



Université de Montréal

# **L'impact d'un stress hyperoxique néonatal sur la néphrogenèse chez le rat**

par Constantin Radu POPESCU

Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)  
en Sciences Biomédicales  
option Générale

Juin, 2017

© Constantin Radu POPESCU, 2017

## Résumé

À travers le monde, un enfant sur dix naît prématurément. Les enfants prématurés représentent les plus fragiles des nouveaux-nés, leur organisme n'étant pas complètement préparé pour la vie extra-utérine. Plusieurs organes et systèmes sont encore immatures et toujours en développement actif lorsque la naissance arrive avant le terme. En conséquence, ces enfants sont exposés aux conditions extra-utérines bien avant qu'ils ne devraient l'être physiologiquement. Parmi les transformations du milieu de vie qui interviennent après la naissance, le contact avec de l'oxygène en plus forte concentration est l'une des plus importantes et influence grandement l'homéostasie du nouveau-né.

L'oxygène est impliqué dans certaines complications de la prématurité, notamment la rétinopathie du prématuré et la dysplasie bronchopulmonaire. Cependant, son influence sur d'autres organes en croissance est moins connue. Mes travaux de maîtrise ciblent l'effet de l'oxygène sur le développement rénal. Ainsi, nous nous intéressons aux mécanismes responsables de ces conséquences et plus précisément au rôle du HIF-1 $\alpha$ .

Dans ce projet, nous avons démontré que l'exposition à une concentration élevée d'oxygène mène, chez des rats nouveau-nés, à un développement rénal sous optimal. Ceci est médié par une diminution de l'expression du HIF-1 $\alpha$  et rétabli par la stabilisation de celui-ci au niveau rénal.

**Mots-clés** : Développement rénal, prématurité, néphrogenèse, hyperoxie, HIF-1 $\alpha$ .

## **Abstract**

Throughout the world, one in ten infants is born prematurely. Not having a fully prepared organism for the extrauterine life makes them the most fragile of newborns. Premature birth occurs at a time when organ systems are still actively developing and causes them to be exposed to the extrauterine conditions long before they were physiologically supposed to be. One of the major changes in the infant's environment is the high oxygen content, which greatly influences the newborn's homeostasis.

Oxygen has already been recognized to be involved in several adverse outcomes of prematurity, such as retinopathy of prematurity and bronchopulmonary dysplasia. Yet less is known about its influence on other developing systems. My master's thesis focuses on the effects of high oxygen exposure on renal development and the mechanisms involved. Within this scope, we are particularly exploring the role of HIF-1 $\alpha$ .

In this project, we have shown that exposure of newborn rat pups to high oxygen levels leads to impaired nephrogenesis, mediated by decreased HIF-1 $\alpha$  levels. Renal development was restored by stabilizing its expression in the developing kidney.

**Keywords** : Renal development, prematurity, nephrogenesis, hyperoxia, HIF-1 $\alpha$ .

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	v
Liste des sigles.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	ix
Introduction.....	1
1. Le développement rénal.....	2
1.1 Embryogenèse.....	2
1.2 Événements qui influencent le développement rénal.....	5
1.2.1 Le poids de naissance.....	5
1.2.2 La prématurité.....	6
1.3 Conséquences sur la santé à l'âge adulte.....	7
1.3.1 La programmation développementale.....	7
1.3.2 L'oligonéphropathie congénitale.....	8
2. Hypothèse et objectifs.....	10
2.1 HIF-1.....	10
2.2 Prolyl-hydroxylases.....	12
2.2.1 Inhibiteurs des prolyl-hydroxylases.....	13
3. Article.....	14
3.1 Abstract.....	15
3.2 Introduction.....	15
3.3 Methods.....	17
3.4 Results.....	21
3.5 Discussion.....	24
3.6 Figures and tables.....	31
3.7 References.....	37

4. Discussion.....	43
4.1 L'impact de l'hyperoxie sur la néphrogenèse.....	43
4.2 Mécanismes sous-tendant la perte néphronique.....	44
4.2.1 La cessation de la néphrogenèse.....	44
4.2.2 L'apoptose.....	44
4.3 L'implication du HIF-1 $\alpha$ dans le développement rénal.....	45
4.4 VEGF, podocytes et vaisseaux sanguins.....	47
Conclusion et perspectives.....	48
Bibliographie.....	i

## Liste des figures

Figure 1.	Schéma de la néphrogenèse. ....	4
Figure 2.	Structure des HIF-1 $\alpha$ et HIF-1 $\beta$ . ....	11
Figure 3.	Régulation du HIF-1 $\alpha$ par l'hypoxie ou la normoxie. ....	12
Figure 4.	Inhibition des prolyl-hydroxylases par la DMOG. ....	13

## Liste des sigles

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2 protein

CBP : CREB binding protein

CREB : cAMP response element-binding protein

DMOG : dimethyloxalylglycine

DOHaD : developmental origins of health and disease

HIF 1 $\alpha$  : hypoxia inducible factor-1 $\alpha$

GDNF : glial-derived neurotropic factor

HRE : hypoxia response element

K<sub>m</sub> : constante de Michaelis

ODDD : oxygen dependant degradation domain

PAS : Per-ARNT-Sim

pO<sub>2</sub> : pression partielle de l'oxygène

pVHL : protéine von Hippel-Lindau

Rbx1 : RING box protein 1

RCIU : retard de croissance intra-utérin

ROS : reactive oxygen species (radicaux libres de l'oxygène)

TME : transition mésenchyme-épithélium ou mésenchymo-épithéliale

VEGF : vascular endothelial growth factor



## Liste des abréviations

Etc. : etcetera

*À ma famille*

## **Remerciements**

Mes remerciements vont à Dr Anne Monique Nuyt pour son soutien continu pendant ce projet, ainsi bien qu'au-delà de celui-ci. Apprendre et travailler dans son laboratoire ont nourri mon intérêt pour la recherche fondamentale. Son excellence en tant que néonatalogiste et chercheur indépendant m'encourage à poursuivre une carrière de clinicien-chercheur.

Je remercie également à tous les membres de l'équipe de recherche qui ont contribué à ces travaux pour leur aide et leurs suggestions.

# Introduction

## La maladie rénale chronique

Entre 1990 et 2010, le nombre de décès attribuables à une atteinte rénale chronique a augmenté globalement de 82%, passant du 27<sup>e</sup> au 18<sup>e</sup> rang des causes de mortalité. En Amérique du Nord, cette augmentation est de 97% et se traduit par un avancement du 15<sup>e</sup> au 9<sup>e</sup> rang. Dans cette même période, les fatalités engendrées par la maladie rénale chronique non causée par l'hypertension ou le diabète ont augmenté de 73,5% au niveau mondial.

