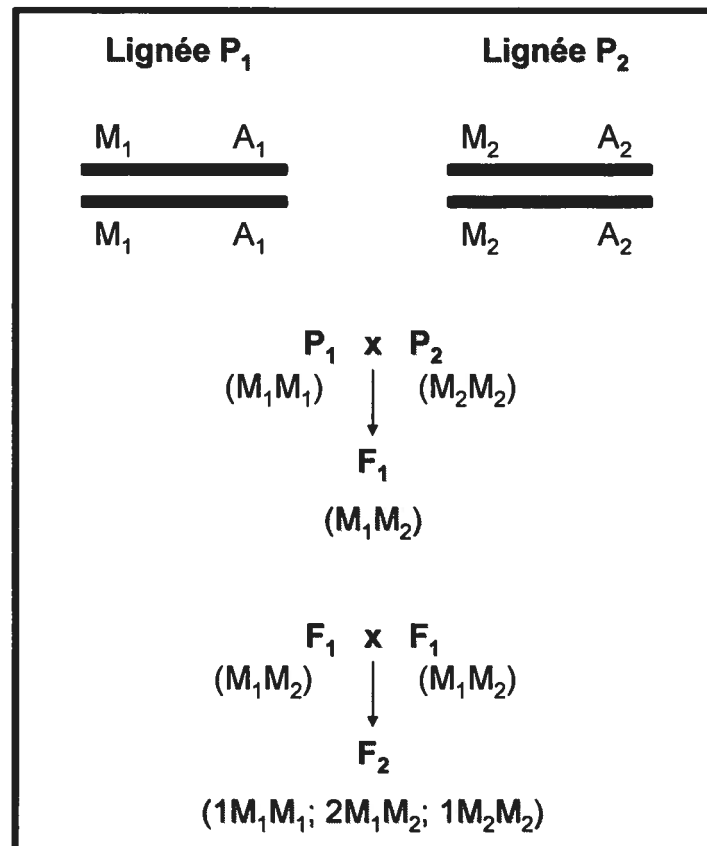


Figure 3- Schéma basé sur une représentation de l'article de Rapp.(24). Ce schéma montre la coségrégation lors d'une étude de liaisons génétiques.

La prochaine étape dans une étude de liaison génétique est de localiser le QTL sur la carte chromosomique et l'identifier de la puissance de ce QTL sur la PA. La puissance d'un QTL sur la PA peut entraîner des difficultés dans sa localisation (24). Un effet sur la PA lié à un marqueur peut être causé par un QTL localisé à proximité du marqueur utilisé dans l'étude ou à une QTL localisé à une plus grande distance du marqueur où l'effet sur la PA est tellement grand qu'il est observé aussi à ce marqueur. C'est pour cette raison qu'il est important d'avoir beaucoup de marqueur à sa disposition lors d'une telle étude.

Plusieurs outils en statistiques sont mis en place pour faciliter la localisation d'un QTL sur les chromosomes. MAPMAKER/QTL est un exemple (24 ;26). Ce programme prédit la possibilité de la présence d'un QTL par un calcul de logarithmes où un résultat de LOD est obtenu. Un LOD est un ratio de log de la possibilité de présence d'un QTL versus la possibilité d'absence de QTL. Les résultats obtenus par ces calculs sont présentés sous forme de graphique où le LOD est calculé à plusieurs points d'intervalle entre les marqueurs. La graphique a les positions chromosomiques sur l'axe des x et le LOD sur l'axe des y. L'intervalle où le LOD est le plus grand est la région chromosomique qui est la plus susceptible de contenir le QTL pour la PA (24). Un LOD supérieure à 3 est considéré significatif. L'intervalle de confiance pour un résultat de LOD est influencé par plusieurs facteurs : la puissance du QTL sur le phénotype observée, la grandeur de la population étudiée et la densité des marqueurs utilisés.

Cependant, même si ces facteurs sont pris en considération lors de la planification de l'expérience, la localisation de QTL par liaison génétique se limite à un intervalle chromosomique de 20 à 30 cM (39). Une telle région contient des centaines de gènes. Ceci oblige les chercheurs d'utiliser une autre méthode pour réduire le nombre de gènes candidats.

Un autre problème qui survient par les études de liaison génétique est l'analyse de l'information obtenu des courbes de LOD. Il y a toujours une forte possibilité de la présence de plusieurs QTL sur un chromosome. Si la distance qui sépare ces deux QTL est supérieure à 80cM, il y a possibilité que ces deux QTL ségréguent de manière indépendante (24). Ceci peut être alors observé par deux pics sur le graphique. Dans le cas contraire, si la distance entre les deux QTL est inférieure de 80cM, la courbe n'indique pas la présence de plusieurs QTL puisque celle-ci ne va montrer qu'un seul pique.

La présence de plusieurs QTL sur un chromosome indique aussi la possibilité d'interaction entre ceux-ci. Si l'interaction est additive, nous pouvons observer une amplification du LOD ou une annulation de LOD. Dans le premier cas, si les deux QTL

ont des effets qui augmentent la PA, nous allons obtenir un très grand LOD pour un locus donné. Donc en isolant le locus, il y a une forte possibilité que son effet sur la PA ne soit plus aussi significatif. Une annulation de LOD résulte de l'interaction additive de deux QTL aux effets opposés sur la PA. Dans ce cas, on peut conclure qu'il n'y a pas de QTL à PA sur un chromosome alors qu'il y en a deux, empêchant d'identifier les gènes candidats.

Les interactions épistatiques sont une autre sorte d'interactions entre les QTL peuvent avoir. Une telle interaction est commune pour les traits complexes, mais elle est très difficile à identifier. Elle peut donner un LOD non-significatif. Les interactions épistatiques vont être vues en plus grands détails dans le prochain chapitre.

Chapitre 4

Lignées congéniques

La présence d'un QTL à PA sur un chromosome ne peut être prouvée simplement par une étude génomique (46). Avec les études de liaisons génétiques, une très grande région à QTL est obtenue, trop grande pour justifier le clonage positionnel, et l'analyse statistique de ces études présente des problèmes d'interprétation des résultats (24). Une étude physiologique doit être faite pour montrer que la région prédite par l'étude génomique a réellement un effet sur la PA. Les lignées congéniques permettent ceci, ainsi que l'étude moléculaire des QTL (53;54).

Les lignées congéniques permettent de cibler une région d'intérêt dans le génome de l'animal (Figure 6). L'exemple suivant, donné par Rapp, explique bien la fabrication d'une lignée congénique : la lignée donatrice a un génotype M_1M_1 pour le marqueur au locus M, la lignée réceptrice a un génotype M_2M_2 pour le marqueur au locus M (24). La lignée réceptrice signifie que le fond génomique des lignées congéniques va être de ce génotype et c'est cette lignée qui va accepter le segment homologue de la lignée donatrice. Dans cet exemple, le but est d'obtenir un fond génomique du génotype M_2M_2 avec une région chromosomique M_1M_1 . Une population F_1 est produite en croisant ces deux lignées. Cette population a le génotype M_1M_2 . La population est croisée avec la lignée réceptrice. Une population avec les génotypes M_1M_2 et M_2M_2 va être obtenue. Les hétérozygotes sont encore une fois sélectionnés pour être croisés de nouveau avec la lignée réceptrice. Ce croisement de retour est fait huit fois dans le but d'homogénéiser le fond génomique (24;53). Une fois que le fond génomique est homogène, deux hétérozygotes M_1M_2 pour la région ciblée sont entrecroisés. Nous obtenons alors une population avec un fond génomique homogène au génotype M_2M_2 et les génotypes M_1M_1 , M_1M_2 et M_2M_2 pour la région ciblée. Les rats au génotype M_1M_1 pour la région d'intérêt sont choisis pour les études quantitatives du trait étudié.

En raison de ces croisements de retour, les lignées congéniques prennent entre deux et trois ans pour leur fabrication (24). Avec un plus grand nombre de marqueurs génétiques disponibles chez le rat, le temps de la fabrication des lignées congéniques peut être raccourci en utilisant la méthode de congéniques rapides (*speed congenics*) (24 ;26 ;53). Cette méthode utilise des marqueurs dispersés à travers le génome, en plus des marqueurs de la région d'intérêt, pour le génotypage des rats. Cette méthode permet d'obtenir des lignées congéniques entre 15 et 18 mois (Figure 7) (24 ;26).

Donc, en fabriquant plusieurs sous-lignées congéniques pour une région à QTL, nous réussissons à mieux localiser le QTL à PA. Cependant, la plus petite région possible à identifier par cette méthode est de 1 cM puisque la possibilité de recombinaison entre deux marqueurs rapprochés est faible (24). Une fois que la région à QTL est réduite à 1 cM, le clonage positionnel peut être commencé. Plusieurs articles sont publiés avec des régions à QTL pour la PA localisée et réduite grâce aux lignées congéniques (37 ;53 ;55-65).

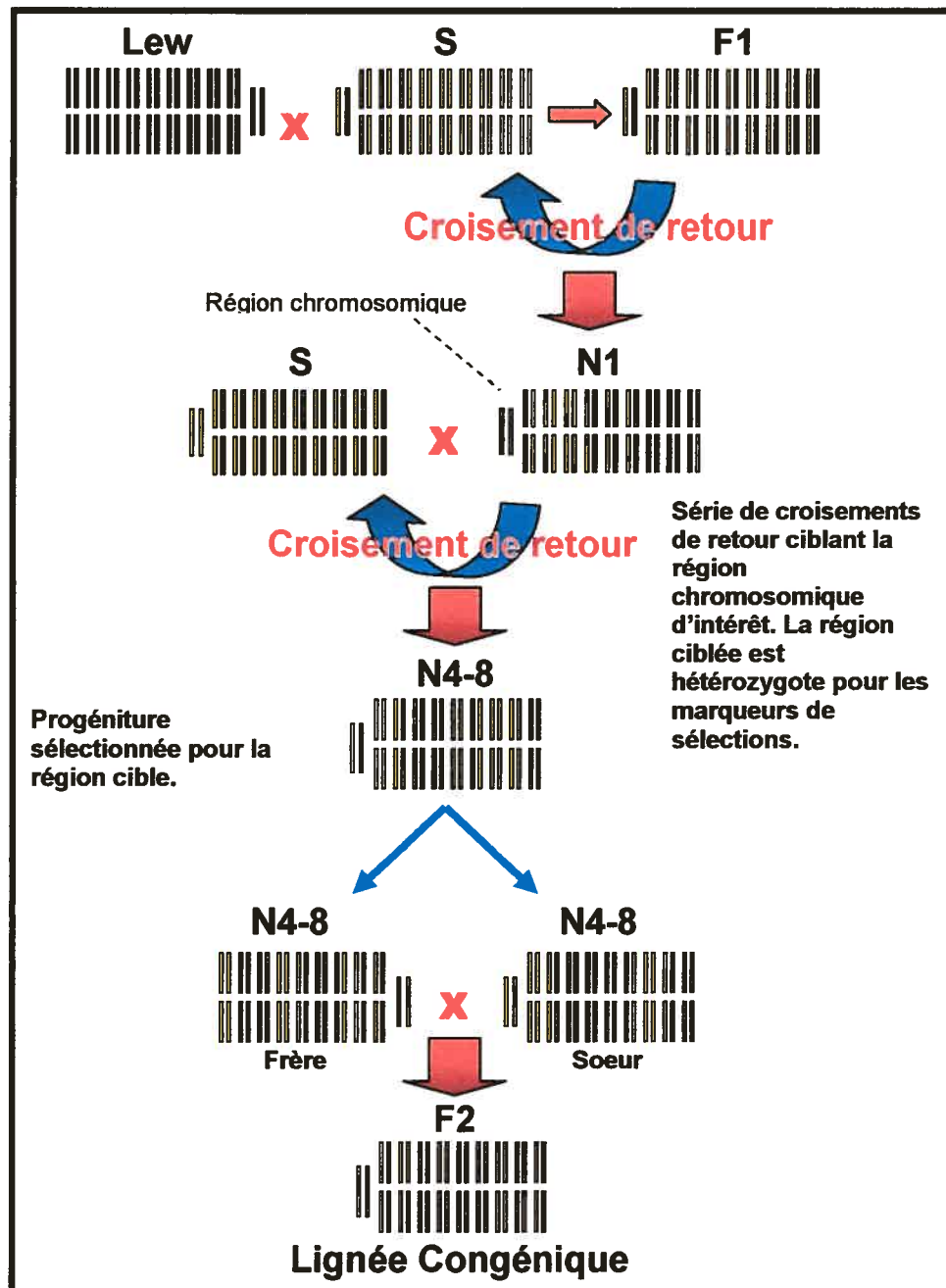


Figure 6- Représentation schématique de la fabrication de lignées congéniques. Les lignées parentales, S et Lew, sont croisées pour obtenir la population hétérozygote F1. Cette dernière est recroisée avec la lignée parentale S. La population N1 est obtenue, génotypée et sélectionnée pour les rats hétérozygotes pour les marqueurs délimitants la région cible. Une série de croisements de retour est alors performée avec ces rats pour obtenir une population de progénitures hétérozygotes (SL) pour la région cible et homozygote (SS) pour le fond génomique. Les frères et sœurs ayant ces caractéristiques sont alors croisés pour obtenir une progéniture SS pour le fond génomique et LL pour la région cible. Les rats sont alors croisés pour produire une lignée congénique stable. Schéma basé sur une représentation de l'article de Cowley Jr. Et al. (2004) (49).

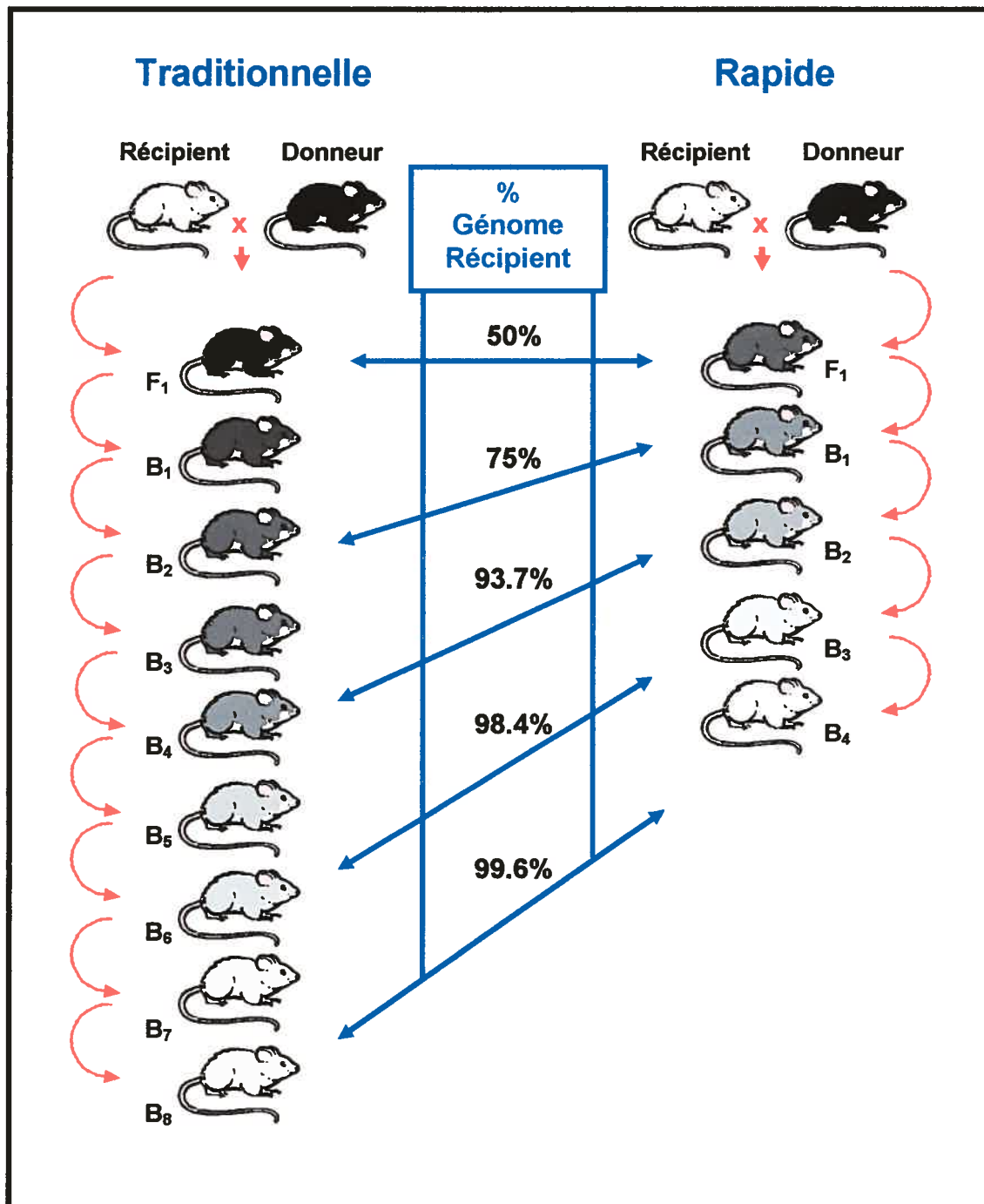


Figure 7- Schéma représentant la méthodologie de lignées congéniques rapides (*speed congenics*). Les générations de croisements de retour sont réduites d'approximativement 50%. Cette approche utilise des marqueurs polymorphes dispersés à travers le génome à des intervalles égaux. Figure empruntée de l'article McBride et al. (2003) (26).