En termes d'années potentielles de vie perdues, globalement et en Amérique du Nord, cette hausse est de 51% et 82%, respectivement (1). Selon les auteurs, ces estimations sont principalement basées sur les décès survenus suite à l'insuffisance rénale terminale. Cependant, même aux stades précoces, l'insuffisance rénale a un impact majeur sur la santé. Indépendamment des morbidités associées, le déclin progressif de la fonction rénale est directement relié à une augmentation graduelle des décès, des événements cardio-vasculaires et des hospitalisations dans la population (2).

Parallèlement, l'hypertension artérielle demeure le principal facteur de risque de morbidité et mortalité à travers le monde (1). Étroitement liée à la maladie rénale chronique, elle peut en être la cause d'autant que la conséquence. L'identification des facteurs de risque pour le développement d'une atteinte rénale représente ainsi un objectif important pour la santé publique. De plus, des mesures de prévention et de protection qui en résulteraient pourraient avoir un impact considérable sur la survie si ce risque est présent.

# 1. Le développement rénal

## 1.1 Embryogenèse

Chez l'humain, le développement rénal connaît trois étapes distinctes. Le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros sont les trois appareils rénaux qui se succèdent pendant l'embryogenèse.

Le pronéphros émerge dans la quatrième semaine de gestation dans la région cervicale. C'est un organe rudimentaire, non fonctionnel et qui involue rapidement dans la cinquième semaine de gestation. Cependant, le canal pronéphrotique formé dans cette période est essentiel pour le développement du mésonéphros.

Le mésonéphros se développe vers la fin de la quatrième semaine, caudal au pronéphros. Il contient déjà jusqu'à cinquante glomérules et des tubules primitifs, représentant les premières unités rénales fonctionnelles. Celles-ci connectent avec les tubules mésonéphrotiques bilatéraux, qui progressent caudalement et fusionnent avec le cloaque. Ainsi, on observe la production de l'urine fœtale à partir de la sixième semaine. Comme le pronéphros, le mésonéphros involue progressivement et disparaît entre la dixième et la douzième semaine de gestation. Le canal pronéphrotique devient le canal de Wolff.

Le métanéphros apparaît dans la cinquième semaine de gestation. Le rein mature se développe à partir de deux sources : le bourgeon urétéral et le blastème métanephrogène (3, 4). Le premier est un diverticule du canal de Wolff qui grandit vers et ensuite pénètre le blastème. La formation des néphrons (les unités fonctionnelles du rein mature) implique la ramification successive du bourgeon urétéral qui induit, au bout de chaque subdivision, une transition mésenchyme-épithélium ou mésenchymo-épithéliale (TME) du blastème métanephrogène. Cette transformation implique l'interaction entre les deux structures par un processus nommé induction réciproque (5, 6).

D'une part, le blastème produit du GDNF (glial-derived neurotropic factor), élément principal pour la formation et la ramification du bourgeon urétéral. De l'autre part, le canal de Wolff et ensuite le bourgeon urétéral expriment la tyrosine kinase RET, récepteur du GDNF.

Nombreux facteurs de transcription (Pax2, Emx2, Eya1, Sall1 etc.) et des facteurs de croissance (Wnt, la famille BMP, FGF etc.) interagissent pour assurer le développement normal du rein (7, 8).

La formation des néphrons connaît plusieurs étapes successives. Premièrement, les ramifications du bourgeon urétéral induisent une condensation du blastème métanéphrogène adjacent. Ensuite, le blastème s'organise et forme une vésicule rénale. Celle-ci subit un processus d'élongation et génère premièrement le corps en virgule et ensuite le corps en S (« S-shaped body »). Cette ébauche du néphron possède ainsi deux pôles : l'extrémité distale, qui se connectera au bourgeon urétéral et formera le tubule collecteur et l'extrémité proximale, qui subira une invagination et générera la capsule de Bowman. Le tubule primitif continuera son élongation pour former le tubule contourné proximal, l'anse de Henle et le tubule contourné distal (9, 10).

Le développement du néphron se complète avec la colonisation de la capsule de Bowman par des cellules progénitrices vasculaires (figure 1). Celles-ci formeront le réseau capillaire glomérulaire. Elles apparaissent, fort probablement, suite à une combinaison entre la vasculogenèse (différentiation *in situ* à partir des angioblastes) et l'angiogenèse (prolifération des capillaires à partir des vaisseaux préexistants). Selon les connaissances actuelles, quoique la vasculogenèse semble représenter le mécanisme principal, les deux sont fortement dépendantes de la voie de signalisation du VEGF (vascular endothelial growth factor) (11, 12). Ce facteur de croissance est étroitement lié au développement des néphrons : en plus de stimuler autant la vasculogenèse que l'angiogenèse, il est aussi impliqué dans la croissance des tubules rénaux et des cellules épithéliales (13-15).