Chapitre 5

Cartographie de QTL

Avant le séquençage du génome du rat, trouver des marqueurs dans la région d'intérêt était plus ou moins une question de chance. Plusieurs versions des cartes de liaisons génétiques et de cartes de radiation hybride sont publiées. Ces versions varient selon les marqueurs qui y sont positionnés et par les distances entre ces derniers. Donc, non seulement les marqueurs devaient être polymorphiques, mais aussi situés au bon endroit. Il fallait alors intégrer toutes les informations des différentes cartes.

Cette méthodologie est encore utilisée aujourd'hui, mais elle est facilitée par la séquence génomique. Grâce à cette dernière, il est maintenant possible de positionner les marqueurs avec une grande précision sur la carte du chromosome. L'obstacle des « trous » sur la carte de liaisons génétiques (une région sur la carte où aucun marqueur polymorphique ne pouvait être trouvé) est maintenant très réduit.

Cependant, il est important de noter que les informations obtenues par la séquence génomique ne sont pas des certitudes. En alignant les séquences d'un marqueur avec la séquence génomique nous obtenons sa position sur le chromosome. Cependant, ce n'est qu'en génotypant le marqueur sur les lignées congéniques que l'on peut confirmer sa position sur la carte chromosomique.

Une carte génétique dense en marqueurs permet de caractériser les lignées congéniques avec une plus grande précision : en ayant une petite distance entre les marqueurs, les régions ambiguës sont réduites. Des petites régions ambiguës des lignées congéniques facilitent la localisation des QTL en diminuant la région à QTL. Plusieurs groupes ont montré qu'un nombre supérieur en marqueurs utilisés dans leurs études facilite la localisation des QTL à PA (40;66-68).

5.1 Microsatellites

Les microsatellites sont de courtes répétitions en tandem retrouvées à travers le génome non-codant des eucaryotes qui apparaissent en raison de glissement lors la réplication d'ADN (44;24). Les séquences répétitives peuvent être sous forme de mono-, di-, tri-, ou tétranucléotides. Les microsatellites varient en longueur et peuvent être génotypés par une simple réaction de PCR.

En comparant le génome humain et le génome de la souris, il y a un plus grand nombre de microsatellites chez cette dernière. Ces microsatellites ont aussi tendance à être plus long. Cependant, en comparant le génome de la souris et le génome du rat, les différences sont plus petites. Le microsatellite le plus présent dans un génome de mammifère ((CA)_n, n étant le nombre de répétitions) est en moyenne plus long chez le rat que chez la souris. Le microsatellite le moins commun chez les mammifères, (GC)_n, est observé 1.5 fois plus souvent chez le rat que chez la souris (44).

Au cours des années, avec le séquençage des gènes connus par plusieurs laboratoires, la liste des oligonucléotides utilisés pour amplifier les microsatellites par PCR s'est allongée. Certains laboratoires se sont spécialisés dans l'identification et la caractérisation des microsatellites et la synthèse des oligonucléotides nécessaires pour les amplifier. Créant ainsi des grandes bases de données de microsatellites.

Les microsatellites, à leur tour, sont utilisés pour faire des cartes de liaisons génétiques. Ces cartes ont été établies pour chaque chromosome du rat. Les microsatellites permettent aux chercheurs de se placer sur un chromosome, d'où le nom de marqueur génétique. Pour qu'un marqueur soit utile, il doit être polymorphique pour les lignées de rats étudiées.

Plusieurs bases de données sont disponibles sur Internet (Tableau 3). Ces bases peuvent être sous forme de tableau ou de carte (cartes de liaison génétique ou cartes d'hybride de radiation). Sur ces cartes, ou dans ces tableaux, nous retrouvons les

positions approximatives des marqueurs sur les chromosomes. Il y a aussi des bases de données qui offrent des informations sur le polymorphisme des marqueurs, leur température optimale pour les réactions de PCR ainsi que les séquences des oligonucléotides utilisées dans l'amplification par PCR.

Dans le passé, lorsque la séquence génomique du rat n'était pas disponible, l'utilisation des marqueurs de souris sur le génome de rat était commune (23). Ceci s'explique par le fait que la recherche génomique était beaucoup plus avancée chez la souris.

Tableau 3- Exemples de sites d'Internet

Outils	Site d'Internet
Marqueurs génétiques	http://ratmap.hgc.jp/Marker_search.html
	http://www.broad.mit.edu/rat/public/
	http://www.broad.mit.edu/rat/public/
	http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/markers_info/
	http://ratmap.org/ResultSearchLocus.htm?citno=666v
	http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/marker_polytest.html
	http://www.niams.nih.gov/rtbc/ratgbase/data/ARBPR3.htm
Carte de liaisons génétiques	http://ratmap.hgc.jp/comp.html
	http://ratmap.hgc.jp/menu/map.html
	http://ratmap.org/ChromapnyPh.html
	http://ratmap.org/Idiogram.html
	http://ratmap.org/gene_mapping_data/integrated_linkage_maps/
	http://rgd.mcw.edu/tools/maps/maps_view.cgi?id=1006&chr=3
Carte de hybride de radiation	http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/rat_RH_comprehensive_maps.html
	http://www.broad.mit.edu/rat/public/
	http://www.rgd.mcw.edu/tools/maps/maps_view.cgi?id=1002
	http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/rat_RH_framework_maps.html

5.2 Carte d'hybrides de radiation

Il y a plusieurs outils disponibles pour positionner un marqueur ou un gène sur les chromosomes. Les panneaux somatiques d'hybrides de radiation en sont un bon exemple. Dans cette technique, les cellules somatiques de rats sont irradiées par des rayons X et fusionnées aux cellules somatiques de hamster. Une lignée de cellules d'hybrides de radiation est établie par l'intégration des fragments chromosomiques du rat aux chromosomes du hamster. Plus la distance entre deux loci chez le rat est élevée, moins il y a de chance que ces deux loci soient retenus dans la même lignée d'hybrides de radiation.

Une carte génétique peut être construite à partir des résultats de présence ou d'absence de marqueurs ou de gène obtenu par PCR sur les panneaux somatiques d'hybrides de radiation. Plusieurs sites Internet publient des versions différentes de cartes génétiques obtenues par les panneaux somatiques d'hybrides de radiation (Tableau 3). Les cartes publiées varient par les marqueurs qui y sont placés et les distances qui les séparent, les distances étant exprimées en cR.

Chez la souris, des panneaux somatiques d'hybrides de radiation ont été effectués pour plus de 5000 gènes. Ceci a permis la création d'une base de données très utile dans le positionnement de gènes.

5.3 Carte physique

Ce qui consistait en un travail long et ardu est maintenant simplifié par la disponibilité de la séquence génomique du rat. Contrairement aux cartes de liaisons génétiques et d'hybrides de radiation, où les distances sont exprimées respectivement en cM et cR, une carte physique donne la distance entre les marqueurs et gènes en pb.

Avant l'arrivée de la séquence du rat, une carte physique n'était qu'une simple estimation de la distance entre deux marqueurs. Cette distance approximative était obtenue en superposant les bouts de BAC et de YAC disponibles.

En ayant les gros fragments de la séquence génomique regroupés en supercontig, déterminer la position chromosomique d'un marqueur et la distance entre deux marqueurs sont beaucoup plus précises. Ceci peut être réalisé par un programme disponible sur le site de NCBI, nommé BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Puisque la séquence génomique du rat ne va jamais être complétée, il va toujours rester des trous dans la séquence ainsi que quelques erreurs. Ceci peut causer parfois des faux résultats pour l'alignement des séquences ou même une absence d'alignement.

5.4 Carte d'homologie

Une carte d'homologie a plusieurs rôles. Deux de ceux-ci sont l'identification de la région chromosomique du génome humain impliquée dans le trait étudié et l'obtention d'une liste plus complète de gènes candidats.

Pour identifier la région impliquée chez l'homme à partir des études sur le rat, il faut établir les limites de cette région. L'alignement des séquences est une des méthodes utilisées. Il est important de se souvenir que lors de l'évolution, des grands segments chromosomiques sont restés intacts. Ceci simplifie la fabrication d'une carte d'homologie. En alignant les séquences de la région d'intérêt du rat sur le génome de la souris, nous obtenons la région homologue chez la souris. Il est conseillé d'aligner les séquences génomiques du rat et de la souris en premier, et ensuite celles de l'homme parce que les deux premiers sont des cousins rapprochés de l'évolution.

Puisque les séquences génomiques sont plus complètes chez la souris et chez l'homme, une carte d'homologie permet d'obtenir une liste plus complète de gènes candidats se trouvant dans une région d'intérêt chez le rat. La liste de gènes dans la région d'intérêt peut être obtenue en regardant la version texte de la séquence sur le site de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou en utilisant le programme MAPVIEWER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) de ce site. Ce dernier non seulement offre une version visuelle du génome avec l'emplacement des gènes, mais offre aussi plusieurs outils qui permettent d'obtenir des informations sur le gène ainsi que l'homologie de ce gène chez les autres espèces.

Résultats

Chapitre 6

Études précédentes

L'équipe de Michael R. Garrett a effectué une étude de liaison génétique pour l'hypertension essentielle en utilisant deux lignées de rats (45). Pour réaliser cette étude, les deux lignées utilisées doivent avoir des phénotypes contrastants pour le trait étudié. Donc, le rat Dahl *Salt-Sensitive* (abrégé dans ce texte S) et le rat Lewis (abrégé dans ce texte Lew) ont été utilisés. Dans leur étude génomique du rat pour les QTL à PA, une population F_2 (SxLew), une population de 151 rats, a été utilisée (45). Dans leur étude génomique de liaisons génétiques, 406 marqueurs sont utilisés. Ces marqueurs sont bien répartis à travers le génome, couvert à 97.3% par des marqueurs séparés d'une distance moyenne de 10cM.

Pour le chromosome 3, 30 marqueurs génétiques sont utilisés et la longueur du chromosome est estimée à 112 cM (45). C'est au marqueur D3Mgh6 qu'un LOD de 3 est calculé. Cependant, à 50 cM de ce marqueur, près du marqueur D3Mco9, il y a un faible signal pour la PA (LOD de 1.7) (45). Ceci est indicatif de la présence de deux QTL : celui de D3Mgh6 est un QTL standard et celui de D3Mco9 est un QTL d'interaction. L'interaction de ce QTL est déterminée en étudiant le génotype du QTL sur le chromosome 2. Lorsque le chromosome 2 est SS, l'effet du chromosome 3 sur la PA est faible par rapport à l'effet observé lorsque le chromosome 2 est LL (45). Ces données montrent l'interaction du fond génomique.

Puisqu'il y a coségrégation de la PA avec le gène *Edn3*, l'équipe de Rapp a fabriqué une lignée congénique pour ce gène (Figure 8). La lignée congénique couvre la région entre les marqueurs D3Mco19 et D3Wox1. Cette région se trouve à l'extrémité du chromosome 3 prédit à être liée à la PA (69). La lignée congénique a une PA et une masse cardiaque inférieures à celles de la lignée hypertendue parentale S, ce qui démontre la présence d'un QTL à PA dans cette région (69). Les résultats obtenus par ce groupe montrent l'importance d'une étude génomique. Avec la méthode du gène

candidat, seulement le QTL pour le gène *Edn3* a été identifiée. L'étude de liaisons génétiques a montré la possibilité de la présence d'un deuxième QTL à PA.

Chapitre 7

Projet

La question posée par notre laboratoire est la suivante : Peut-on que le chromosome 3 contient un QTL de PA ? Pour répondre à cette question, la méthode de lignée congénique a été utilisée (Figure 6). Il est important de noter que les résultats des liaisons génétiques varient selon les lignées de rats utilisées. Pour cette raison, les lignées S et Lew ont été utilisées dans la fabrication de nos propres lignées congénétiques.

Pour répondre à notre question, nous avons fabriqué une lignée congénique qui couvre la région chromosomique prédite par l'étude génomique de Garrett. La lignée congénique obtenue, nommée S.L1, couvre la région chromosomique comprise entre les marqueurs D3Rat52 et D3Rat17. La PA des rats de cette lignée congénique était mesurée par télémétrie. Nous avons observé une baisse de la PA, 42 mmHg ($p < 0.02$), versus la lignée parentale hypertendue S ce qui prouve la présence d'un QTL à PA dans cette région pour la lignée congénique S.L1. Cependant, cette lignée congénique couvre une région chromosomique d'environ 40 cM.

La prochaine étape consistait à réduire la région à QTL en fabriquant des sous-lignées congéniques. Quatre sous-lignées congéniques ont été obtenues : S.L2, S.L3, S.L4 et S.L5. En mesurant la PA de chacune de ces sous-lignées congéniques, nous avons pu localiser deux QTL à PA : un QTL, nommé -BP QTL, situé entre les marqueurs D3Rat52 et D3Rat130, et un autre QTL, nommé +BP QTL, situé entre les marqueurs D3Chm63 et D3Rat26. Cependant, il est intéressant de noter que la sous-lignée S.L4 montre une PA supérieure à celle de la lignée hypertendue S. Autrement dit, nous avons ciblé des allèles qui augmentent la PA dans le génome normotendu Lew.

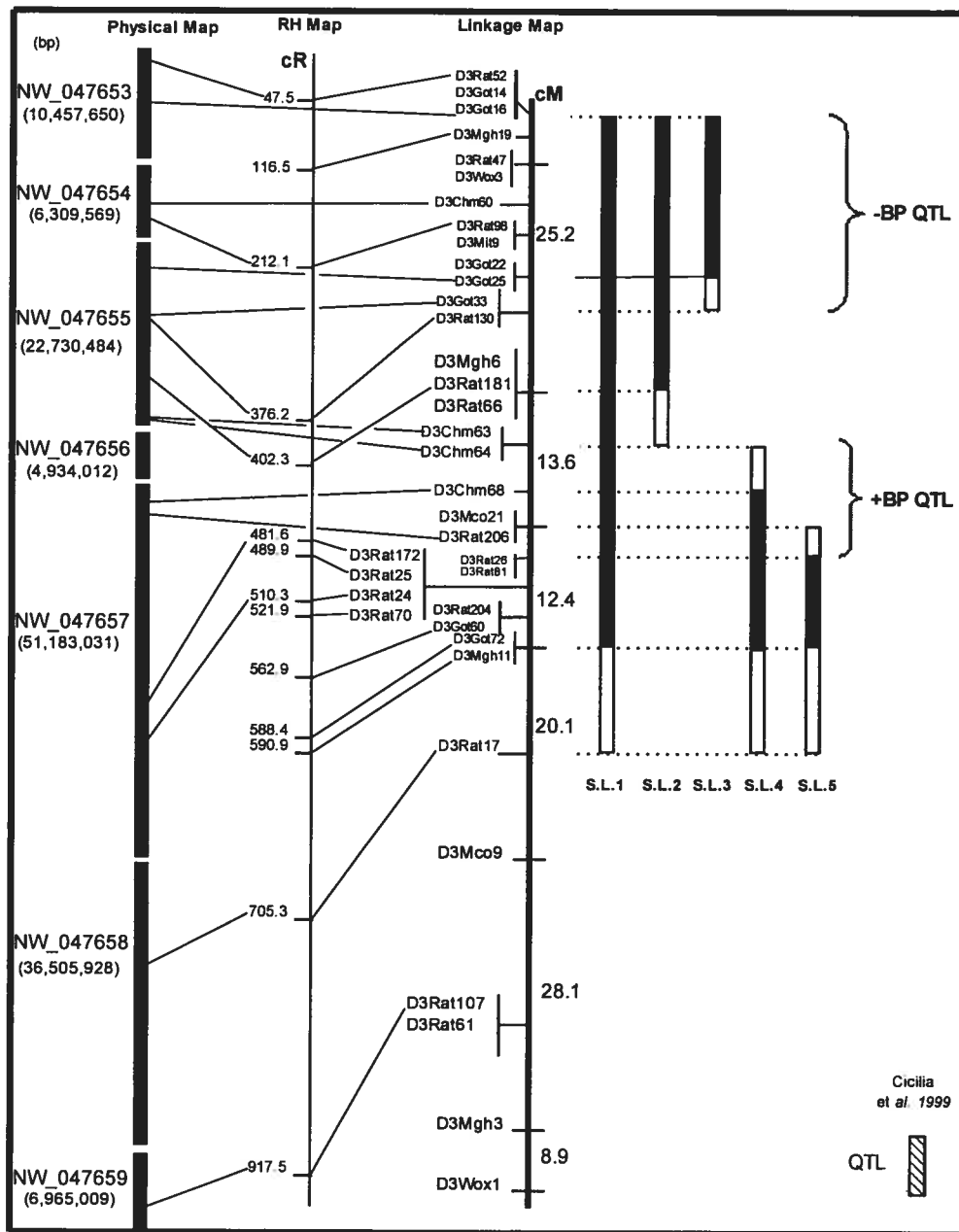


Figure 8- Représentation carto-graphique des lignées congéniques du Chr3. Description des lignées S.L1, S.L2, S.L3, S.L4 et S.L5 : barres pleines représentent la région homozygote pour Lew, barres vides représentent les régions ambiguës du génotype. Le reste du génome est homozygote pour S. Le QTL localisé par Rapp est représenté au bas de la figure dans le coin droit.

Ce qui différencie notre étude des autres déjà publiées est l'interaction existante entre les deux QTL localisés. Le -BP QTL est nommé ainsi parce que la lignée congénique couvrant cette région, S.L3, a une PA inférieure à la lignée parentale hypertendue S. Le +BP QTL est nommé ainsi parce que la lignée congénique couvrant cette région, S.L4, augmente la PA versus la lignée parentale hypertendue S. Cependant, lorsque ces deux régions chromosomiques à QTL sont couvertes ensemble par lignée congénique, S.L1, l'effet de la PA ne s'annule pas (Figure 9). Nous observons une PA inférieure à celle de la lignée S. Ce qui représente une interaction entre les deux QTL. Cette interaction est épistatique, et non additive. Si l'interaction était additive, on aurait observé une annulation (ou une quasi-annulation) de l'effet de la PA par la lignée congénique S.L1. Nous observons est une dominance du -BP QTL sur le +BP QTL.

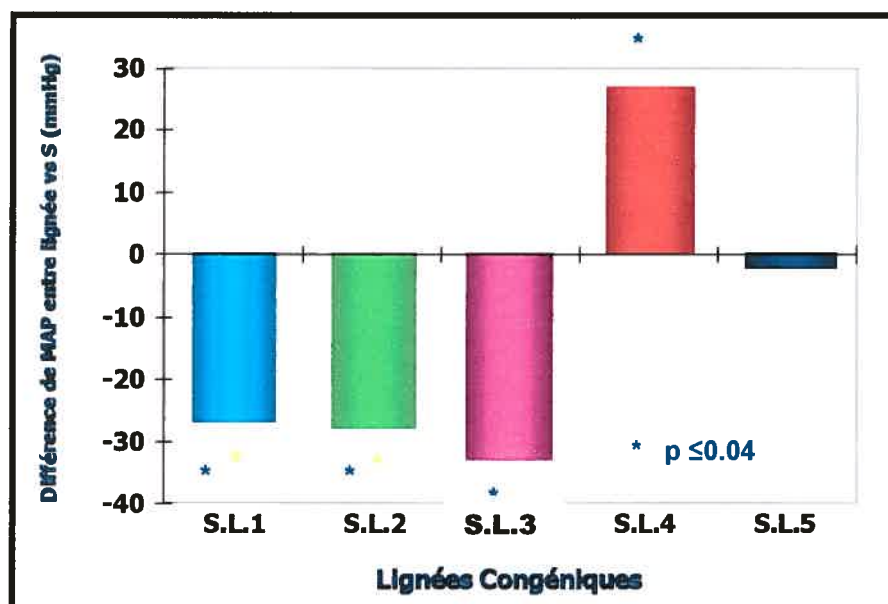


Figure 9- Représentation des données de PA publiées dans l'article (chapitre 2).

Cependant d'autres études sont nécessaires pour prouver ceci car la lignée congénique ne comprend pas exclusivement les deux QTL (lignée S.L1): la région chromosomique située entre les deux QTL est comprise dans S.L1. Pour prouver que les deux QTL ont des interactions épistatiques, une lignée congénique couvrant cette région entre les deux QTL n'ayant pas d'effet sur la PA doit être fabriquée. Pour le moment, les résultats suggèrent que le -BP QTL est épistatique envers le +BP QTL (Figure 10).

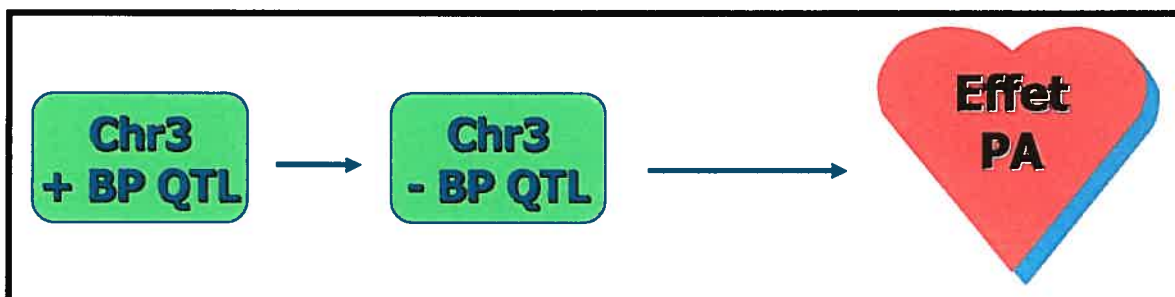


Figure 10- Représentation schématique de l'interaction épistatique entre le -BP QTL et le +BP QTL

Chapitre 8

Publication

Quantitative trait loci with opposing blood pressure effects demonstrating epistasis on Dahl rat Chromosome 3

Ana Palijan, Julie Dutil, Alan Y. Deng

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

Short title: Epistatic interactions between Blood pressure QTLs

Corresponding author: Alan Deng, Ph.D.

Chief of Molecular Genetics and Associate Professor of
Medicine

Research Centre

Centre Hospitalier de l'Université de Montreal (CHUM)

7-132 Pavillon Jeanne Mance


3840, rue St. Urbain

Montreal, Quebec, H2W 1T8

Canada

Phone: 514-890-8000 ex.15522

Fax: 514-412-7152



Abstract

Our previous linkage studies indicated that there might be a blood pressure (BP) quantitative trait locus (QTL) on Chromosome 3 (Chr 3) that distinguished the Dahl salt-sensitive (S) strain and the Lewis (LEW) strain of rat. To test this and also to narrow down the segment containing this putative QTL, five congenic strains have been generated by replacing various chromosomal segments of the S rats with the homologous segments of the LEW rats. They are designated as S.L1, S.L2, S.L3, S.L4 and S.L5 respectively. S.L2, S.L3, S.L4 and S.L5 are substrains of S.L1, i.e. they contain substitutions of smaller sections within the large fragment defined by S.L1. The construction of these congenic strains was facilitated by a genome-wide marker screening process. BPs of the rats were measured by telemetry. S.L2 and S.L3 shared a fragment of Chr 3 in common and both showed a BP-lowering effect, indicating the existence of ‘-’BP QTL alleles from LEW in comparison with S. In contrast, S.L4, in which the substituted section has no overlap with either S.L2 or S.L3, showed a BP significantly higher than that of S rats, indicating the presence of ‘+’BP QTL alleles from LEW in comparison with S. Interestingly, the combined effect of the ‘-’BP QTL and ‘+’BP QTL alleles was ‘-’ in S.L1, implying that the ‘-’QTL is epistatic to ‘+’QTL.

Key words: genetic hypertension, rat Chromosome 3, Lewis rat, congenic strains

Introduction

Linkage and congenic analyses have led to the mapping of numerous quantitative trait loci (QTLs) for blood pressure (BP) in the rat (14). Our focus is on the mapping of BP QTLs using the Dahl salt sensitive rat (S) (4). Cicila and coworkers (1) detected a linkage of the endothelin 3 (*Edn3*) locus on Chromosome (Chr 3) to BP. Later by using a congenic strain, they confirmed the presence of a BP QTL near *Edn3* (2). In our initial studies, another QTL was located in a segment of Chr 3 in an F₂(S x LEW) population (8). The location of this QTL was on the opposite end of the same chromosome and seemed to be distinct from the QTL found by Cecila and coworkers (1, 2). The proximal location of this second QTL was also found in several other linkage studies in F₂ populations using various rat hypertensive models (2, 3, 11, 12, 19).

There are a variety of congenic strains reported for physical mapping of BP QTLs in S rats (2, 4, 5-8, 13, 16, 18). So far, the BP-raising alleles are always associated with the hypertensive S rats, whereas contrasting normotensive strains always carried BP-lowering alleles, despite the linkage evidence indicating that some BP-raising alleles could come from normotensive strains as well (8, 9). Another intriguing question is whether the combined BP effect of two contrasting QTLs would cancel each other out, or one QTL could be dominant over the other.

The purpose of the present work is to address the questions: a) are there one or more QTL in the region in question on Chr 3? and b) if there are multiple QTLs, what are their BP effects, individually and in combination?

Methods

Animals: The SS/Jr (Dahl) rat used for making congenic substrains will be designated as S in the present report and is the same as we used previously (5, 7, 13, 18). In order to ensure that our S rats were not genetically contaminated, a rigorous and strict quality control procedure was instituted, consisting of a genetic testing and a physical discrimination. For a detailed quality control procedure, please consult reference 7. LEW/CrlBR (LEW) rats were purchased from Charles Rivers (La Salle, Québec, Canada). The same quality control as for the S strain applied to LEW also on the basis of genetic monitoring with genome-wide markers (7, Table 1). Protocols for handling as well as maintaining animals were approved by our institutional animal committee. All experimental procedures were in accordance with the guidelines of institutional, provincial and federal regulations.

Breeding scheme for generating congenic strains: The breeding procedure and screening protocol were essentially the same as reported previously (5, 13, 18). Briefly, rats of the S and LEW strains were bred to produce F₁ rats, which were then backcrossed to S rats to produce the first backcross generation (BC1). BC1 rats were genotyped for 99 markers spaced throughout the rat genome with an average spacing of about 18 cM (Table 1, which is similar to that given in references 5, 13 and 18). One BC1 rat was selected and designated as the ideal breeder, as it was heterozygous SL for a Chr 3 region but possessed the maximum SS homozygosity for the rest of the untargeted genome. The ideal breeder BC1 was mated with an S rat to produce BC2. BC2 rats were screened exactly as for those of BC1 to derive an ideal breeder BC2. This process continued until

BC5. At this point, it was found that only the markers delineating a Chr 3 region of interest (Figure 1) were heterozygous SL; whereas the markers for the rest of the genome including those flanking the Chr 3 region of interest were homozygous SS.

To establish a congenic strain, a BC5 rat was mated to an S rat in order to create progeny with a SL genotype for the segment of interest. Subsequently, a female and a male were sister-brother bred to generate rats homozygous LL for the region of interest, but homozygous SS for the rest of Chr 3 and rest of the genome. In the process, 5 congenic strains were produced, and are designated as S.LEW-D3Rat52/D3Rat17 (abbreviated as S.L1), S.LEW-D3Rat52/D3Chm63 (S.L2), S.LEW-D3Rat52/D3Rat130 (S.L3), S.LEW-D3Chm64/D3Rat17 (S.L4) and S.LEW-D3Mco21/D3Rat17 (S.L5). The chromosome regions which are homozygous LL in the various strains are shown as solid bars in Figure 1. All the markers in the region concerned were genotyped in the congenic strains.

BP measurements: The determination of BPs of the rats was essentially the same as described previously (5, 7, 13, 18). In brief, the mating pairs of the S and congenic strains to be studied were bred simultaneously. Male rats were selected and weaned at 21 days of age, maintained on a low salt diet (0.2% NaCl, Harlan Teklad 7034) and then fed a high salt diet (2% NaCl, Harlan Teklad 94217) starting from 35 days of age until the end of the experiment. Telemetry probes were implanted when rats were 56 days old (i.e. after 3 weeks of the high salt diet) with their body weights between 250-320 grams. After surgery, the rats were allowed 10 days to recuperate before their BPs were read. The implantation of telemetry probes, the age and postoperative cares of animal are the same as described before (5, 7, 13, 18). The telemetry system from the Data Sciences Inc.

(St. Paul, MN) was used to measure BP. Each telemetry probe was calibrated before and cleaned after each usage according to manufacturer's instructions.

Production of new markers: In order to position ourselves on Chr 3, sequences of known markers characterizing our congenic strains were aligned with the available rat sequence found at the website, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=10116&chr=3> (Figure 1). The alignment of sequences was done with the program BLAST, found at the website, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>. Once the chromosomal regions of interest were identified, their sequences were scanned for the presence of microsatellites. The segments of sequence containing microsatellites were used to design oligonucleotides for genotyping rats based on PCR. These new markers were designated with D3Chm prefixes, for Centre Hospitalier de l'Université de Montreal (CHUM). Only those that give workable PCR products are listed in Table 2.

DNA extraction and Genotyping: DNA for each rat was extracted by tail biopsy using a Qiagen Genome kit and the genotype of each rat was determined by PCR based on the methods previously published (5, 7, 13, 18).

Radiation Hybrid mapping: A rat/hamster (RH) panel of 96 radiation hybrids was purchased from Research Genetics (Huntsville, AL, <http://www.resgen.com/>). For chromosome mapping, each marker was genotyped using RH by PCR according to a previously published protocol (5, 7, 13, 18). To locate a marker of interest on an existing RH framework map, the results of genotyping were entered into a web site, <http://rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER>.

Statistical analysis: Repeated measures Analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test in the SYSTAT 9 program (SPSS Sci. Chicago, IL) was used to compare the significance level for a difference or a lack of it in a BP component between a congenic strain and the S strain. The Dunnett test takes into account multiple group comparisons as well as sample sizes among the comparing groups. In the analysis, a BP component was compared at each day for the period of measurement among the strains (5, 7, 13, 18).

Results

Congenic constructions: By following the strategy of selecting an ideal BC rat at each generation, the construction of five congenic strains was accomplished in 5, instead of 8, BC generations as used conventionally (15). The current results are consistent with those of other investigators (10) and with our previous work (5, 13, 18). All the genome-wide markers except the region of interest (Figure 1) turned out to be homozygous at BC5. The chromosome regions containing various LEW substitutions in the congenic rats are shown in Figure 1. In the end, each region of interest from the S rat was replaced by the homologous region of the LEW rat, i.e. a LL region on the SS genetic background.

Marker generations: Most of the markers obtained from the rat database at http://www-genome.wi.mit.edu/rat/public/no_frames.html were screened for polymorphisms between S and LEW, which span the region between D3Rat52 and D3Mgh11, and the region between D3Rat52 and the telomere at the top. Large gaps remained on the map. In order to more precisely define crossover regions in the congenic strains, more polymorphic markers were needed. By taking advantage of the recently

released rat genome sequence at

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>), we produced markers

originating from the supercontigs located in the Chr 3 region of interest (see the Method section for details). These markers are listed in Table 2. Some of these markers are polymorphic and have been used to define chromosome crossovers in congenic strains (Figure 1).

BP Studies: The basic design of raising animals is similar to our previous congenic work regarding the age and sex, and in terms of the timetable of dietary treatments (5, 7, 13, 18). All the BP components were measured including mean arterial (MAP), diastolic (DAP), and systolic pressures (SAP). For simplicity of presentation, each point in the graphs in Figure 2 represents averaged 24-hour readings taken from averaged values at every four hours. One BP reading was taken every 4 hours for all the data points collected within that period of time. Then, these 4-hour readings were averaged for 24 hours or 6 readings were averaged within 24 hours to obtain one data point, which appears as a point on the graph. Please see Dutil and Deng (7) for detailed comparisons in BPs of S and a congenic strain showing hour to hour readings including diurnal variations.

Mapping of BP QTLs: Figure 2 shows comparisons of MAP, DAP and SAP of S rats with those of congenic rats. Congenic strains were compared to each other in the length of the chromosome replacements and for their effects on BP. The region containing the QTL can be localized to the segment shared in two strains that showed significant changes in BPs. MAPs, DAPs and SAPs of S.L2 and S.L3 were lower ($p < 0.04$) than those of the S strain (Figure 2d, e, f). In contrast, MAP, DAP and SAP of

S.L4 were higher ($p < 0.03$) than those of the S strain (Figure 2d, e, f). MAP, DAP and SAP of S.L1 were lower ($p < 0.04$) than those of the S strain (Figure 2a, b, c), but were not different from those of S.L2 and S.L3 ($p > 0.5$). MAP, DAP and SAP of S.L5 were not significantly different ($0.05 < p < 0.10$) from those of the S strain (Figure 2a, b, c).

Discussion

Major findings of the current work are: a, two BP QTLs are located adjacent to each other, one exerting a BP-lowering effect ('-'BP QTL), and the other exerting a BP-raising effect ('+' BP QTL); b, the '-'BP QTL is epistatic to the '+' BP QTL.

A BP QTL is mapped to the Chr 3 segment between D3Rat52 and D3Rat130 (Figure 1), which is shared between S.L2 and S.L3 congenic strains. LEW rats carry BP-decreasing alleles of this QTL compared to those of S rats. For the sake of presentation, this QTL is designated as a '-'BP QTL. Another QTL is found between D3Chm63 and D3Ra26 because S.L4 has a BP effect whereas S.L5 does not (Figure 2a, b, c). In contrast to possessing a '-' BP QTL, LEW rats being a normotensive strain, also carry BP-increasing alleles from this second QTL. For the sake of presentation, this second QTL is designated as a '+' BP QTL. The presence of a '+' BP QTL in LEW indicates that being a normotensive strain does not mean it exclusively carries BP-lowering alleles.

Thus, it is logical to pose the question 'what is the relationship between a '-' and a '+' BP QTLs?' Contrary to a conventional prediction that 1 '-' and 1 '+' BP QTL would cancel out the effect of each other, the combined effect of the '-' and the '+' BP QTLs results actually in an overall decrease in BP as shown in S.L1 (Figure 1 and Figure 2 a, b, c). Interestingly, the BP-lowering consequence in S.L1 is not different ($p > 0.50$) from that either in S.L2 or S.L3. This observation further supports the notion that relationships

among the QTLs in question are epistatic, although more complex interactions among QTLs from other chromosomes can not be ruled out.

The possibility can not be excluded that more than one BP QTL is located in each of the segments defined by S.L3 and S.L4 congenic strains. The current work has practical implications in dissecting BP QTLs as well. When a sub-segment in a large chromosome region is found to possess the same BP effect as the large region, it is also possible that other sub-segments untested within the large chromosome region could harbor additional BP QTL(s). The only way to rule out this possibility is to construct a congenic strain to include that untested region, which consequently does not show any BP effect.

The region containing the '-' BP QTL in the rat shares a conserved synteny relationship with a segment of mouse Chr 2, and segments of human CHRs 9 and 2. The region harboring the '+' BP QTL is homologous to a fragment of mouse Chr 2, and to sections of human CHRs 2, 11 and 20.