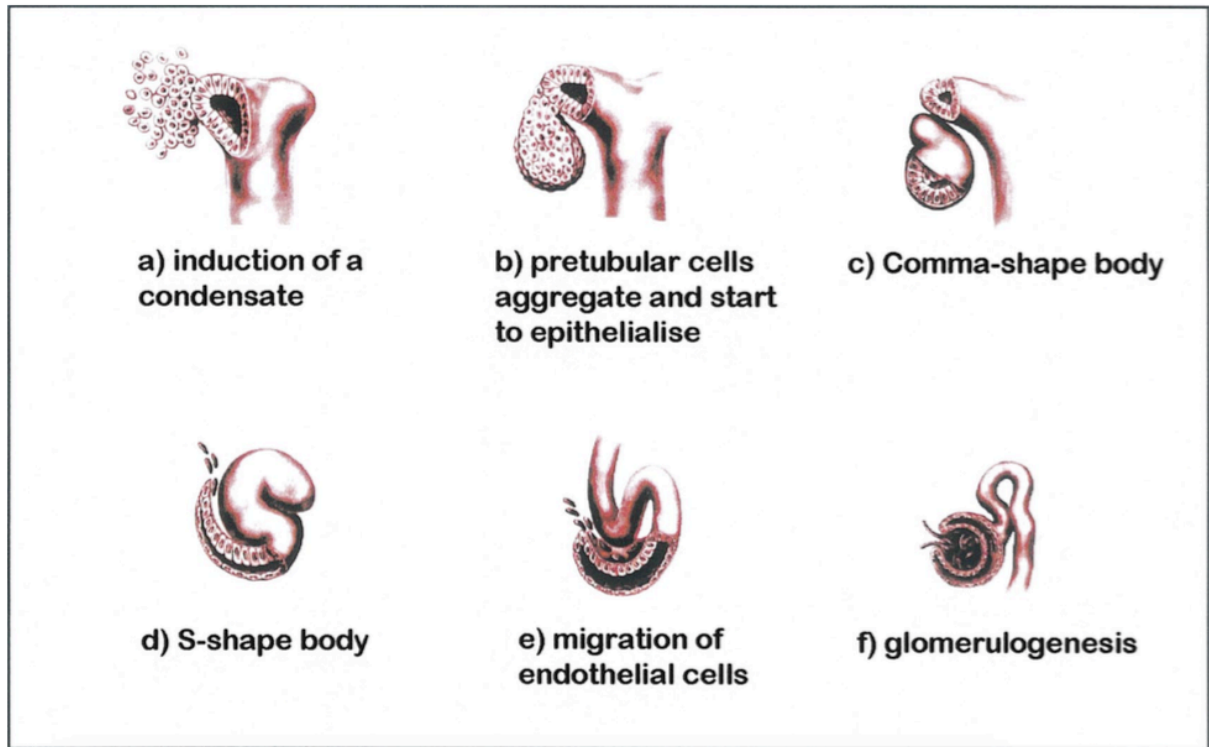


Figure 1. Schéma de la néphrogenèse. Reproduite de Kuure et al, 2000.

Entre la dixième et la dix-huitième semaine de gestation il y a une augmentation importante du nombre de néphrons. Au fur et à mesure que la ramification du bourgeon urétéral se poursuit, des nouvelles générations de néphrons se forment de façon centrifuge, les plus récentes étant situées à la périphérie du rein. La région sous capsulaire contient ainsi les éléments les plus immatures et constitue la zone de néphrogenèse active. Chez l'humain, la néphrogenèse se poursuit jusqu'au 34-36 semaines de gestation et le nombre total de néphrons chez un individu peut varier entre 200 000 et 2 000 000 (9).

## 1.2 Événements qui influencent le développement rénal

### 1.2.1 Le poids de naissance

Présentement, les indicateurs cliniques les plus fiables pour l'estimation du nombre de néphrons sont le poids à la naissance et la prématurité (16). Un petit poids à la naissance (défini comme inférieur à 2,5 kilogrammes) peut être causé soit par une naissance prématurée (avec un poids approprié pour l'âge gestationnel), soit par une restriction de la croissance intra-utérine (ou le poids sera réduit par rapport à l'âge gestationnel).

Des observations ont mis en évidence que les enfants ayant souffert un retard de croissance intra-utérin de type II (asymétrique) présentent jusqu'à 65% moins de néphrons vis-à-vis de leurs contrôles (17). Ce type de restriction survient surtout dans le troisième trimestre de gestation, lorsque approximativement 60% des néphrons sont formés (18). Dans une série de 35 patients, nés après 36 semaines de gestation et décédés dans les deux premières semaines de vie, une réduction de 20% du nombre de néphrons est décrite chez ceux nés avec un petit poids comparés aux témoins (19). Aussi, une étude effectuée dans le sud-est des États-Unis (mentionné ci-dessous pour une incidence élevée d'insuffisance rénale terminale) a démontré une corrélation linéaire entre le poids de naissance et le nombre de néphrons à l'autopsie, avec une augmentation de 257 426 glomérules pour chaque kilogramme supplémentaire. De plus, le décompte de néphrons et le volume glomérulaire sont inversement reliés, suggérant une hypertrophie compensatoire (20).

De nombreux modèles expérimentaux ont exploré et appuient le lien entre le retard de croissance intra-utérin et le développement rénal. Que ce soit la conséquence d'une diète faible en protéines pendant la gestation, de l'embolisation ou la ligature de l'artère utérine ou de l'exposition aux glucocorticoïdes pendant la gestation, la croissance fœtale sous-optimale est associée à une néphrogenèse altérée (21, 22).



## 1.2.2 La prématurité

Selon l'Organisation mondiale de la Santé, la prématurité se définit par une naissance avant la 37<sup>e</sup> semaine de gestation. Dépendamment de l'âge gestationnel, elle est divisée en prématurité extrême (moins de 28 semaines de gestation), grande prématurité (entre 28 et 32 semaines de gestation) et prématurité moyenne (entre 32 et 37 semaines de gestation). L'incidence globale des naissances avant terme est estimée à 11,1% ; elle varie de 5 à 18% entre les pays développés et l'Afrique subsaharienne, respectivement (23).

Tel que mentionné plus haut, la formation des néphrons se poursuit jusqu'à un âge gestationnel entre 34 et 36 semaines. Elle demeure donc active chez les enfants qui sont nés avant ce terme et le degré de prématurité est inversement corrélé au stade de maturation rénale. On peut donc suspecter un impact de la prématurité sur le développement rénal, tel qu'observé sur le développement d'autres organes comme le poumon ou l'œil (24).

Une étude menée par Rodriguez et al. apporte des arguments à l'appui en explorant le développement rénal chez 56 patients nés prématurément entre 24±2 et 27±3 semaines de gestation avec un poids de naissance inférieur à un kilogramme et décédés en période périnatale. Parmi ceux-ci, quinze présentaient aussi un retard de croissance intra-utérin (RCIU). Après l'autopsie, la néphrogenèse a été quantifiée par le décompte radial des générations de glomérules, qui estime le degré de maturation rénale. Ces patients présentaient une néphrogenèse active en période post-natale. Cependant, elle s'arrêtait précocement vers 40 jours de vie et elle était déficitaire, comme en témoigne, d'une part, le nombre significativement réduit de générations de glomérules formées comparativement aux sujets témoins nés à terme et de l'autre part, la présence des dilatations kystiques de la capsule de Bowman. De plus, l'insuffisance rénale aigüe en période néonatale s'est avérée un facteur de risque pour la cessation de la néphrogenèse (25).

Une autre étude a ciblé 28 enfants nés prématurément (dont 6 avec RCIU), ayant survécu entre 2 et 68 jours post-natal, comparés aux témoins pour l'âge post-menstruel (l'âge gestationnel plus l'âge chronologique post-natal) décédés *in utero* ou à la naissance. Dans le groupe étudié, la zone de néphrogenèse est significativement réduite, ainsi que la quantité de glomérules immatures. En contraste avec l'étude mentionnée ci-dessus, le décompte radial des

glomérules était supérieur aux témoins, fait qui suggère une maturation rénale accélérée. Similairement, le volume glomérulaire et le nombre de glomérules avec anomalies structurales se sont montrés élevés (26). Un troisième groupe a aussi rapporté un nombre diminué des générations de glomérules chez les prématurés, quoique avec une grande variabilité et sans détailler le rôle du possible RCIU chez certains patients (27).