(http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/Comparative_maps/compa_map_chr03.html). A fine mapping of the QTLs in question may further refine the exact portion of the human chromosome with which it has a conserved synteny, and eventually help unravel some of the genetic determinants in human hypertension. As the genome projects for the human, the mouse and the rat progress, the genomic information will converge and might also contribute to the identification of the BP QTL in the rat.

These two QTLs are located at the opposite end of Chr 3 (Figure 1), where Cicila and coworkers found another QTL (1, 2). Other investigators found a possible QTL for cardiac mass independently of BP (17) and their QTL region is near that for the '+' BP

QTL in our current work (Figure 1). In the present and our other works, BP effects of QTLs are often associated with those of the cardiac mass also (4, 5, 7, 13, 18). It remains to be determined if certain BP QTLs in S rats could be separated from a QTL for the cardiac mass.

In summary, a case of epistasis between two QTLs in close proximity is strongly supported by the use of congenic strains. Up to date, such an epistatic interaction was limited to two QTLs with BP effects in the same direction, i.e. both lowering BP by the QTL alleles from a normotensive strain (6, 16). Our current work adds further complexity to epistatic interactions to include two QTLs on Dahl Chr 3 with opposing BP effects by QTL alleles from a normotensive strain, i.e. one lowering whereas the other raising BP. This phenomenon supports the hypothesis that achieving a threshold in limiting BP in a normotensive strain can be accomplished not only by having a higher proportion of BP-lowering QTL alleles, but also by epistatic interactions between BP QTLs in a sense of one having dominance over the other.

Acknowledgements

This work was supported by grants from American Heart Associate National Center, the Kidney Foundation of Canada, and Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to AY. Deng. AY. Deng is an Established Investigator of the American Heart Association. JD is a holder of a CIHR/Canadian Society of Hypertension studentship. We thank Dr . Pavel Hamet for a critical reading of the manuscript.

References

1. Cicila GT, Rapp JP, Bloch KD, Kurtz TW, Pravenec M, Kren V, Hong CC, Quertermous T, Ng SC. Cosegregation of the endothelin-3 locus with blood pressure and relative heart weight in inbred Dahl rats. *J. Hypertens.* 12:643-651, 1994
2. Cicila GT, Choi C, Dene H, Lee SJ, Rapp JP. Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on Chromosome 3 in Dahl rats. *Mamm. Genome* 10:112-116, 1999.
3. Clark J, Jeffs SB, Davidson AO, Lee WK, Anderson NH, Bihoreau M, Brosnan MJ, Devlin AM, Kelman AW, Lindpaintner K, Dominiczak AF. Quantative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension* 28:898-906, 1996.
4. Deng AY. In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertens.* 16: 1707-1717, 1998.
5. Deng AY, Dutil J, Sivo Z. Utilization of marker-assisted congenics to map two blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats. *Mamm. Genome* 12:612-616, 2001.
6. Deng Y, Rapp JP. Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nat Genet* 1:267-272, 1992.
7. Dutil J, Deng AY. Further chromosomal mapping a blood pressure quantitative trait locus on Chromosome 2 in Dahl rats using congenic strains. *Physiol. Genomics.* 6:3-9, 2001.
8. Garrett MR, Dene H, Walder R, Zhang Q, Cicila GT, Assadnia S, Deng AY, Rapp JP. Genomic scan and congenic strains for blood pressure quantitative trait loci using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res* 8:711-723, 1998.

9. Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahasi S, Vincent M, Danten D, Georges M, Lathrop GM. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353:521-529, 1991.
10. Jeffs B, Negrin CD, Graham D, Clark JS, Anderson NH, Gauguier D, Dominiczak AF. Applicability of a 'speed' congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat Chromosome 2. *Hypertension* 35:179-187, 2000.
11. Kato N, Hyne G, Bihoreau M, Gauguier D, Lathrop GM, Rapp JP. Complete genome searches for quantitative trait loci controlling blood pressure and related traits in four segregating populations derived from Dahl hypertensive rats. *Mamm. Genome* 10:259-265, 1999.
12. Matsumoto C, Nara Y, Ikeda K, Tamada T, Mashimo T, Nabika T, Sawamura M, Yamori Y. Cosegregation of the new region on chromosome 3 with salt-induced hypertension in female F2 progeny from stroke-prone spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin.Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:1028-1034, 1996.
13. Moujahidine M, Dutil J, Hamet P, Deng AY. Congenic mapping of a blood pressure QTL on Chromosome 16 of Dahl rats. *Mamm. Genome.* 13:153-156, 2002.
14. Rapp JP. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev.* 80:135-172, 2000.
15. Rapp JP, Deng AY. Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? *Hypertension* 25:1121-1128, 1995.

16. Rapp JP, Garrett MR, Deng AY. 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, 1998.
17. Sebkhil A, Zhao L, Lu L, Haley CS, Nunez DJR, Milkins MR. Genetic determination of cardiac mass in normotensive rats. Results from an F344 x WKY cross. *Hypertension* 33: 949-953, 1999.
18. 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. Hypertension* 20:45-53, 2002.
19. Ueno T, Tremblay J, Kunes J, Zicha J, Dobesova Z, Pausova Z, Deng AY, Sun Y, Jacob HJ, Hamet P. Resolving the composite trait of hypertension into its pharmacogenetic determinants by acute pharmacological modulation of blood pressure regulatory systems. *J. Mol. Med.* 81:51-60, 2003.

Figure 1. Mapping of two opposing BP QTL on Dahl rat Chr 3. The linkage map is essentially the same as published previously (8), which is based on an $F_2(S \times LEW)$ population. Numbers to the right of the map are units in cM, and to the left of the map are units in centiRays (cR) between markers. Solid bars under congenic strains symbolize the S chromosome fragments that have been replaced by that of the LEW rat. The entire region indicated by solid bars and junctions between the solid and open bars are homozygous LL on the map for all the markers listed in the corresponding positions. Open bars on ends of solid bars indicate the ambiguities of crossover breakpoints between markers. Junctions between solid and open bars as well as ends of chromosome regions of interest in each strain are connected by dotted lines to the marker positions on the map. The physical map refers to the alignment of rat supercontigs in an ascending order from top to bottom on Chr 3 obtained by blasting a marker to the rat genome database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>). The name of a supercontig starts with NW_042 followed by three numbers. Digits to the left side of a contig in parenthesis indicate its approximate size in bps. Markers are anonymous (<http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public/>). Congenic strains are S.LEW-D3Rat52/D3Rat17 (S.L1), S.LEW-D3Rat52/D3Chm63 (S.L2), S.LEW-D3Rat52/D3Rat130 (S.L3), S.LEW-D3Chm64/D3Rat17 (S.L4) and S.LEW-D3Mco21/D3Rat17 (S.L5) respectively. MAPs averaged throughout the period of measurements in mmHg for the strains are as follows: S (175 ± 3), S.L1 (141 ± 4), S.L2 (146 ± 6), S.L3 (141 ± 4), S.L4 (195 ± 9), and S.L5 (166 ± 9). Average DAPs are as follows: S (150 ± 4), S.L1 (121 ± 5), S.L2 (128 ± 5), S.L3 (121 ± 4), S.L4 (167 ± 9), and S.L5 (140 ± 8). Average SAPs are as follows: S (203 ± 4), S.L1 (164 ± 4), S.L2 ($173 \pm$

8), S.L3 (167 ± 4), S.L4 (228 ± 8), and S.L5 (194 ± 9).

Figure 2. Comparisons in mean arterial (MAP), diastolic (DAP) and systolic (SAP) pressures between the S.L1, S.L2, S.L3, S.L4, S.L5 congenic strains, and the S strain. Each time point on the graph represents an average of 24-hour readings. S, the Dahl salt-sensitive strain. Each point on the 24-hour graph is an average of readings taken at every 4 hours. Error bars represent SEM. n, number of rats. For strain designations, see the legend for Figure 1.

Table 1. Chromosome markers used to make congenic strains.

Chromosome	Markers tested
1	D1Wox25 - D1Rat304 - D1Mco27 - Sa - D1Uia12 - D1Arb33 - D1Rat19 - D1Mco4
2	<i>Camk2d</i> - <i>Gca</i> - D2Rat302 - <i>Cpb</i> - D2Mco13 - D2Rat199 - D2Uia5
3	D3Rat107 - D3Rat17 - D3Rat24 - D3Rat66 - D3Wox3 - D3Rat52
	More markers are shown in Figure 1.
4	D4Mgh1 - D4Mgh16 - D4Uia1 - D4Mit17 - D4Uia4
5	D5Rat130 - D5Mit5 - D5Uia2 - D5Mco34 - D5Uia8 - D5Rat95 - D5Mco2 - <i>Ela2</i>
6	D6Rat105 - D6Mit1 - D6Mgh3
7	D7Mgh1 - D7Rat152 - D7Rat44 - D7Rat110 - D7Rat18 - D7Rat128 - D7Rat115
8	D8Mgh11 - D8Rat134 - D8Rat43 - D8Uia2 - D8Rat55
9	D9Rat64 - D9Uia9 - D9Wox23
10	D10Mco10 - D10Mco17 - D10Mgh6 - D10Wox6 - D10Rat120 - D2Rat141 - D10M11Mit58 - D10Mco15 - D10Rat11 - D10Mgh1
11	D11Rat50 - D11Mit1 - D11Uia1
12	D12Mit6 - D12Rat32 - D12Mit4
13	D13Mgh4 - D13Uia3 - D13Uia8
14	D14Wox10 - D14Uia2 - D14Uia1
15	D15Uia8 - D15Mgh2 - D15Rat126
16	D16Rat14 - D16Rat67 - D16Uia2 - D16Mit2
17	D17Wox7 - D17Mit5 - D17Mgh5 - <i>Agtr1a</i> - <i>Edn1</i>
18	D18Uia6 - D18Mit8 - D18Mco6 - D18Wox7
19	D19Rat82 - D19Rat25 - D19Rat57
20	D20Wox3 - D20Wox1 - D20Mgh1
X	DXUia2 - DXMco1 - DXRat93

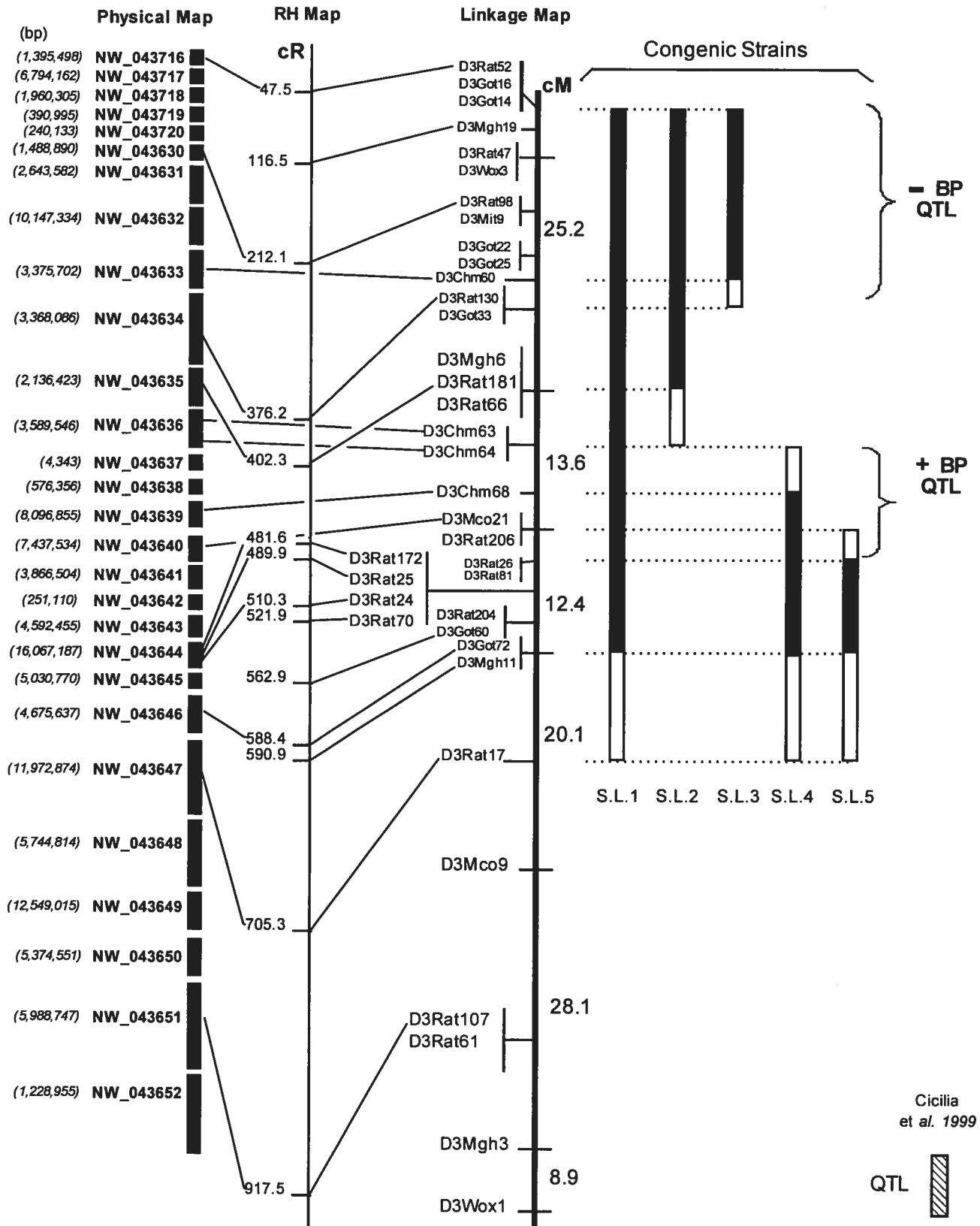
Footnotes for Table 1: All the markers are polymorphic between S and LEW strains. For designations of genes, see references 5, 7, 13, and 18. The rest of the markers are anonymous (8; <http://waldo.wi.mit.edu/rat/public/>).

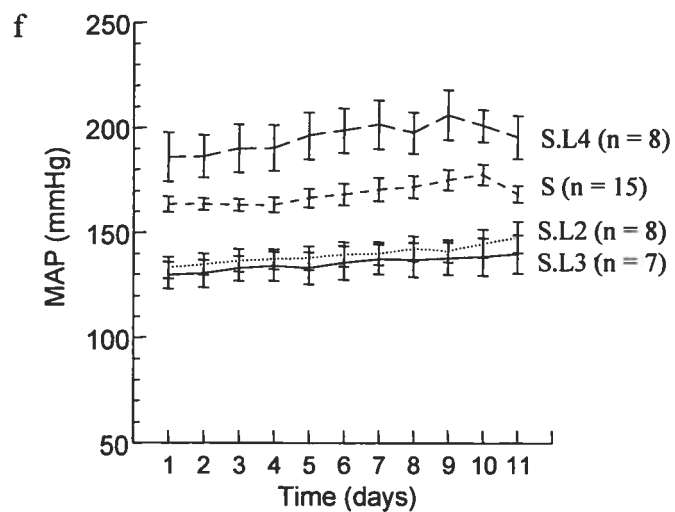
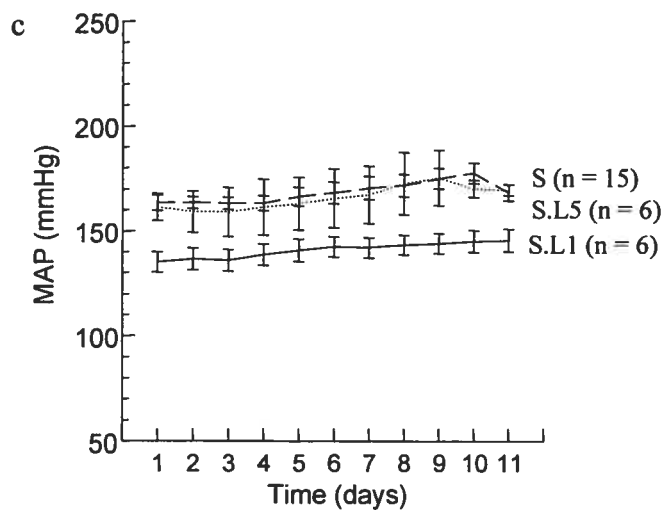
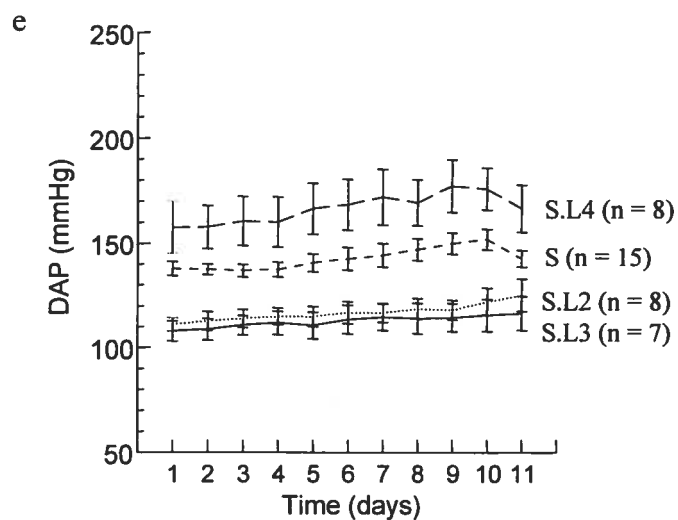
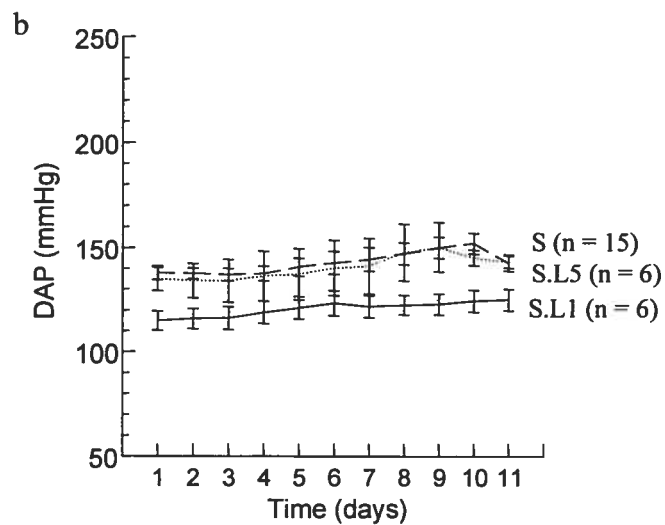
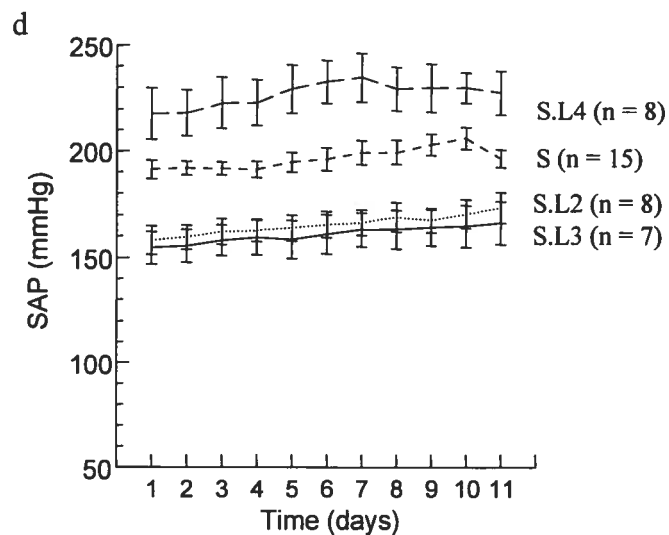
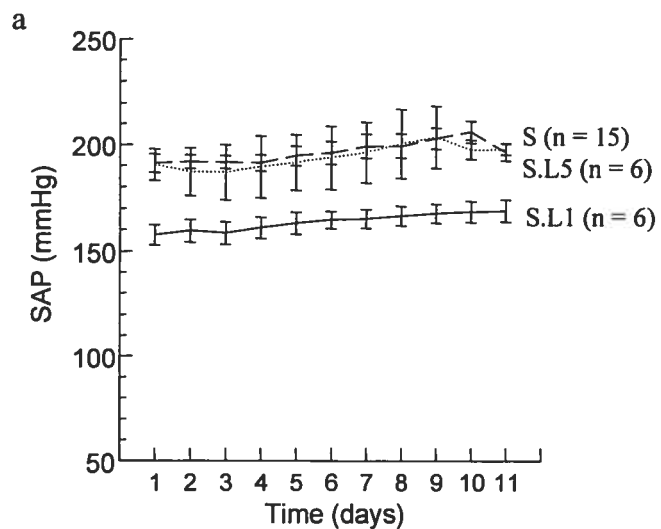
Table 2: New chromosome markers produced from supercontigs on rat Chr 3