Dans un modèle expérimental de prématurité, des babouins nés par césarienne à 125 jours de gestation ont été étudiés. La durée d'une gestation à terme chez le babouin étant de 185 jours, ceci corrèle à un âge gestationnel d'environ 27 semaines chez l'humain. Les babouins prématurés ont été intubés, ventilés et ont reçu des antibiotiques, simulant les conditions des soins intensifs néonataux; l'étude histologique de leurs reins a démontré une densité glomérulaire diminuée (nombre de glomérules par gramme) et une proportion élevée de glomérules anormaux comparativement aux témoins nés à terme (avec des dilatations kystiques de la capsule de Bowman et un volume capillaire glomérulaire diminuée) (28).

Ensemble, ces arguments suggèrent que chez les enfants nés prématurément la néphrogenèse connaît un arrêt ou à tout le moins un ralentissement post-natal précoce et que le développement rénal post-natal est sous-optimal. Vu que les néphrons ne se régénèrent plus, la conséquence serait une réserve néphronale (« nephron endowment ») diminuée pour la vie. Celle-ci pourrait être responsable des conséquences observées à long terme, notamment du volume rénal diminué (29-31), de l'hypertension artérielle (32-34) et des signes précoces d'atteinte de la fonction rénale (35-37).

## **1.3 Conséquences sur la santé à l'âge adulte**

### **1.3.1 La programmation développementale**

Les études menées par le professeur David J.P. Barker et publiées dans les années 1980 ont clairement démontré un lien entre le poids de naissance et le risque du développement de l'hypertension artérielle et des maladies cardiovasculaires (38). Ce risque diminue progressivement avec l'augmentation du poids à la naissance (39). La croissance fœtale sous optimale fût associée ainsi à une inadaptation ultérieure.

L'influence du développement précoce sur le devenir à l'âge adulte a donc commencé à être reconnu. Conséquemment, l'environnement fœtal et périnatal reçoit une attention croissante de la communauté scientifique. Les observations épidémiologiques mènent à l'hypothèse que les variations du milieu intra-utérin ont la capacité de perturber le développement des organes et des systèmes, parmi lesquels les reins (40). Initialement connue sous le nom du « Barker Hypothesis », elle est référée présentement comme « Developmental origins of health and disease » (DOHaD). Ainsi, une proportion importante du risque d'hypertension artérielle, de maladies cardiovasculaires et de diabète de type II à l'âge adulte serait explicable par la croissance intra-utérine sous-optimale et donc déjà présente à la naissance (41).

Plusieurs observations épidémiologiques ont détaillé l'impact d'une croissance intra-utérine altérée sur le devenir néphrologique. Dans le sud-est des États-Unis, l'incidence de l'insuffisance rénale terminale nécessitant de l'épuration extra-rénale est supérieure à celle retrouvée dans le reste du territoire américain. La même région affiche une haute proportion d'individus nés avec un petit poids à la naissance et une corrélation significative entre les deux a été établie (42). L'étude HUNT 2, en Norvège, illustre une correspondance linéaire entre la réduction de la filtration glomérulaire (utilisée comme indice de fonction rénale) et la diminution du poids de naissance (43). Dans ce même pays, une large étude portant sur l'ensemble des enfants nés entre 1967 et 2004 démontre un risque élevé d'insuffisance rénale terminale chez ceux de petit poids (44). En Australie, dans la population aborigène, le ratio albumine/créatinine urinaire (reconnu comme un signe de dysfonction rénale précoce et prémonitoire d'insuffisance rénale) est inversement relié au poids de naissance, indépendamment de l'hypertension artérielle et du diabète (45). Finalement, une méta-analyse regroupant les données actuelles a estimé que les individus nés avec un petit poids ont un risque augmenté de 70% de développer une atteinte rénale chronique (46).

### **1.3.2 L'oligonéphropathie congénitale**

Parallèlement, le professeur Barry M. Brenner a suspecté un lien de causalité entre le nombre de néphrons acquis par un individu pendant la néphrogenèse et le risque ultérieur

d'hypertension artérielle (47). Un nombre réduit de néphrons diminuerait la surface totale de filtration des reins et causerait une excrétion sous-optimale de la charge sodée. Celle-ci mènerait, avec le temps, à une élévation de la pression artérielle. D'un autre côté, le fardeau imposé à une quantité moindre d'unités fonctionnelles pour assurer la fonction rénale serait augmenté et causerait une hypertrophie compensatoire et fonctionnelle (48). Cette hyperfiltration engendrerait, ultérieurement, une hypertension intra-glomérulaire et prédisposerait à la glomérulosclérose et à la perte supplémentaire de néphrons. Ainsi, un cercle vicieux se perpétuerait et causerait une susceptibilité accrue aux insultes rénales éventuelles (49, 50).

Dans la littérature, il existe aussi des arguments directs en faveur de cette théorie. Une étude menée sur des patients décédés dans des accidents démontre que ceux ayant souffert préalablement d'hypertension artérielle (prouvée soit par un traitement en cours soit par l'hypertrophie ventriculaire gauche) présentent une réduction de 46% du nombre total de néphrons par rapport aux contrôles. Leur nombre de glomérules sclérosés est aussi significativement élevé. De plus, le volume glomérulaire (utilisé inversement comme substitut pour le décompte de néphrons) est augmenté de 133% comparé aux individus non hypertendus (51). Cette corrélation, quoique plus modérée, a été aussi observée dans d'autres populations (52).

Cette hypothèse établirait un lien entre le petit poids à la naissance et le devenir cardiovasculaire à l'âge adulte, provoqué, entre autres, par un développement rénal altéré.

## 2. Hypothèse et objectifs

Considérant ces prémisses, l'hypothèse de mon projet de recherche soutient que l'exposition précoce à l'oxygène en concentration élevée a un impact néfaste sur la néphrogenèse active. Le but de ce travail est de détailler cet impact et d'identifier des mécanismes impliqués.

### 2.1 HIF-1

Dans un modèle expérimental, notre groupe a préalablement démontré que chez le rat une exposition post-natale à 80% d'oxygène pendant 7 jours (entre la troisième et la dixième journée de vie) réduit de 25% le nombre total des néphrons (53). Chez les rats, la néphrogenèse continue de façon physiologique en période néonatale jusqu'entre la septième et la huitième journée de vie (54). Cet élément offre l'opportunité d'étudier l'impact de différents facteurs extérieurs sur le développement rénal actif.