Rat Marker	Super-Contig	Primer sequences (5' → 3')	Size (Bp)	Temp (°C)	Condition (P or A)	Polymorphism among rat strains
D3Chm2	NW_0437 11	cccattaccagtgagagca ccagatgccctcaagagag	218	50	A	S=L
D3Chm3	NW_0437 11	tgttgatgtatatgcacactgtt cgcacacatacacagagg	250	55	A	S=L
D3Chm6	NW_0437 14	gtaccatgggtacccccaaa tgctactgacgaggctcaga	191	60	A	S=L
D3Chm7	NW_0437 14	tggtcaaaattcacattgg gtgggcacgtcctagaaaaa	227	55	A	S=L
D3Chm8	NW_0436 31	ggaggtggacactgtgcttt tcctccagattgtcctc	230	45	A	S=L
D3Chm10	NW_0436 32	ggacaacagactcacctgaa gccaaagtctttoggtagcaa	214	55	A	S<L
D3Chm11	NW_0436 33	ctgtaagccagcccaatta tggagttcccaggaaaaga	227	50	A	S=L
D3Chm12	NW_0436 34	tcagttccagcacaggattg gccagatagccagaccat	151	50	A	S<L
D3Chm15	NW_0437 14	tccccaatccttactcc acggtgcctgalatgtgtg	223	60	A	S=L
D3Chm22	NW_0436 34	tggtggagagcatgacagag gcttcaaactgttgccttt	211	60	A	S<L
D3Chm25	NW_0436 33	atgtggtggccaaattgtt aaagccctctctggttcc	192	55	A	S=L
D3Chm26	NW_0436 36	tggaggtcagaggaccact cacagtagtcagcccact	165	60	A	S=L
D3Chm29	NW_0437 10	gggtgcctcttctcattt ctggtggcttactgctggt	214	55	A	S=L
D3Chm30	NW_0437 10	aagtcacctattgacatttgaa cctggttggttaagggtca	221	45	A	S=L
D3Chm32	NW_0437 10	tctggaatcaggtccaaagg cctgcttctgccttctgtc	232	55	A	S=L
D3Chm34	NW_0437 10	ggccagcaagaagataagg actcagtcggtgtctcctg	155	50	A	S=L
D3Chm36	NW_0437 10	ggtagctttgcatgtggtt cccaatactgggaagtgaaca	241	55	A	S=L
D3Chm37	NW_0437 10	gccccatcaaaattccagta tgtgtctgcttatcaggta	240	55	P	S=L
D3Chm39	NW_0437 10	tgctgagtcaggaattagga ccactcagagcacctctcc	233	60	P	S=L
D3Chm40	NW_0437 12	cccaattaccaatttgtgc cagctactggttccacaca	174	60	P	S=L

D3Chm41	NW_0437 12	ctcactggccaagcacctt attggggtaggggtgta	173	55	P	S=L
D3Chm42	NW_0437 12	atattcctgaccccgtctca ccccaaatccagctttcag	239	55	P	S=L
D3Chm43	NW_0437 12	tctctctctccctcctc tgacagctcacaggattg	173	60	P	S=L
D3Chm49	NW_0436 31	ggaaacaaatggtgtccaa ttgaacttccaggccagag	240	60	A	S>L
D3Chm50	NW_0436 32	gaggtgctgcctcataaaaga ccataaggttattaaggctactctctg	248	55	A	S=L
D3Chm51	NW_0436 32	gcctgactccacaatgttca gacttttctctggggctta	208	55	A	S=L
D3Chm54	NW_0436 32	actgttggcatttcctgacc gcaaggctgcataaaccaat	235	60	A	S=L
D3Chm55	NW_0436 32	agcactgaaccaaggtctgg ggtgtgggagaagcctgata	215	60	A	S=L
D3Chm57	NW_0436 33	agagaaaggcaagcattcca tcctccaggcagaaaagaaa	223	50	A	S<L
D3Chm58	NW_0436 33	aagtagataggttccccatcacc gcttggcctactcagcatct	296	60	A	S=L
D3Chm60	NW_0436 33	tgggaacctcaggaaaaga actcacgtaggcctcatgct	206	60	A	S>L
D3Chm61	NW_0436 33	tgcttgggtcacaaataaagg tggaaactaggctggaggaga	250	60	A	S>L
D3Chm62	NW_0436 36	gaggcctcctttcacacatt tgcatgtacacatttgattcct	211	60	A	S=L
D3Chm63	NW_0436 36	ccgggtactgagaaaaaca Ttgggagctgcatatgagaa	234	55	A	S<L
D3Chm64	NW_0436 36	tattcctcccctccctc cagcaaggttaaacctacct	228	55	A	S>L
D3Chm65	NW_0436 36	gagcagctgaggaagacacc tttcagagccatgaggatca	201	60	A	S<L
D3Chm66	NW_0436 38	ttaaatecccagatcccaca caggcagcctcttctgatct	231	55	A	S=L
D3Chm68	NW_0436 39	tgacattgtctcccacttc tgaccatgcacatataaat	250	50	A	S>L
D3Chm72	NW_0436 32	aatgcccacgtataaag cagccccgtctagagtatcg	220	60	A	S=L
D3Chm76	NW_0436 31	gtgggctgcttgattaaacc tctaactcaggggtgggaga	215	55	A	S>L
D3Chm78	NW_0436 32	ctccacatttgggctgagt agaagcctggctgatttga	234	60	A	S>L
D3Chm79	NW_0436 41	cctgaacagatcccatacagc cctttcacctccatgggta	240	60	A	S<L
D3Chm80	NW_0436 44	tcacagtcctagccctctt caggggatccaacactgtct	223	55	A	S<L

Footnote to Table 2: S, Dahl salt-sensitive strain; L, LEW strain; P, polyacrylamide; A, agarose; bp, base pairs; Positions of contigs are indicated in Figure 1. Supercontigs are those obtained from blasting an existing marker on the map to the rat genome database at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>.





Chapitre 9

Nouveaux Résultats

9.1 Nouvelle carte physique du chromosome 3

Depuis la publication de l'article présenté dans ce mémoire, une nouvelle version de la séquence génomique du rat a été publiée sur le site du NCBI. La grande différence entre la nouvelle et l'ancienne séquence vient dans son organisation: la carte génétique de notre région comprenait 28 contigs. Maintenant, le chromosome 3 est composé de 32 contigs dont 7 contigs couvrent notre région d'intérêt (Figure 11). Les petits fragments de la version précédente de la séquence génomique ont été regroupés ce qui améliore la qualité de la séquence génomique: il y a moins de blancs dans la séquence et les distances sont plus précises.

Avec la nouvelle séquence, nous pouvons calculer la taille des deux QTL. Ceci est fait en alignant la séquence des marqueurs qui délimitent les régions à QTL. Dans le cas du -BP QTL, la région est délimitée par les marqueurs D3Rat52 et D3Rat130. Dans le cas du +BP QTL, la région est délimitée par D3Rat66 et D3Rat26. La région du -BP QTL est de 15.2 Mbp alors que la région du +BP QTL est de 29.7 Mbp.

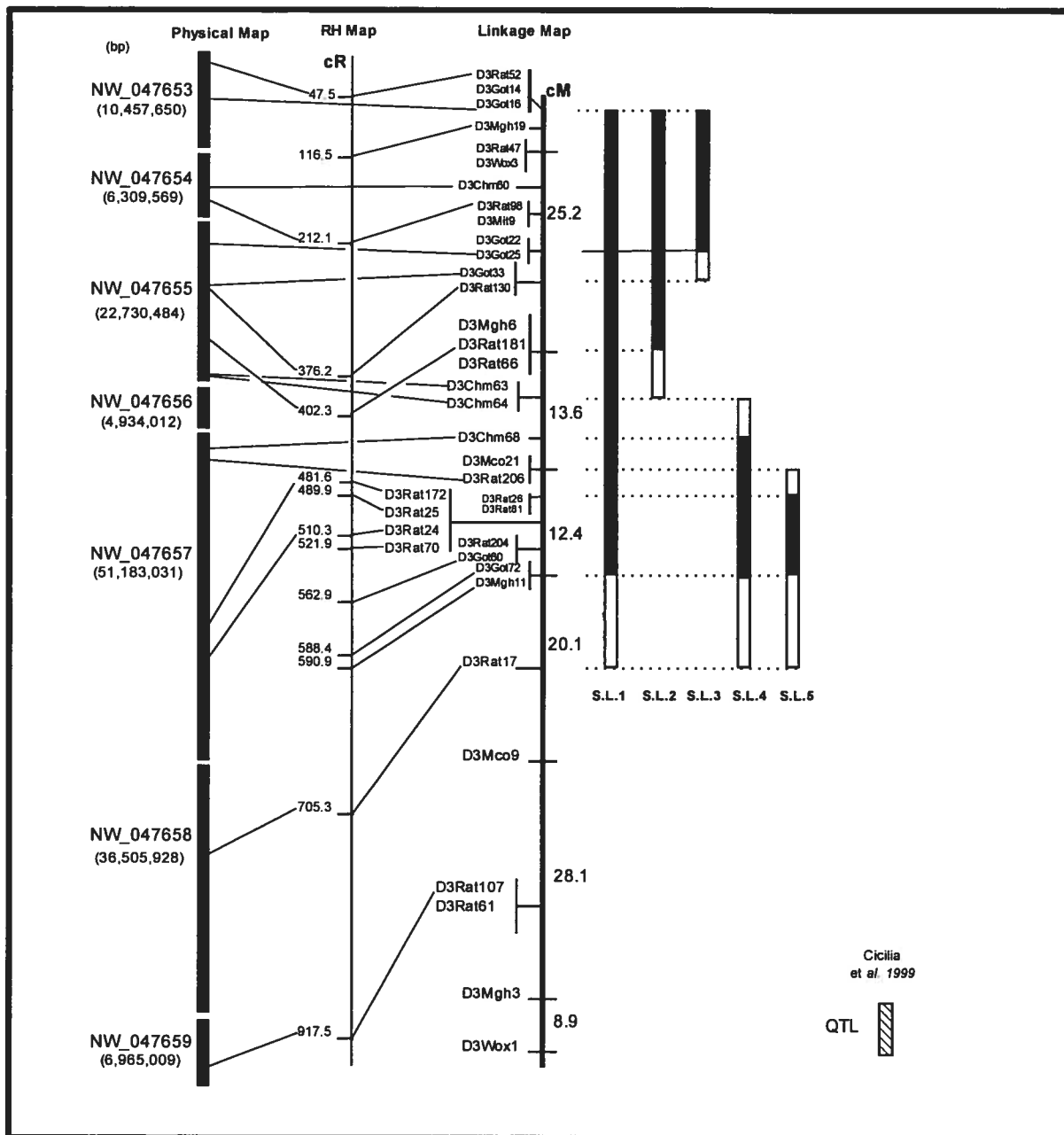


Figure 11- Nouvelle version de la carte génétique du chromosome 3. Cette nouvelle carte est basée sur la nouvelle version de la séquence génomique du rat, apparue sur le site de NCBI en octobre 2003.

9.2 Gènes candidats du –BP QTL et du +BP QTL

Le site NCBI offre aussi la liste de gènes. Dans cette banque de donnée, il y a des gènes connus, des gènes prouvés par des études, et des gènes prédits, sous le nom de LOC, par le programme *ENSEMBL* (44). Puisque la séquence génomique du rat est récente et que la grande majorité de la recherche en génétique est réalisée sur la souris, un très grand nombre de gènes sont prédits. Dans l'Annexe A, la liste des gènes se trouvant dans la région du –BP QTL est présentée sous forme de tableau. Il est évident qu'une région de 15.2 Mbp comprend beaucoup de gènes. Ceci démontre l'importance des sous-lignées congéniques pour réduire la région à QTL. Il en va de même pour la région du +BP QTL, une région de 29.7 Mbp, qui comprend plus de 400 gènes qui sont présentés sous forme de tableau dans l'Annexe B. Une carte d'homologie pour nos régions d'intérêts dans le chromosome 3 du rat, –BP QTL et +BP QTL est présentée en Annexe C. La carte représente les gènes connus présents dans les régions homologues du rat, de la souris et de l'humain. Puisque les séquences de la souris et de l'homme étaient disponibles avant la séquence du rat, le nombre de gènes connus chez ces deux espèces est supérieur à celui du le rat.

Dans la région du –BP QTL, on retrouve le gène *Kynureninase* (Kynu) qui diminue la PA lorsqu'il est injecté dans le RVLM du rat SHR, où RVLM joue un rôle dans la régulation de la PA (70). Dans une étude de liaison génétique de la population F2 obtenue par un croisement des rats SHR et WKY, il y a coségrégation entre la PA et le polymorphisme du gène Kynu (70).

Un autre gène candidat possible, en regardant la liste de gènes connus, serait le gène *Ptgs1*. Sous réponse de certains stimuli, il y a sécrétion des catécholamines à la suite de quoi la rénine est sécrétée par les néphrons juxtamédullaires du rein. La rénine stimule la production de l'angiotensine II qui augmente la PA, la réabsorption de sodium et la vasoconstriction. En raison de cette circulation sanguine élevée dans la médulla rénale, il y a sécrétion des prostaglandine (71).

Dans le cas du +BP QTL, il y a un gène candidat très intéressant : *Angiotensin receptor-like 1* (Agtr11). L'angiotensine est reconnue pour son rôle dans la régulation de la PA (Figure 1). De plus, les gènes *Sodium channel, voltage-gated, type 1, alpha polypeptide* (Scn1a), *Sodium channel, voltage-gated, type 6, alpha polypeptide* (Scn9a) et *Sodium channel, voltage-gated, type 9, alpha polypeptide* (Scn6a) sont également présents dans cette région.

Chapitre 10

Étude par micro-puces d'ADN

10.1 Généralités des micro-puces d'ADN

Les avancements technologiques ont une forte influence sur la recherche en biologie moléculaire. Une de ces nouvelles technologies est le profil d'expression de gènes. Ceci est fait par des micro-puces d'ADN. Ces derniers permettent d'observer le niveau d'expression des gènes afin de découvrir les gènes candidats dont le niveau d'expression est altéré.

Cette nouvelle technologie très prometteuse présente des problèmes d'analyse des résultats : il y a un grand nombre de faux positifs et de faux négatifs (33). Les différents outils d'analyse statistique disponibles affectent l'interprétation des résultats et la détermination de leur significativité (72).