Chez le fœtus, l'organogenèse se déroule de façon physiologique dans un milieu relativement hypoxique par rapport à l'environnement post-natal (55). La naissance implique l'exposition soudaine du nouveau-né à des concentrations d'oxygène beaucoup plus élevées que celles du milieu intra-utérin. On peut donc suspecter des changements complexes de l'homéostasie cellulaire qui accompagneraient le stress oxydatif augmenté (56).

La plupart des réponses cellulaires aux fluctuations du niveau d'oxygène de l'environnement se font par l'entremise du HIF-1 (hypoxia inducible factor 1). Ceci est un facteur de transcription ubiquitaire dans les organismes pluricellulaires, identifié chez des espèces allant du *Caenorhabditis elegans* au *Homo sapiens* (57). En présence des coactivateurs CBP et p300, il se lie à la séquence HRE (hypoxia response element) des gènes cibles et active leur transcription (58, 59).

Sa structure hétérodimère est composée de deux sous-unités : HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . Les deux font partie de la famille des protéines hélice-boucle-hélice (« helix-loop-helix ») avec un domaine PAS (60, 61) (figure 2).

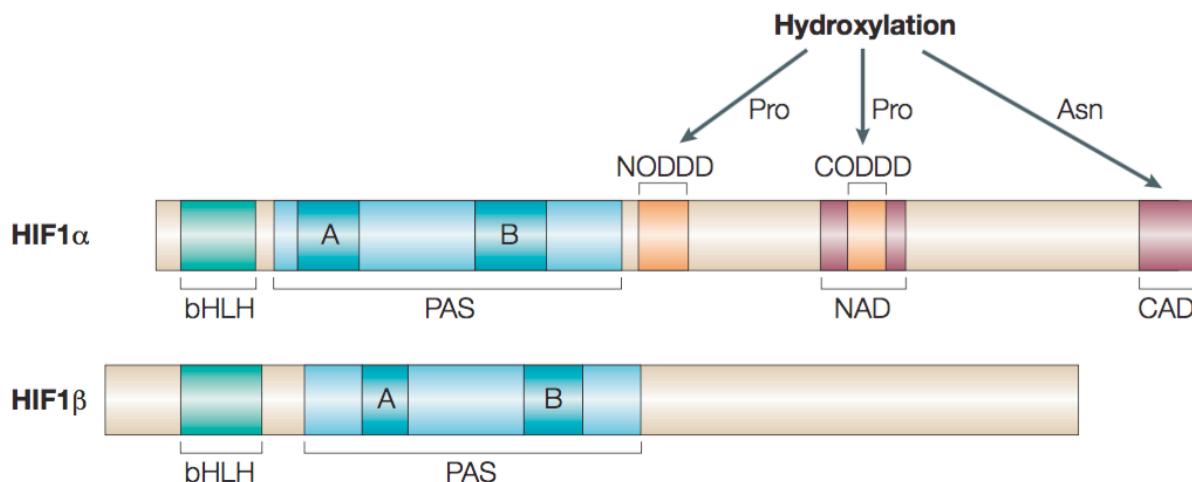


Figure 2. Structure des HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . Reproduite de Schofield et al, 2004.

Le HIF-1 $\beta$  est constitutionnellement exprimé dans les cellules, tandis que l'activité du HIF-1 $\alpha$  est rigoureusement contrôlée par la pO<sub>2</sub> intracellulaire (62). Alors qu'il est stable en condition d'hypoxie, en présence de l'oxygène la demi-vie du HIF-1 $\alpha$  est de moins de 5 minutes (60). Sa dégradation est initiée par l'hydroxylation des résidus prolines en positions 402 et 564 (Pro<sup>402</sup> et Pro<sup>564</sup>) au niveau de son domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD) (63, 64). Ceci permet sa reconnaissance par la pVHL (protéine suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau) et la liaison spécifique entre les deux molécules au niveau du ODDD (65). D'autres molécules (les élongines B et C, la Culline2 et Rbx1) s'attachent et forment le complexe VCB-CR (« pVHL – elongin B – elongin C – Cul2 – Rbx1 »). Ce complexe fait fonction d'ubiquitine ligase E3 et cause l'ubiquitinylation du HIF-1 $\alpha$ , processus qui cible les protéines pour la dégradation dans le protéasome (66). Il sera de cette manière détruit avant d'agir comme activateur de la transcription de ses gènes cibles (figure 3).

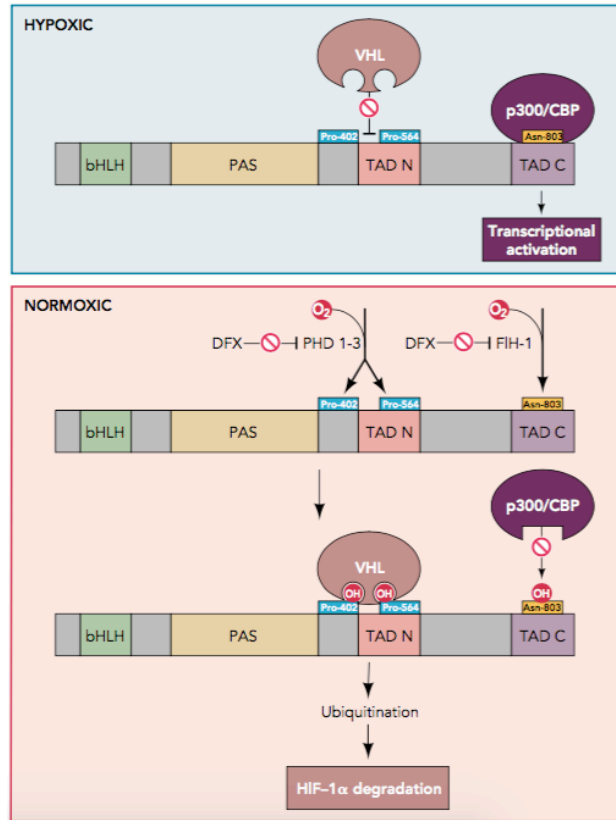


Figure 3. Régulation du HIF-1 $\alpha$  par l'hypoxie ou la normoxie. Reproduite de Semenza GL, 2004.

## 2.2 Prolyl-hydroxylases

L'hydroxylation des résidus prolines du HIF se fait de façon enzymatique par des prolyl-hydroxylases. Celles-ci sont des oxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes faisant partie de la famille des prolyl-4-hydroxylases. Les types décrits sont appelés PHD1, PHD2 et PHD3 (« prolyl hydroxylases domain » 1, 2 et 3, respectivement) (67). Ces enzymes nécessitent les cofacteurs ascorbate et 2-oxoglutarate et la présence du fer (II) et de l'oxygène. La conversion du 2-oxoglutarate en succinate produit les groupes hydroxyles nécessaires pour générer les résidus 4-hydroxyprolines en position 402 et 564.