Depuis la sortie des micro-puces d'ADN, il y a eu beaucoup d'applications de cette technologie qui a permis de créer des règles de bases pour minimaliser les problèmes d'analyse des résultats. Lorsqu'on compare deux lignées aux traits contrastants pour identifier les gènes candidats qui sont à la base de cette variabilité du trait, une très grande liste de candidats est obtenue (78). Pour réduire cette liste de gènes candidats et pour être plus efficace dans son organisation de temps, on combine les études de micro-puces d'ADN avec une autre méthodologie (30 ;33). Les lignées congéniques sont un bon exemple : seulement les gènes qui tombent dans les régions à QTL qui sont prouvées par les lignées congéniques vont être considéré en tant que candidat (30 ;33).

Dans la littérature scientifique, il y a plusieurs exemples de ce type d'application (73-76). Un très bon exemple de la combinaison des méthodes de lignées congéniques et de micro-puces d'ADN est donné par l'équipe de Dominiczak (75). Les micro-puces

d'ADN ont montré que le gène *Gstm2* est un candidat. Ce gène se positionne dans un des congéniques du chromosome 2 du rat qui a été montré d'avoir un effet sur la PA. Pour confirmer ce résultat obtenu par micro-puces d'ADN, ils ont fait un RT-PCR. Ce dernier a confirmé la différence d'expression du gène entre les deux lignées, WKY et SHRSP (75).

10.2 Notre étude de micro-puces d'ADN

Notre laboratoire a réalisé une étude de micro-puces d'ADN où les lignées S et Lew ont été comparées. L'expérience a été faite par le *Genome Center* de Montréal où les puces *Affimetrix* pour le rat (série U34, chip A, B et C) ont été utilisées.(73) Dans le but d'identifier les gènes qui causent l'hypertension dans notre modèle d'étude, ARN utilisé provient des reins de rats mâles âgés de cinq semaines (73).

10.2.1 Gène candidat

Parmi les gènes candidats obtenus par l'expérience d'expression, le gène F2 est considéré un bon candidat d'après la différence d'expression entre les lignées S et Lew prédit par les micro-puces (Tableau 4). D'après notre carte génétique, ce gène se trouve sur le chromosome 3 dans la région du +BP QTL.

Tableau 4- Résultats pour F2 de micro-puces d'ADN

Expression S vs Lew	Symbole du gène	Nom du Gène	Étiquette Unigene
-3.12	F2	<i>coagulation factor II</i>	Rn.54498

10.2.2 Génotypage du gène candidat

Avant de confirmer ce résultat de micro-puces d'ADN par des expériences de RT-PCR, il est important de positionner ce gène sur la carte génétique et de vérifier qu'il se trouve dans la région du +BP QTL. Pour cela, on utilise la séquence du gène rapporté sur le site de NCBI (Voir Annexe D pour la séquence).

Pour positionner le gène sur la carte, on recherche des microsatellites dans la séquence (les microsatellites de la séquence sont mis en gras dans l'Annexe D). Une fois qu'un microsatellite de bonne qualité est trouvé, à l'aide du programme *Primer3 Output* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>), les oligonucléotides nécessaires pour la réaction de PCR sont trouvés et ensuite commandés chez notre fournisseur. Une fois le marqueur est obtenu, ce dernier est génotypé sur les lignées congéniques du chromosome 3 pour pouvoir le positionner sur la carte génétique.

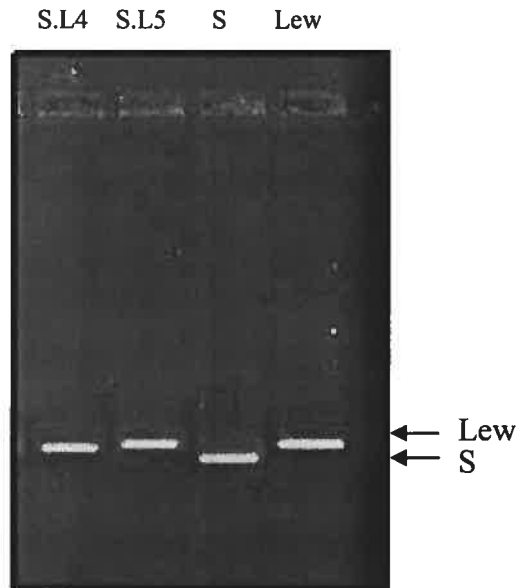


Figure 12- Photo du gel agarose 4% sur lequel le marqueur pour le gène F2 a migré. Le marqueur a été génotypé sur les lignées S.L4 et S.L5. Ces deux lignées sont homozygotes pour Lew.

D'après les résultats du génotypage (Figure 12), le gène F2 ne se trouve pas dans la région du +BP QTL, ainsi annulant ce gène comme candidat : le marqueur est homozygote pour Lew pour les deux lignées S.L4 et S.L5. Nous avons démontré que la lignée S.L5 n'a pas d'effet sur la PA. Puisque ce gène se trouve dans la lignée S.L5, ce gène est annulé en tant que candidat. Avec ce résultat, nous avons réduit la région du +BP QTL de moitié.

Discussion

Chapitre 11

Discussion

L'hypertension est une maladie complexe où les facteurs génétiques et environnementaux contribuent à la variation de la PA. Il y a deux formes de cette maladie : monogénique et essentielle. L'identification des gènes causatifs de l'hypertension permettra une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la maladie, ainsi qu'un meilleur traitement. Cependant, la forme essentielle est multigénique, rendant ainsi sa dissection génétique difficile. L'utilisation des modèles animaux facilite cette tâche.

Il a été suggéré qu'une région du chromosome 3 chez le rat est liée à l'hypertension essentielle. Nous voulions vérifier cette hypothèse en recherchant la présence d'un ou plusieurs QTL dans cette région, et dans le cas de plusieurs QTL, déterminer leur interaction. En ayant établie une carte chromosomique détaillée, nous avons pu fabriquer des lignées de rats congéniques. Ces dernières nous ont permis de démontrer que la région considérée a un impacte significatif sur la PA causé par deux QTL ayant une interaction épistatique.

La dissection génétique chez l'homme est difficile dû à l'hétérogénéité du génome. Le rat offre l'avantage d'un génome homogène et de la possibilité de contrôler les facteurs environnementaux. Cependant, toute méthode a ses limites. Plusieurs groupes ont émis des résultats sur les résultats obtenus chez le rat car ils n'ont pas été encore reproduits chez l'homme (14 ;50). Cette difficulté de corréler les résultats obtenus chez l'homme et l'animal est essentiellement due à un manque d'information sur la séquence des gènes étudiés. La publication récente de la séquence génomique du rat (44) nous donne maintenant la possibilité de vérifier l'homologie d'un gène et de situer les régions homologues chez le rat. L'analyse des séquences nous a permis de réaliser une carte d'homologie pour le rat, la souris et l'homme. La région du -BP QTL est homologue à un segment du chromosome 2 de la souris et à des segments des chromosomes 9 et 2 de

l'homme. La région du +BP QTL est aussi homologue à un segment du chromosome 2 de la souris, alors que chez l'homme, elle est homologue à des segments des chromosomes 2, 11 et 20. Puisque des groupes de gènes sont transmis en bloc à travers l'évolution, une analyse d'homologie entre le rat et l'homme nous permet aussi d'identifier des gènes chez l'homme qui ne sont pas présent chez le rat, mais qui peuvent tenir un rôle important dans l'hypertension.

Nous avons démontrés la puissance des lignées congéniques dans la recherche des facteurs génétiques pour l'hypertension essentielle en démarquant deux QTL aux effets opposés pour la PA sur le chromosome 3. La lignée S est enrichie en allèles qui augmentent la PA, alors que la lignée Lew est une lignée normotensive. Une lignée normotensive ne signifie pas l'exclusion des allèles qui augmentent la PA, indiqué par la présence du +BP QTL. Le -BP QTL, délimité par les marqueurs D3Rat52 et D3Rat130, est épistatique au +BP QTL, délimité par les marqueurs D3Chm63 et D3Rat206. Cependant, pour prouver ceci, une autre lignée congénique doit être fabriquée pour exclure la possibilité de la présence d'autres QTL dans la région intermédiaire des deux QTL. Cette lignée congénique serait délimitée par les marqueurs D3Rat130 et D3Chm63 (cette région est présentement couverte par S.L1). Cependant, la possibilité d'interaction entre les deux QTL et le fond génomique S ne peut être exclue avec la méthodologie des lignées congéniques, indiquant ainsi la limite de cette méthodologie.

L'identification des gènes candidats est grandement facilitée par l'application d'une analyse par micro-puce d'ADN. Ce type d'analyse génère une grande liste de gènes candidats. En se limitant aux gènes compris dans les régions à QTL pour la PA, nous réduisons la liste de candidats. Le gène F2 a une différence d'expression significative entre la S.L1 et la lignée parentale S. Cependant, nous avons dû éliminer ce gène de notre liste puisqu'il ne se situe pas dans nos régions d'intérêt. Ce fait positif est un exemple des limites des micro-puces d'ADN. Pour réduire le nombre de faux positifs et de faux-négatifs, des duplicats des échantillons doivent être faits. Le choix du tissu pour l'extraction d'ARN est aussi un sujet de débat (32 ;33). Pour les expériences d'expression, nous utilisons généralement le rein comme source d'ARN. Le rein n'est pas

un tissu homogène ce qui en soi peut être la cause des problèmes rencontrés lors de l'analyse des résultats. Cependant, il est considéré d'être le centre de régulation de la PA (32). Pour obtenir des résultats significatifs, il est conseillé d'utiliser des rats plus âgés puisque ceux-ci montrent une forte hypertension. Cependant, l'hypertension observée peut être en partie une résultante de l'âge du rat. L'utilisation des jeunes rats contourne ce problème : l'hypertension observée à un jeune âge peut être limitée en grande partie à la génétique.

Notre travail a permis de localiser deux nouveaux QTL pour la PA sur le chromosome 3 du rat S. Nos deux QTL se trouvent à l'extrémité opposée du QTL localisé par l'équipe de Rapp (69). Nous avons aussi déterminé une interaction épistatique entre nos deux QTL, où le -BP QTL est épistatique au +BP QTL. À ce jour, seulement quatre autres exemples de cette interaction entre QTL pour la PA ont été rapportée (29 ;77-79).

Pour pouvoir bien caractériser nos lignées congéniques, une carte dense en marqueurs doit être utilisée. Puisque les marqueurs dans notre région d'intérêt étaient très distancés, nous avons localisé des nouveaux marqueurs. La liste et les séquences des oligos fabriqués sont publiées dans l'article. Ces marqueurs donnent la possibilité aux autres chercheurs de compléter leur carte chromosomique.

Conclusion

Chapitre 12

Perspectives et conclusion

Une grande partie de mon travail dans le laboratoire consistait à fabriquer une carte génétique dense en marqueurs pour le chromosome 3. Ceci a été fait en intégrant les cartes disponibles sur les sites d'Internet, en fabriquant des nouveaux marqueurs à partir de la séquence génomique disponible et en positionnant ceux-ci sur les lignées congéniques.

Une bonne carte génétique permet une meilleure caractérisation des lignées et sous-lignées congéniques. Ceci permet une meilleure détection des recombinaisons lors des croisements. Les rats présentant des recombinaisons intéressantes sont utilisés pour créer les sous-lignées congéniques. Cette étape devient primordiale lorsque les régions à QTL sont courtes.

Une autre partie de mon travail consistait à génotyper les rats à chaque semaine. Le génotypage a été fait par PCR en utilisant les marqueurs polymorphiques positionnés sur les cartes. Le génotypage des rats est très important et demande beaucoup de précision.

Étant donné le très grand nombre de gènes candidats dans chaque région à QTL, la prochaine étape sera de réduire ces régions à QTL. Ceci sera accompli par la création d'une nouvelle sous-lignée congénique. La télémétrie identifiera les lignées positives et les lignées négatives, ainsi réduisant les régions à QTL. Une fois la région réduite à 1 cM, le clonage positionnel pourra être entamé.

L'application des outils informatiques dans ce projet joue un grand rôle. Avec l'avancement de la technologie ainsi que la disponibilité des séquences génomiques, de plus en plus d'outils sont disponibles. Ces derniers facilitent grandement le travail de cartographie, une étape primordiale dans ce type de recherche.

Annexe A

Gènes candidats de la région –BP QTL

Gène	Nom du gène
C5	<i>homeo box C5</i>
LOC311884	gène prédit
LOC311885	gène prédit
LOC311886	gène prédit
Rab14	<i>GTPase Rab14</i>
LOC311887	gène prédit
LOC296654	gène prédit
LOC296655	gène prédit
LOC296656	gène prédit
LOC296657	gène prédit
LOC311888	gène prédit
Ggta1	<i>glycoprotein galactosyltransferase alpha 1, 3</i>
LOC311889	gène prédit
LOC311890	gène prédit
LOC311891	gène prédit
LOC311892	gène prédit
DIP1/2	<i>Dorsal interacting protein 1</i>
LOC311893	gène prédit
LOC311894	gène prédit
LOC311895	gène prédit
LOC311896	gène prédit
LOC311897	gène prédit
LOC311898	gène prédit
LOC311899	gène prédit
LOC296658	gène prédit
LOC311900	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC296684	gène prédit
LOC296685	gène prédit
LOC296686	gène prédit
LOC296687	gène prédit
LOC296688	gène prédit
LOC296689	gène prédit
LOC296690	gène prédit
LOC296691	gène prédit
LOC296692	gène prédit
LOC296693	gène prédit
LOC296694	gène prédit
LOC296695	gène prédit
LOC296696	gène prédit
LOC296697	gène prédit
LOC296698	gène prédit
LOC296699	gène prédit
LOC311905	gène prédit
LOC311906	gène prédit
LOC311907	gène prédit
LOC311908	gène prédit
LOC296700	gène prédit
LOC296701	gène prédit
Pdcl	<i>phosducin-like protein</i>
LOC296702	gène prédit
LOC311909	gène prédit
LOC311910	gène prédit
LOC311911	gène prédit
LOC296703	gène prédit
Spnr	<i>double-stranded RNA-binding protein p74</i>
LOC311912	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC311926	gène prédit
LOC296717	gène prédit
LOC311927	gène prédit
LOC296718	gène prédit
LOC311928	gène prédit
LOC296719	gène prédit
LOC311929	gène prédit
LOC296720	gène prédit
LOC311930	gène prédit
LOC296721	gène prédit
Kynu	<i>kynureninase (L-kynurenine hydrolase)</i>
LOC311931	gène prédit
LOC311932	gène prédit
LOC311933	gène prédit
LOC296722	gène prédit
LOC311934	gène prédit
LOC296723	gène prédit
LOC296724	gène prédit
LOC311016	gène prédit
LOC295588	gène prédit
LOC311017	gène prédit
LOC295589	gène prédit
LOC311018	gène prédit
LOC295590	gène prédit
LOC311019	gène prédit
LOC311020	gène prédit
LOC311021	gène prédit
LOC311022	gène prédit
LOC311023	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC311034	gène prédit
LOC295609	gène prédit
LOC295610	gène prédit
LOC295611	gène prédit
LOC311035	gène prédit
LOC311036	gène prédit
LOC295612	gène prédit
LOC311037	gène prédit
LOC311038	gène prédit
LOC311039	gène prédit
LOC295613	gène prédit
LOC295614	gène prédit
LOC311040	gène prédit
Kcnj3	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3</i>
LOC295615	gène prédit
LOC311041	gène prédit
LOC295616	gène prédit
LOC311042	gène prédit
LOC295617	gène prédit
LOC311043	gène prédit
LOC311044	gène prédit
Nr4a2	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2</i>
LOC311045	gène prédit
Gpd2	<i>glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2</i>
LOC311046	gène prédit
LOC295618	gène prédit
Galnt5	<i>UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase T5</i>
LOC295619	gène prédit
LOC311047	gène prédit
LOC311048	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gene
LOC311065	gène prédit
LOC311066	gène prédit
LOC311067	gène prédit
LOC295634	gène prédit
LOC311068	gène prédit
LOC295635	gène prédit
LOC295636	gène prédit
LOC295637	gène prédit
LOC295638	gène prédit
LOC311069	gène prédit
LOC311070	gène prédit
LOC311071	gène prédit
LOC295639	gène prédit
LOC311072	gène prédit
LOC311073	gène prédit
LOC311074	gène prédit
Alk7	<i>activin receptor-like kinase 7</i>
LOC311029	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gene
LOC311901	gène prédit
LOC311902	gène prédit
LOC311903	gène prédit
LOC311904	gène prédit
Ptgs1	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>
LOC296659	gène prédit
LOC296660	gène prédit
LOC296661	gène prédit
LOC296662	gène prédit
LOC296663	gène prédit
LOC296664	gène prédit
LOC296665	gène prédit
LOC296666	gène prédit
LOC296672	gène prédit
LOC296673	gène prédit
LOC296674	gène prédit
LOC296675	gène prédit
LOC296676	gène prédit
Gust43	<i>gustatory receptor 43</i>
LOC296677	gène prédit
LOC296678	gène prédit
LOC296679	gène prédit
LOC296680	gène prédit
LOC296681	gène prédit
LOC296682	gène prédit
LOC296683	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC296704	gène prédit
LOC311913	gène prédit
LOC311914	gène prédit
LOC296705	gène prédit
LOC311915	gène prédit
LOC296706	gène prédit
LOC311916	gène prédit
LOC311917	gène prédit
Psmb7	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7</i>
LOC311918	gène prédit
Rps20	<i>ribosomal protein S20</i>
LOC296707	gène prédit
Nr5a1	<i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i>
LOC296708	gène prédit
LOC296709	gène prédit
LOC296710	gène prédit
LOC311919	gène prédit
LOC311920	gène prédit
LOC311921	gène prédit
LOC296711	gène prédit
LOC311922	gène prédit
LOC171121	gène prédit
LOC296712	gène prédit
LOC296713	gène prédit
LOC296714	gène prédit
LOC311923	gène prédit
LOC311924	gène prédit
LOC311925	gène prédit
LOC296715	gène prédit
LOC296716	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC311024	gène prédit
LOC295591	gène prédit
LOC311025	gène prédit
LOC311026	gène prédit
LOC295592	gène prédit
LOC295593	gène prédit
LOC295594	gène prédit
LOC295595	gène prédit
LOC311027	gène prédit
LOC295596	gène prédit
<i>Acvr2</i>	<i>activin receptor IIA</i>
LOC295597	gène prédit
LOC311028	gène prédit
LOC295598	gène prédit
LOC295599	gène prédit
LOC295600	gène prédit
LOC295601	gène prédit
LOC295602	gène prédit
<i>Arl5</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 5</i>
LOC295603	gène prédit
LOC311030	gène prédit
LOC295604	gène prédit
LOC311031	gène prédit
LOC311032	gène prédit
LOC295605	gène prédit
LOC295606	gène prédit
LOC311033	gène prédit
LOC295607	gène prédit
LOC295608	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
Acvr1	<i>activin type I receptor</i>
LOC311049	gène prédit
LOC311050	gène prédit
LOC295620	gène prédit
LOC295621	gène prédit
LOC295622	gène prédit
LOC295623	gène prédit
LOC311051	gène prédit
LOC295624	gène prédit
LOC295625	gène prédit
LOC311052	gène prédit
LOC311053	gène prédit
LOC295626	gène prédit
LOC311054	gène prédit
LOC311055	gène prédit
LOC295627	gène prédit
LOC295628	gène prédit
LOC311056	gène prédit
LOC311057	gène prédit
LOC311058	gène prédit
LOC311059	gène prédit
LOC295629	gène prédit
LOC311060	gène prédit
LOC295630	gène prédit
LOC295631	gène prédit
LOC311061	gène prédit
LOC295632	gène prédit
LOC311062	gène prédit
LOC311063	gène prédit
LOC295633	gène prédit