Leur constante de Michaelis ( $K_m$  – la concentration du substrat auquel la vitesse de la réaction représente la moitié de la vitesse maximale) pour l'oxygène est légèrement supérieure à sa concentration atmosphérique. Ce fait leur confère l'habilité de senseurs intracellulaires

d'oxygène et, en conséquence, l'oxygène est le facteur qui limite la vitesse de la réaction enzymatique (68).

Parmi les trois enzymes, la PHD2 est la principale impliquée dans la dégradation du HIF en condition de normoxie (69). Chez le rat, la PHD2 est aussi la forme la plus abondante exprimée dans le rein, surtout au niveau des tubules proximaux et de la médullaire externe (70).

### 2.2.1 Inhibiteurs des prolyl-hydroxylases

L'inhibition de la dégradation du HIF-1 $\alpha$  lui permettrait une action plus soutenue et donc une expression augmentée de ses gènes cibles. À cette fin, plusieurs mécanismes d'inhibition des prolyl-hydroxylases ont été décrits : l'hypoxie elle-même ou induite par le monoxyde de carbone, les chélateurs du fer comme la désferoxamine et les analogues du 2-oxoglutarate (71, 72).

Parmi ces derniers, la diméthylaloxalylglycine (DMOG) est un inhibiteur non sélectif des prolyl-hydroxylases. Cette molécule a été prouvée capable de stabiliser le HIF-1 $\alpha$  même dans des cellules exposées à des concentrations élevées d'oxygène (73). Son administration de façon systémique devrait, en conséquence, augmenter le niveau du HIF-1 $\alpha$  au niveau tissulaire. Pour ces raisons, on a choisi d'utiliser la DMOG dans notre modèle expérimental.

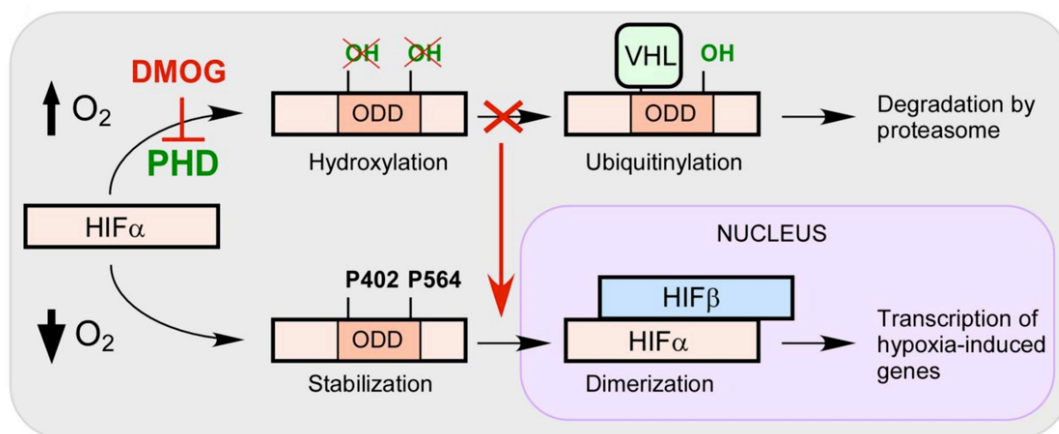


Figure 4. Inhibition des prolyl-hydroxylases par la DMOG. Reproduite de Trichonas et al, 2013.



### 3. Article

L'article suivant a fait objet d'une publication dans la revue scientifique PloSOne.

#### **Hyperoxia exposure impairs nephrogenesis in the neonatal rat : role of HIF-1 $\alpha$**

Constantin R Popescu<sup>1</sup>, Megan R Sutherland<sup>1</sup>, Anik Cloutier<sup>1</sup>, Geneviève Benoît<sup>1</sup>, Mariane Bertagnolli<sup>1</sup>, Catherine Yzydorczyk<sup>1</sup>, Nathalie Germain<sup>1</sup>, Véronique Phan<sup>1</sup>, Martine Lelièvre-Pegorier<sup>3</sup>, Hervé Sartelet<sup>2</sup> and Anne Monique Nuyt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center, CHU Sainte-Justine, Departments of <sup>1</sup>Pediatrics and <sup>2</sup>Pathology, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>3</sup>INSERM, U872, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris, F-75006 France.

Citation :

Popescu CR, Sutherland MR, Cloutier A, Benoît G, Bertagnolli M, Yzydorczyk C, Germain N, Phan V, Lelièvre-Pegorier M, Sartelet H, Nuyt AM. (2013) Hyperoxia exposure impairs nephrogenesis in the neonatal rat: role of HIF-1 $\alpha$ . PLoS ONE 8(12): e82421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone>.

### **3.1 Abstract**

Preterm neonates are exposed at birth to high oxygen concentrations relative to the intrauterine environment. We have previously shown in a rat model that a hyperoxic insult results in a reduced nephron number in adulthood. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of transient neonatal hyperoxia exposure on nephrogenesis. Sprague-Dawley rat pups were raised in 80% O<sub>2</sub> or room air from P3 to P10. Pups (n=12/group, 6 males and 6 females) were sacrificed at P5 (during active nephrogenesis) and at P10 (after the completion of nephrogenesis). Hyperoxia exposure resulted in a significant reduction in both nephrogenic zone width and glomerular diameter at P5, and a significantly increased apoptotic cell count; however, nephron number at P10 was not affected. HIF-1 $\alpha$  expression in the developing kidney was significantly reduced following hyperoxia exposure. Systemic administration of the HIF-1 $\alpha$  stabilizer dimethylxalylglycine (DMOG) resulted in enhanced expression of HIF-1 $\alpha$  and improved nephrogenesis: kidneys from hyperoxia-exposed pups treated with DMOG exhibited a nephrogenic zone width and glomerular diameter similar to room-air controls. Additionally, glomerular density was increased in normoxic males treated with DMOG. These findings demonstrate that neonatal hyperoxia exposure results in impaired nephrogenesis, which may be at least in part HIF-1 $\alpha$ -mediated. Although nephron number was not significantly reduced at the completion of nephrogenesis, early indicators of maldevelopment suggest the potential for accelerated nephron loss in adulthood. Overall, this study supports the premise that prematurely born neonates exposed to high oxygen levels after birth are vulnerable to impaired renal development.

### **3.2 Introduction**

Preterm neonates are often born at a time when kidney development is still ongoing, as nephrogenesis (the development of nephrons) is not normally completed until 34-36 weeks gestation (1, 2). Development of the kidneys continues after birth in preterm neonates (2); however, glomerular abnormalities and reduced glomerular formation have been observed in this population indicating that postnatal nephrogenesis is probably impaired (2, 3).

Importantly, hypertension (4-6), reduced kidney size (7-9) and impaired renal function (10, 11) have been observed in children and adults that were born preterm, highlighting the long-term consequences of preterm birth on renal health.

The cause of impaired renal development following preterm birth, and the mechanisms by which this may program for adult renal disease are largely unknown; exposure to oxygen (O<sub>2</sub>) in the extrauterine environment, however, is likely to be a contributing factor (12-14). Infants are exposed upon birth to supraphysiological concentrations of O<sub>2</sub> compared to intrauterine life (15). This results in oxidative stress of the newborn (16, 17), with preterm neonates particularly susceptible due to their low antioxidant levels (18, 19). Oxidative stress has been implicated in a number of common diseases of prematurity including retinopathy of prematurity, bronchopulmonary dysplasia, and necrotising enterocolitis (20, 21).

Importantly, we have previously shown that early life exposure to hyperoxia in rats (80% O<sub>2</sub> from postnatal day 3-10, a time when nephrogenesis is still ongoing) led to hypertension, and a 25% reduction in nephron number in adulthood (13); underlying these findings may be a disruption to nephrogenesis. In this regard, rat metanephric organ culture studies have shown that both vasculogenesis and tubulogenesis are enhanced when tissues are kept under low (1-3%), rather than standard (21%), O<sub>2</sub> concentrations (22). Cellular oxygen homeostasis is predominantly controlled by the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) transcription factor, with high oxygen levels resulting in the degradation of HIF-1 $\alpha$  protein via prolyl-4-hydroxylase (PHD)-dependent interactions with the von Hippel-Lindau (pVHL) ubiquitin E3 ligase complex (23, 24). HIF-1 $\alpha$  is known to be essential for organogenesis (25, 26), by regulating the expression of numerous factors involved in angiogenesis, cellular proliferation, and apoptosis (27, 28); however, to date no direct link between hyperoxia and impaired nephrogenesis has been established.

The aim of the current study, therefore, was to characterise the impact of transient hyperoxia exposure (80% O<sub>2</sub> from P3 to P10) on nephrogenesis in the neonatal rat. Considering that HIF-1 $\alpha$  controls the expression of a number of key factors involved in organogenesis, we further aimed to examine the role of the transcription factor on nephrogenesis during hyperoxia exposure. As HIF-1 $\alpha$  is post-transcriptionally regulated by PHD, we assessed the effect of systemic administration of a PHD inhibitor,

dimethyloxallylglycine (DMOG), in order to test the hypothesis that counteracting the oxygen-induced downregulation of HIF-1 $\alpha$  activity would prevent any adverse effects of hyperoxia on nephrogenesis in this model.

### **3.3 Methods**

#### **Animals**

All studies were approved by the Animal Care Committee of the CHU Sainte-Justine, and the treatment and care of the animals was in accordance with the principles of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals from the Canadian Council on Animal Care. Sprague-Dawley rat pups (Charles River; St.-Constant, Québec, Canada) were born naturally at term and maintained in 80% O<sub>2</sub> (mixture of medical grade 100% O<sub>2</sub> and room air; Oxycycler ProOx model 110, Biosherix, Lacona, NY, USA), or room air, from the 3rd (P3) to the 10th (P10) day of life (13).

#### **Experimental groups**

Hyperoxia-exposed pups were continuously exposed to 80% O<sub>2</sub> from P3 to P10 (O<sub>2</sub>-exposed group (H); n = 3 litters). To avoid severe O<sub>2</sub> toxicity, the mother of the O<sub>2</sub>-exposed litter was interchanged every 12 hrs with another dam in room air. The pups of the dam used for interchange served as a control for the effects of the dam being exposed to hyperoxia, and also the stress of the dam interchange, but themselves were maintained in room air (normoxia-hyperoxia group (NH); n = 3 litters). Normal control litters were kept with their dams in room air (normoxia not interchanged group (NNI); n = 3 litters). All litters were equalised to n=12 at P3, and there was no difference in the number of males/females (5-7 of each sex per litter) or in the survival of the pups between groups. In all groups, 2 male and 2 female pups, selected at random, were analysed at P5 (n=12/group); the remainder of pups were grown until P10, with 1-2 male and female pups selected for analysis (n=12/group). Pups were sacrificed and kidneys collected for analysis at P5 and P10, with body and kidney weights recorded at the

two time points. For all kidney analyses, researchers were blinded to the experimental group assignment of the animals.

In a separate series of experiments, 1-2 male and 1-2 female pups were selected at random from H and NH litters (n=4 litters/group) and administered either the prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor dimethyloxalylglycine (DMOG; Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA) at a dosage of 200 µg/g of body weight (29) (H+DMOG and NH+DMOG treatment groups; n = 6 males and 6 females per group), or an equivalent volume of saline solution (H and NH control groups; n = 6 males and 6 females per group). Pups received the DMOG or saline via intraperitoneal injection at P2 (24 hours before hyperoxic exposure) and P4 (after the first 24 hours of hyperoxic exposure). Pups were sacrificed and kidneys collected for analysis at P5; the remainder of pups were grown to P10 (with 1 male and 1 female pup per litter selected for analysis, n=12/group). During all kidney analyses, researchers were blinded as to the experimental grouping of the animals.

### **Histomorphometry**

Kidneys were harvested from P5 and P10 pups, weighed, fixed in formaldehyde and paraffin-embedded whole. 4µm sections from the central region of the kidney (across the full coronal plane) were haematoxylin phloxine saffron-stained and examined by optical microscopy. For each section, three microphotographs from the anterior, posterior, and mediolateral regions of the kidney (each including the full thickness of the cortex) were obtained with a digital camera at a magnification of 100X (AxioCam; Zeiss, Germany).

***Width of the renal cortex and nephrogenic zone:*** Using image analysis software (Image Pro Plus v. 6.3 for Windows), the width of the renal cortex (from the cortico-medullary junction to the superficial edge of the outer renal cortex) in pups at P10, and the width of the nephrogenic zone (area of growth in the outer renal cortex) in pups at P5 were determined. Five measurements of each parameter were recorded in each of the three fields of view (15 measurements per kidney) and then averaged to determine the mean width per kidney.