Gènes candidats de la région –BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC311075	gène prédit
LOC311076	gène prédit
LOC295640	gène prédit
LOC311077	gène prédit
LOC295641	gène prédit
LOC295642	gène prédit
LOC295643	gène prédit
LOC295644	gène prédit
LOC311078	gène prédit
LOC311079	gène prédit
LOC311080	gène prédit
LOC295645	gène prédit
Dpp4	<i>dipeptidylpeptidase 4</i>
LOC311081	gène prédit
Gcg	<i>glucagon</i>
Fap	<i>fibroblast activation protein</i>
LOC311082	gène prédit
LOC311064	gène prédit

Annexe B

Gènes candidats de la région +BP QTL

Gène	Nom du gene
LOC366061	gène prédit
LOC295654	gène prédit
Scn1a	<i>sodium channel, voltage-gated, type 1, alpha polypeptide</i>
Scn9a	<i>sodium channel, voltage-gated, type 9, alpha polypeptide</i>
LOC366062	gène prédit
Scn6a	<i>sodium channel, voltage-gated, type 6, alpha polypeptide</i>
LOC366063	gène prédit
LOC311098	gène prédit
LOC366064	gène prédit
Stk39	<i>serine threonine kinase 39</i>
LOC311105	gène prédit
LOC311106	gène prédit
LOC295660	gène prédit
LOC366065	gène prédit
LOC366066	gène prédit
LOC366067	gène prédit
LOC366068	gène prédit
LOC311111	gène prédit
LOC295661	gène prédit
Rdhl	<i>retinol dehydrogenase homolog</i>
LOC360363	gène prédit
LOC362142	gène prédit
Sarcosin	<i>sarcomeric muscle protein</i>
LOC311112	gène prédit
LOC360364	gène prédit
LOC311113	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gene
LOC295663	gène prédit
LOC311114	gène prédit
Ssb	<i>Sjogren syndrome antigen B</i>
LOC362143	gène prédit
LOC362144	gène prédit
LOC311115	gène prédit
LOC295666	gène prédit
LOC366069	gène prédit
LOC366070	gène prédit
LOC296510	gène prédit
Gad1	<i>Glutamate decarboxylase 1</i>
LOC360365	gène prédit
LOC311118	gène prédit
LOC366071	gène prédit
LOC311120	gène prédit
LOC295668	gène prédit
LOC295669	gène prédit
LOC311121	gène prédit
Dnci2	<i>dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 2</i>
LOC311122	gène prédit
LOC362145	gène prédit
LOC296502	gène prédit
LOC366072	gène prédit
LOC296501	gène prédit
LOC311748	gène prédit
LOC362146	gène prédit
LOC296500	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC296499	gène prédit
Itga6	<i>integrin, alpha 6</i>
Pdk1	<i>pyruvate dehydrogenase kinase 1</i>
LOC362147	gène prédit
LOC296497	gène prédit
LOC311743	gène prédit
LOC311742	gène prédit
LOC362148	gène prédit
LOC366073	gène prédit
LOC366074	gène prédit
LOC366075	gène prédit
LOC366076	gène prédit
LOC311738	gène prédit
LOC296488	gène prédit
LOC366077	gène prédit
LOC366078	gène prédit
LOC362149	gène prédit
LOC311731	gène prédit
LOC311730	gène prédit
Waspip	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein</i>
Chrna1	<i>cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1</i>
LOC366079	gène prédit
Chn1	<i>chimerin (chimaerin) 1</i>
LOC362150	gène prédit
LOC288159	gène prédit
Atf2	<i>RATF2</i>
Atp5g3	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c, isoform 3</i>

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC366080	gène prédit
LOC366081	gène prédit
LOC362151	gène prédit
LOC288155	gène prédit
LOC288154	gène prédit
LOC366082	gène prédit
LOC303991	gène prédit
LOC366083	gène prédit
LOC288153	gène prédit
LOC288152	gène prédit
LOC288151	gène prédit
LOC288150	gène prédit
LOC366084	gène prédit
LOC362152	gène prédit
Nfe2l2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
LOC311123	gène prédit
LOC295671	gène prédit
Pde11a	<i>phosphodiesterase 11A</i>
Cyct	<i>cytochrome c</i>
Drb1	<i>developmentally regulated RNA-binding protein 1</i>
LOC311129	gène prédit
LOC311130	gène prédit
LOC311131	gène prédit
LOC295672	gène prédit
LOC295674	gène prédit
Ttn	<i>titin</i>
LOC311134	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC295678	gène prédit
LOC311137	gène prédit
LOC295680	gène prédit
LOC362153	gène prédit
LOC295681	gène prédit
LOC366085	gène prédit
LOC366086	gène prédit
LOC366087	gène prédit
LOC366088	gène prédit
LOC366089	gène prédit
LOC295686	gène prédit
Itga4	<i>Integrin, alpha 4</i>
LOC366090	gène prédit
Neurod1	<i>neurogenic differentiation 1</i>
LOC311146	gène prédit
Pde1a	<i>phosphodiesterase 1A</i>
LOC295690	gène prédit
LOC311148	gène prédit
LOC295691	gène prédit
LOC311151	gène prédit
LOC295692	gène prédit
LOC295695	gène prédit
LOC295698	gène prédit
LOC366091	gène prédit
LOC366092	gène prédit
LOC362154	gène prédit
LOC296456	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC366093	gène prédit
LOC296455	gène prédit
LOC366094	gène prédit
LOC366095	gène prédit
LOC366096	gène prédit
Calcr1	<i>calcitonin receptor-like</i>
Tfpi	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
LOC311163	gène prédit
LOC362155	gène prédit
LOC295701	gène prédit
LOC311165	gène prédit
LOC362156	gène prédit
LOC362157	gène prédit
LOC311166	gène prédit
LOC295703	gène prédit
LOC295704	gène prédit
LOC311167	gène prédit
Timm10	<i>small zinc finger-like protein</i>
LOC311168	gène prédit
Ngrh1	<i>Nogo-66 receptor homolog 1</i>
LOC311170	gène prédit
LOC366097	gène prédit
Prg2	<i>proteoglycan 2</i>
LOC295706	gène prédit
LOC360366	gène prédit
Ssrp1	<i>Structure specific recognition protein 1</i>
LOC362158	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC295707	gène prédit
Agtrl1	<i>angiotensin receptor-like 1</i>
LOC311171	gène prédit
LOC295710	gène prédit
LOC366098	gène prédit
LOC295711	gène prédit
LOC295712	gène prédit
LOC295713	gène prédit
LOC295714	gène prédit
LOC295715	gène prédit
LOC295719	gène prédit
LOC295720	gène prédit
LOC295721	gène prédit
LOC295723	gène prédit
LOC295724	gène prédit
LOC295725	gène prédit
LOC295727	gène prédit
LOC295728	gène prédit
LOC295729	gène prédit
LOC295730	gène prédit
LOC295732	gène prédit
LOC295734	gène prédit
LOC295735	gène prédit
LOC295736	gène prédit
LOC295737	gène prédit
LOC295739	gène prédit
LOC295741	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC295743	gène prédit
LOC295744	gène prédit
LOC295746	gène prédit
LOC295747	gène prédit
LOC295748	gène prédit
LOC366099	gène prédit
LOC295750	gène prédit
LOC295751	gène prédit
LOC295754	gène prédit
LOC295758	gène prédit
LOC295759	gène prédit
LOC295763	gène prédit
LOC362159	gène prédit
LOC295765	gène prédit
LOC295766	gène prédit
LOC295767	gène prédit
LOC295768	gène prédit
LOC295769	gène prédit
LOC295771	gène prédit
LOC295772	gène prédit
LOC295782	gène prédit
LOC366100	gène prédit
LOC295778	gène prédit
LOC366101	gène prédit
LOC295773	gène prédit
LOC295781	gène prédit
LOC295776	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC295786	gène prédit
LOC366102	gène prédit
LOC366103	gène prédit
LOC295790	gène prédit
LOC295792	gène prédit
LOC366104	gène prédit
LOC366105	gène prédit
LOC366106	gène prédit
LOC295795	gène prédit
LOC295797	gène prédit
LOC295798	gène prédit
LOC295799	gène prédit
LOC295801	gène prédit
LOC311173	gène prédit
LOC295806	gène prédit
LOC295808	gène prédit
LOC295810	gène prédit
LOC295811	gène prédit
LOC366107	gène prédit
LOC295813	gène prédit
LOC295814	gène prédit
LOC366108	gène prédit
LOC366109	gène prédit
LOC295822	gène prédit
LOC295824	gène prédit
LOC295827	gène prédit
LOC295828	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC311175	gène prédit
LOC295829	gène prédit
LOC295834	gène prédit
LOC295835	gène prédit
LOC295836	gène prédit
LOC295839	gène prédit
LOC295843	gène prédit
LOC295848	gène prédit
LOC295852	gène prédit
LOC295858	gène prédit
LOC295862	gène prédit
LOC295863	gène prédit
LOC295864	gène prédit
LOC295865	gène prédit
LOC295869	gène prédit
LOC295870	gène prédit
LOC295874	gène prédit
LOC295875	gène prédit
LOC295876	gène prédit
LOC295878	gène prédit
LOC295880	gène prédit
LOC295881	gène prédit
LOC295884	gène prédit
LOC295885	gène prédit
LOC366110	gène prédit
LOC295890	gène prédit
LOC295891	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC295892	gène prédit
LOC366111	gène prédit
LOC295896	gène prédit
LOC311179	gène prédit
LOC295900	gène prédit
LOC295902	gène prédit
LOC366112	gène prédit
LOC366113	gène prédit
LOC295907	gène prédit
LOC295910	gène prédit
LOC295912	gène prédit
LOC295914	gène prédit
LOC366114	gène prédit
LOC366115	gène prédit
LOC311180	gène prédit
LOC295917	gène prédit
LOC366116	gène prédit
LOC366117	gène prédit
LOC366118	gène prédit
LOC366119	gène prédit
LOC366120	gène prédit
LOC366121	gène prédit
LOC366122	gène prédit
LOC366123	gène prédit
Ptprj	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, J</i>
LOC311182	gène prédit
LOC311183	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC366124	gène prédit
LOC295922	gène prédit
LOC311184	gène prédit
LOC295923	gène prédit
LOC311185	gène prédit
Top2a	<i>topoisomerase (DNA) 2 alpha</i>
LOC366125	gène prédit
LOC362160	gène prédit
rapsyn	<i>receptor-associated protein of the synapse</i>
LOC362161	gène prédit
Psmc3	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3</i>
LOC295928	gène prédit
LOC366126	gène prédit
LOC295929	gène prédit
Madd	<i>MAP-kinase activating death domain</i>
Nr1h3	<i>nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3</i>
Acp2	<i>acid phosphatase 2</i>
LOC311186	gène prédit
LOC311187	gène prédit
LOC362162	gène prédit
LOC295930	gène prédit
LOC362163	gène prédit
Lrp4	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 4</i>
LOC311191	gène prédit
F2	<i>coagulation factor 2</i>
LOC311192	gène prédit
LOC311193	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
LOC362164	gène prédit
LOC311194	gène prédit
Nyw1	<i>ischemia related factor NYW-1</i>
LOC366127	gène prédit
LOC311198	gène prédit
Chrm4	<i>cholinergic receptor, muscarin 4</i>
Mdk	<i>midkine</i>
Dgkz	<i>diacylglycerol kinase zeta</i>
LOC362165	gène prédit
LOC362166	gène prédit
LOC311202	gène prédit
LOC311203	gène prédit
Mapk8ip	<i>mitogen activated protein kinase 8 interacting protein</i>
Cry2	<i>cryptochrome 2</i>
LOC311204	gène prédit
LOC295934	gène prédit
Syt13	<i>synaptotagmin 13</i>
LOC366128	gène prédit
LOC295936	gène prédit
LOC311209	gène prédit
LOC311210	gène prédit
LOC362167	gène prédit
Kai1	<i>kangai 1</i>
LOC296511	gène prédit
LOC311215	gène prédit
LOC362168	gène prédit
LOC311218	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

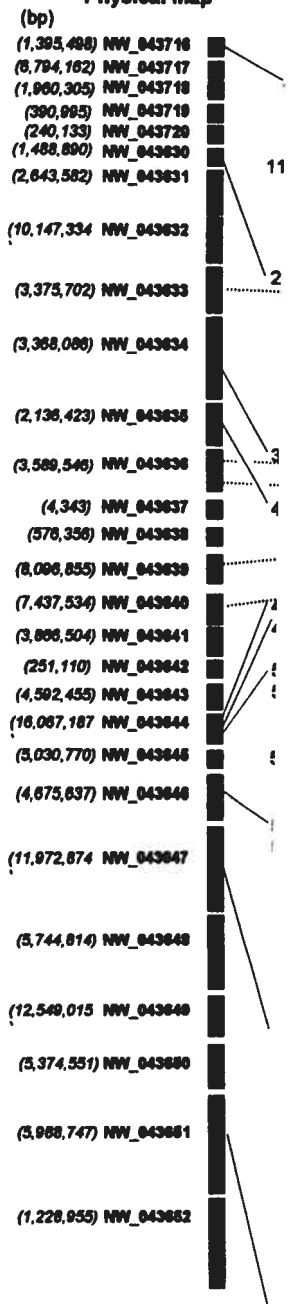
Gène	Nom du gène
LOC362169	gène prédit
LOC84013	gène prédit
LOC311224	gène prédit
LOC362170	gène prédit
LOC366129	gène prédit
LOC295941	gène prédit
LOC366130	gène prédit
LOC311236	gène prédit
LOC366131	gène prédit
LOC366132	gène prédit
LOC366133	gène prédit
LOC366134	gène prédit
LOC366135	gène prédit
LOC311241	gène prédit
LOC366136	gène prédit
LOC366137	gène prédit
LOC295952	gène prédit
LOC295953	gène prédit
LOC295954	gène prédit
LOC311245	gène prédit
LOC362171	gène prédit
LOC295956	gène prédit
LOC366138	gène prédit
LOC362172	gène prédit
LOC366139	gène prédit
LOC366140	gène prédit
LOC311252	gène prédit

Gènes candidats de la région +BP QTL (suite)

Gène	Nom du gène
Slc1a2	<i>solute carrier family 1, member 2</i>
Cd44	<i>CD44 antigen</i>
LOC366141	gène prédit
LOC311254	gène prédit
LOC295961	gène prédit
LOC295962	gène prédit
LOC295965	gène prédit
Cat	<i>Catalase</i>
LOC366142	gène prédit
Cca3	<i>Cca3 protein</i>
LOC311257	gène prédit
LOC362173	gène prédit
LOC362174	gène prédit
Cd59	<i>CD59 antigen</i>
LOC362175	gène prédit
LOC366143	gène prédit
LOC362176	gène prédit
LOC362177	gène prédit
LOC311264	gène prédit
Hipk3	<i>homeodomain-interacting protein kinase 3</i>
LOC366144	gène prédit
LOC362178	gène prédit
LOC362179	gène prédit
LOC295971	gène prédit
LOC311266	gène prédit
LOC362180	gène prédit
LOC362181	gène prédit
LOC295975	gène prédit
LOC295976	gène prédit
Wt1	<i>Wilms tumor 1</i>

Annexe C

Physical Map



Annexe D

ACTGAAGATAACCACTTGAGCCAAGGCTCCTGACCAGTCAGCAATTCTTTTCTCCAGGCTTCCCAGCAC
 CCACCCACCCACGCAGAGTCTGTTCACCCACCTTCTAGACAGTCCATGAAGGTCTCTCGAGGTTTCCTCAC
 TGAATCACACACTGAAAACAAAAAGCAGAAATTCACTTGGTATCGCTGTGGGACAGGGTGGGAACAGGT
 GATGGAGGCAGGGATGTGGGAGGGCAGAGTGGGTGCGGGGCGTGCTTTATGCAGCACCAAGTTCTGAAGG
 AGAGGGCATTCTCTGGCTGGAGTACCCCTTCCCCAGCCTCCCCTCCTTGGGCAAACCTTGCTGGCCACT
 CACCTGTGTACTTGGCCAGAACACATCCTGCAAAGCAAGGGTTGGGGGTGAGGCCATGGCAGGATGGAG
 TTCTACTCTACACTACGTCGGTTCCCTTACCACCTGAGCCCAGCTTTAGTCTCCTACGTTGGCTTCCAAAA
 GGAGAGAGTATGTTTTTTTGGTTTTTTTTTTTTCCCGCTCCGGAGCTGAGGACAAACCCAGGGCCTTTCGCT
 GAGCTAAATCCCCAACCCGTGAGAGAGTATGTGAAGAGAGAAAAGAGGCCCCAGCACACTTGACTGAACAA
 GATCTCCTCCAGGCTGGAGGAGACAAAAGAGCTCACTACACCTCCCCAACCCCGAAGGGAATGGAAC
 AGAGCCCCAGAGCCAGTGGGTACACAAGGGAACACAAAGATGGCGGAAAGGCTTAAGCAAGAAAAGACACC
 AGACAACCCAGACAGCCGCAGTATACTGGGGGCTGACGCTGATGAGCTTTCCCTCATGTGACAAACCCA
 GGCTTACAGTCCCAAAGACAGATTTTGGGTGCCATCTTGCAGCTCAAGGAGACAGGGGTCCGAATGGAA
 GTGAAAGTCTGAAACGGGAAACAACCCGGATGCTTCTACTCCTGTCACTTGTGATTCTGCACTCCTCTG
 CTGAGGAAAGCCAGGCCCTTGCCTACCTGCCCTGCCCTTAGCAGCCACTGTTGTGGGGCTCACCGTGTCT
 TGGGGAGACTCCAGGGCCTCAAAGCCTCCTCATAGCTGCACTGCTCTTCCACGCACTCACGCTCCAGGT
 TGCCCTTTCGGAGCTCCTCCAGGAAGCCGCTGTTGGCTCTGCGGACCCGCTGGAGCAGCGACAGTGTCTG
 CTGAGGGGCCAGGAACACTGCAGCAGGGGGCAGGGGCATGGGAATCGCTCTGGAAGCCTGGCTATCTTA
 ACCATTAGGGGTAGGAAGCTGGCAGCTCTGCTAGCTTCCAAGAGGGGACAGAGGGGATGAGGAAAGTACC
 CAGAAGGCCACTGAACAGTCTGTGAGTCGTCTGCCCTTTCATTGGTTGCCCTAGCCCACTCCCCAGAAGCG
 ATGCCCTTCTCCTGCACCACACACGACGACATCTTAAGCTGGACACTCTGATCTGAGGTCCACCTGGG
 GCTGTCCCTGTGTCTCTGATCTTAGGCAGGGAAACCCAGCCCTCAGGCCTTTCCCACATCCTCTATTCT
 TGCCCCGAGGCCCTCAAAGTGCCCTTACCATGCTGACTGTGTACCAGGCTAGCCAGGGCAGCCAGAGCCAG
 CGACCCAGGTAGGCCAGGCCGCGGACGTGCGACATAGTGTGTGCTCAGCTCCTGGGATCT

- Les microsatellites sont mis en gras.
- Les oligonucléotides choisis pour le marqueur sont surlignés en rose.

Bibliographie

1. Lavoie JL, Bianco RA, Sakai K, Keen HL, Ryan MJ, Sigmund CD. Transgenic mice for studies of the renin-angiotensin system in hypertension. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004;181:571-7.
2. Tanira M, Balushi KA. Genetic Variations related to hypertension: a review. *Journal of Human Hypertension* 2004; Advance Online Publication: 1-13.
3. Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Tremblay J. Hypertension: genes and environment. *Journal of Hypertension* 1998;16:397-418.
4. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular Mechanism of Human Hypertension. *Cell* 2001;104:545-56.
5. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Evans JC, O'Donnell CJ, Roccella EJ, Levy D. Differential Control of Systolic and Diastolic Blood Pressure. *Hypertension* 2000;36:594-9.
6. Campbell, N.A., Biologie, Chapleau, S. Adaptation française de la Troisième édition, p.883-894. 1995. Montréal, ERPI.
7. Crowley SD, Tharaux P-L, Audoly LP, Coffman TM. Exploring type I angiotensin (AT1) receptor functions through gene targeting. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004;181:561-70.

8. Silverthorn, D. U. Human Physiology an Integrated approach. Dinsey, H. Third Edition. 2003. New York, Benjamin-Cummings Publishing Company.
9. Boerwinckle E, Hixson JE, Hixson JE, Hanis CL, Hanis CL. Peeking under the peeks. *Circulation* 2000;102:1877-8.
10. Ohno Y. Selective Genotyping with Epistasis can be utilized for a major Quantitative Trait Locus Mapping in Hypertension in Rats. *Genetics* 2004;155:785-92..
11. Rapp JP. Construction of a double congenic strain to prove an Epistatic Interaction on Blood Pressure between Rat Chromosome 2 and 10. *Journal of Clinical Investigation* 2004;101:1591-5.
12. Svetkey LP, Erlinger TP, Vollmer WM, Feldstein A, Cooper LS, Appel LJ et al. Effect of lifestyle modifications on blood pressure by race, sex, hypertension status and age. *Journal of Human Hypertension* 2004;Advance Online Publication:1-11.
13. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding Genes That Underlie Complex Traits. *Science* 2002;2345-9.
14. Williams SM, Haines JL, Moore JH. The use of animal models in the study of complex disease: all else is never equal or why do so many human studies fail to replicate animal findings. *BioEssays* 2004;26:170-9.

15. Keavney B. Genetic association studies in complex diseases. *Journal of Human Hypertension* 2000;14:361-7.
16. Flack, J. M. and Staffileno, B. A. Hypertension: A Companion to Benner and Rector's *The Kidney*. Oparil, S. and Weber, M. A. 6th, 558-563. 2000. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
17. Hansson, L., Kilander, L., and Ohrvall, M. Hypertension: A companion to Benner and Rector's *The Kidney*. Oparil, S. and Weber, M. A. 6th, 4-20. 2000. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
18. Fauvel JP. Neither Perceived Job Stress Nor Individual Cardiovascular Reactivity Predict High Blood Pressure. *Hypertension* 2004;42:1112-6.
19. Reisin, E. and Hutchinson, H. G. Hypertension: A Companion to Brenner and Rector's *The Kidney*. Oparil, S. and Weber, M. A. 6th, 206-211. 2000. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
20. Klatsky, A. L. Hypertension: A Companion to Banner and Restor's *The Kidney*. Oparil, S. and Weber, M. A. 6th, 211-218. 2000. Philadelphia, W.B. Saunders Company.

21. August, P. and Oparil, S. Hypertension: A Companion to Benner and Rector's *The Kidney*. Oparil, S. and Weber, M. A. 6th, 546-551. 2000. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
22. Safar, M.H. , Smulyan H. Hypertension in Women. *American Journal of Hypertension* 2004;17:82-7.
23. Abraham, K. and Lowenthal, D. T. Hypertension: A Companion to Benner and Rector's *The Kidney*. Oparil, S. and Weber, M. A. 6th, 551-558. 2000. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
24. Rapp JP. Genetic Analysis of Inherited Hypertension in the Rat. *Physiological Reviews* 2000;80:135-72.
25. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding Genes That Underlie Complex Traits. *Science* 2002;2345-9.
26. McBride MW, Charhcar FJ, Graham D, Miller WH, Strahorn P, Carr FJ et al. Functional genomics in rodent models for hypertension. *Journal of Physiology* 2003;554:56-63.
27. Cowley AW, Stoll M, Greene AS, Kaldunsky ML, Roman RJ, Tonellato PJ et al. Genetically defined risk of salt sensitivity in an intercross of Brown Norway and Dahl S rats. *Physiological Genomics* 2000;2:107-15

28. Frankel WN, Schork NJ. Who's afraid of epistasis. *Nature Genetics* 1996;14.
29. Rapp JP, Garrett MR, Deng AY. Construction of a double congenic strain to prove an Epistatic Interaction on Blood Pressure between Rat Chromosome 2 and 10. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101:1591-5.
30. Veerasingham SJ, Sellers KW, Raizada MK. Functional genomics as an emerging strategy for the investigation of central mechanisms in experimental hypertension. *Biophysics and Molecular Biology* 2004;84:107-23.
31. Winslow RL, Boguski MS. Genome Informatics. *Circulation Research* 2003;92:953-61.
32. Yang YH, Speed T. Design issues for cDNA Microarray experiments. *Nature Reviews* 2002;3:579-88.
33. Pravenec M, Wallace CA, Aitman TJ, Kurtz TW. Gene Expression Profiling in Hypertension Research. *Hypertension* 2003;41:3-8.
34. Doris PA. Hypertension Genetics, Single Nucleotide Polymorphisms, and the Common Disease: Common Variant Hypothesis. *Hypertension* 2002;39:323-31.
35. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JPA. Association of C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: a meta-analysis. *Journal of Hypertension* 2004;22:1655-62.

36. Clerget-Darpoux F. Overview of strategies for complex genetic diseases. *Kidney International* 1998;53:1445.
37. Garrett MR, Joe B, Dene H, Rapp JP. Identification of blood pressure quantitative trait loci that differentiate two hypertensive strains. *Journal of Hypertension* 2002;20:2399-23406.
38. Dene H, Choi C, Cicila GT, Garrett MR, Dukhanina OI, Bihoreau M-T et al. An improved linkage map of rat Chromosome 3 with three mapping panels. *Mammalian Genome* 1998;9:517-20.
39. Deng AY, Smith-Mensah WH, Hoebee B, Garrett MR, Rapp JP. Linkage mapping of rat chromosome markers generated from chromosome-sorted DNA. *Mammalian Genome* 1998;9:38-43.
40. Dukhanina OI, Sverdlov VE, Hoebee B, Rapp JP. Improved linkage map and thirty new microsatellite markers for rat Chromosome 10. *Mammalian Genome* 1999;10:26-9.
41. Jones HB. The relative power of linkage and association studies for the detection of genes involved in hypertension. *Kidney International* 1998;53:1446-8.
42. Williams SM. Combinations of Variations in Multiple Genes are Associated with Hypertension. *Hypertension* 2004;36:2-6.

43. Sharma P. A Genome-Wide Search For Susceptibility Loci to Human Essential Hypertension. *Hypertension* 2004;35:1291-6.
44. Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into the mammalian evolution. *Nature* 2004;428:493-521.
45. Garrett MR, Dene H, Walder R, Zhang Q-Y, Cicila GT, Assadnia S et al. Genome Scan and Congenic Strains for Blood Pressure QTL Using Dahl Salt-Sensitive Rats. *Genome Research* 1998;8:711-23.
46. Lee WK. Genetics of Hypertension: from experimental models to clinical applications. *Journal of Human Hypertension* 2004;14:631-47.
47. Stec DE, Davisson RL, Sigmund CD. Transgenesis and Gene Targeting in the Mouse Tools for studying Genetic Determinants of Hypertension. *Trends in Cardiovascular Medicine* 1998;8:256-64.
48. Baltatu O, Campos LA, Bader M. Genetic Targeting of the brain renin-angiotensin system in transgenic rats: Impact on stress-induced renin release. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004;181:579-84.
49. Cowley AW, Liang M, Roman RJ, Greene AS, Jacob HJ. Consomic rat model systems for physiological genomics. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004;181:585-92.

50. Zimdahl H. Conserved Synteny in Rat and Mouse for a Blood Pressure QTL on Human Chromosome 17. *Hypertension* 2004;39:1050-2.
51. Stoll M, Kwitek AE, Cowley AW, Harris EL, Harrap SB, Krieger JE et al. New Target Regions for Human Hypertension via Comparative Genomics. *Genome Research* 2000;10:473-82.
52. Palijan A, Lambert R, Dutil J, Sivo Z, Deng AY. Comprehensive congenic coverage revealing multiple blood pressure quantitative trait loci on Dahl Rat chromosome 10. *Hypertension* 2003;42:515-22.
53. Sivo Z, Malo B, Dutil J, Deng AY. Accelerated congenics for mapping two blood pressure quantitative trait loci on chromosome 10 of Dahl Rats. *Journal of Hypertension* 2002;20:45-53.
54. Deng, A. Y. Determining quantitative trait loci for blood pressure in the rat. Implication for human genetic hypertension. 81-111. 1996. Harwood Academic Publishers. Human Polygenic diseases-Animal Models.
55. Deng AY. Molecular analysis of the rat Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *Clinical and Experimental Hypertension* 1998;20:53-65.
56. Hubner N, Lee Y-A, Lindpaintner K, Ganten D, Kreutz R. Congenic Substitution Mapping excludes SA as a Candidate Gene Locus for a Blood Pressure Quantitative Trait Locus on Rat Chromosome 1. *Hypertension* 1999;34:643-8.

57. Monti J, Zimdahl H, Schulz H, Plehm R, Ganten D, Hubner N. The role of Wnk4 in Polygenic Hypertension, A candidate gene Analysis on Rat Chromosome 10. *Hypertension* 2003;41:938-42.
58. St.Lezin E, Liu W, Wang J-M, Yang Y, Qi N, Kren V et al. Genetic Analysis of Rat Chromosome 1 and the Sa Gene in Spontaneous Hypertension. *Hypertension* 2000;35, part 2:225-30.
59. Garrett MR. Two linked blood pressure quantitative trait loci on chromosome 10 by Dahl Rat Congenic Strains. *Hypertension* 2004;38:779-85.
60. Saad Y, Garrett MR, Rapp JP. Multiple blood pressure QTL on rat chromosome 1 defined by Dahl rat congenic strains. *Physiological Genomics* 2001;4:201-14.
61. Deng AY, Jackson CM, Hoebee B, Rapp JP. Mapping of rat Chromosome 2 markers generated from chromosome-sorted DNA. *Mammalian Genome* 1997;8:731-5.
62. Deng AY, Dene H, Rapp JP. Mapping of a Quantitative Trait Locus for Blood Pressure on Rat Chromosome 2. *Journal of Clinical Investigation* 1994;94:431-6.
63. Deng AY, Dene H, Rapp JP. Congenic Strains for the Blood Pressure Quantitative Trait Locus on Rat Chromosome 2. *Hypertension* 1997;30:199-202.
64. Kren V. Genetic Isolation of a Region of Chromosome 8 That Exerts Major Effects on Blood Pressure and Cardiac Mass in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Journal of Clinical Investigation* 2004;99:577-81.

65. Kovacs P, Voigt B, Kloting I. Novel Quantitative Trait Loci for Blood Pressure and Related TRaits on Rat Chromosomes 1, 10 and 18. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;235:343-8.
66. Zagato L. Genetic Mapping of Blood Pressure Quantitative TRait Loci in Milan Hypertensive Rats. *Hypertension* 2004;36:734-9.
67. Deng AY. Genetic Mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping Endothelin System Genes. *Journal of Clinical Investigation* 2004;93:2701-9.
68. 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.
69. Cicila GT, Choi C, Dene H, Lee SJ, Rapp JP. Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on Chromosome 3 in Dahl rats. *Mammalian Genome* 1999;10:112-6.
70. Mizutani K-I, Sugimoto K, Okuda T, Katsuya T, Miyata T, Tanabe T et al. Kynureninase Is a Novel Candidate Gene for Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension Research* 2002;25:135-40.
71. Norman AW, Litwack G. Prostaglandins. Hormones, Second ed. San Diego: Academic Press, 1997:445-69.

72. Novak JP. Characterization of Variability in Large-Scale Gene Expression Data: Implications for Study Design. *Genomics* 2004;79:104-13.
73. Moujahidine M, Lambert R, Dutil J, Palijan A, Sivo Z, Ariyarajah A et al. Combining Congenic Coverage with Gene Profiling in search of candidates for Blood Pressure Quantitative Trait Loci in Dahl Rats. *Hypertension Research* 2004;27:203-12.
74. Okuda T, Sumiya T, Iwai N, Miyata T. Difference of gene expression profiles in spontaneous hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats from two sources. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;296:537-43.
75. McBride MW. Microarray analysis of rat Chromosome 2 Congenic Strains. *Hypertension* 2004;41[part 2]:847-853 Fiona J. Carr.
76. Lee SJ, Liu J, Guarnera RA, Lee SY, Cicila GT. Use of a Panel of Congenic Strains to Evaluate Differentially Expressed Genes as Candidate Genes for Blood Pressure Quantitative Trait Loci. *Hypertension Research* 2003;26:75-87.
77. Monti J, Plehm R, Schulz H, Ganten D, Kreutz R, Hubner N. 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* 2003;12:435-9.
78. Ariyarajah A, Palijan A, Dutil J, Prithiviraj K, Deng Y, Deng AY. Dissecting quantitative trait loci into opposite blood pressure effects on Dahl rat chromosome 8 by congenic strains. *Journal of Hypertension* 2004;8:1495-502.

79. Deng Y, Rapp JP. Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl Salt-Sensitive rats. *Nature Genetics* 1992;1:267-72.