***Glomerular diameter:*** In each of the three fields of view examined, 5 mature glomeruli (15 per kidney) were selected at random for analysis of glomerular diameter. Using image

analysis software (Image Pro Plus v. 6.3 for Windows) the diameter of each glomerulus in cross-section was measured then averaged to determine the mean glomerular diameter per kidney.

### **Glomerular number and density**

The right kidney from saline/DMOG treated NH and H animals at P10 (a time point after the completion of nephrogenesis) were paraffin-embedded whole, and sectioned exhaustively at 7 $\mu$ m. Every 20th section was collected and stained with haematoxylin and eosin, imaged in parts then merged using Adobe Photoshop (CS6 Extended, v. 13.0.1). The Photoshop count tool was utilised to mark and count each individual glomerulus, then the result for all serial sections were combined (indicating the number of glomeruli counted in 20% of kidney). Sections were 140 $\mu$ m apart to avoid counting any glomeruli more than once. To estimate the total number of nephrons per kidney, the formula by Murawski et al. (30) was employed:  $N_{glom} = f \times 0.4 \times NN$  where  $f$  is inverse of the fraction of the kidney sampled, 0.4 is a constant, and  $NN$  is the number of glomeruli counted. Estimated total nephron number was then divided by kidney weight to determine the density of glomeruli in the kidney.

### **Assessment of apoptosis**

The extent of apoptosis was assessed using TUNEL assays on 4 $\mu$ m deparaffinised sections of kidney, from animals at P5. Sections were stained using the In Situ Cell Death Detection POD Kit (Roche Diagnostics; Laval, Québec, Canada) according to the manufacturer's instructions, and counterstained with methyl green. For each section, three microphotographs of the nephrogenic zone were obtained from from the anterior, posterior, and mediolateral regions of the kidney (400X magnification). A circular boundary was superimposed on each image, creating a field of view with a diameter of 200  $\mu$ m that was inclusive of 3 developing glomeruli (vesicle, comma-shaped or S-shaped bodies). For each photograph, all apoptotic cells (positive for TUNEL staining) within the field of view were counted, and the number of apoptotic cells per region of nephrogenic zone was then averaged

per kidney. The number of apoptotic cells only present within the developing glomeruli was also assessed.

### **Assessment of HIF-1 $\alpha$ expression**

**Immunohistochemistry:** Immunohistochemical localization of HIF-1 $\alpha$  was performed on 4 $\mu$ m deparaffinised sections of kidney from animals at P5. Using the Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AR, USA), mouse monoclonal anti-human HIF-1 $\alpha$  ( $\alpha$ 67 at 1:10 000 dilution; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) was applied for 32 min, followed by application of Ultraview Universal DAB detection kit according to the manufacturer's instructions. Normal rabbit IgG (1:10 000 dilution) served as a negative control. Two investigators, each blinded to the experimental groups, independently evaluated immunostaining scores for HIF-1 $\alpha$  in the nephrogenic area and the cortical interstitium by a semi-quantitative optical assessment of the percentage of positive cells in each tissue section: 0 = all cells negative, 1+ = < 25% of positive cells, 2+ = 25 to 50% of positive cells, 3+ = 50 to 75% of positive cells and 4+ = > 75% of positive cells.

**Western blot:** Kidneys from P5 saline/DMOG treated NH and H animals (6 males and 6 females per group) were homogenized in nuclear extract buffers (Buffer A: 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT and 10% Igepal; Buffer B: 5 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT and 26% glycerol), complemented with proteases inhibitors and 0.5 mM PMSF (as described by Li et al. (31)). Nuclear extracts underwent SDS-PAGE gel electrophoresis and were transferred onto PVDF membranes. Membranes were incubated overnight with HIF-1 alpha antibody (1/1500; kindly provided by the laboratory of Dr. Darren Richard, Laval University, QC, Canada), in 1 % milk buffer solution (1 M Tris, 5 M NaCl). After washing (1 M Tris, 5 M NaCl, 0.1% Triton), the membranes were incubated with the secondary antibody (anti-IgG rabbit, 1/15 000; also provided by Dr. Richard) in a 1 % milk buffer solution, for one hour. Antibody against  $\beta$ -actin (1/25 000 dilution, Novus Biologicals, Oakville, ON, Canada) was used as control. Protein bands were developed with an enhanced chemiluminescence substrate (PerkinElmer Inc,

Waltham, MA, United States) and quantified using ImageJ 1.36b (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), with values normalised against  $\beta$ -actin expression.

### **Statistical analysis**

Data were analysed using GraphPad Prism v.5 for Windows (GraphPad Software; San Diego, CA, USA), and are presented as the mean  $\pm$  SEM. Differences between the NNI, NH and H groups (males and females) was analysed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with the factors hyperoxia exposure (pH), sex (pS), and their interaction (pHxS). In the assessment of DMOG treatment in NH and H groups, data was also analysed using a two-way ANOVA with the factors hyperoxia exposure (pH), DMOG treatment (pDMOG) and their interaction (pHxDMOG); males and females were analysed separately. To determine differences between individual groups, each two-way ANOVA was followed by a Bonferroni post-hoc test. To control for any litter effect, in cases where more than one animal per litter was assessed, only the mean of those animals was used in the statistical analysis. In the assessment of the semi-quantitative measures (HIF-1 $\alpha$  score) a Mann-Whitney test was performed. Statistical significance was accepted at the level of  $p < 0.05$ .

## **3.4 Results**

### **Impact of neonatal hyperoxia**

**Body and kidney weight:** There was no effect of hyperoxia exposure on body weight, kidney weight, or kidney weight to body weight ratio in pups at P5 or P10 of age; there was also no difference between males and females at either time point (Table 1).

**Renal morphology:** Hyperoxia exposure led to a significant reduction in nephrogenic zone width at P5 (Figure 1A); in males, nephrogenic zone width averaged  $185.8 \pm 25.2 \mu\text{m}$  in the NNI control group,  $135.1 \pm 15.8 \mu\text{m}$  in the NH group (a reduction of 27%), and  $112.7 \pm 10.3 \mu\text{m}$  in the H group (a reduction of 39%). Similarly, there was a significant effect of



hyperoxia exposure on glomerular diameter at P5 (Figure 1B). In animals at P10, however, there was no effect of hyperoxia exposure on the width of the renal cortex, or glomerular diameter (Figure 1C-D). There was no effect of sex on nephrogenic zone width, cortical width, or glomerular diameter in animals at P5 or P10.

***HIF-1 $\alpha$  expression:*** As shown in Figure 2 (C-E), the expression of HIF-1 $\alpha$  was localised to the nuclei of cells within the renal cortex of the developing kidney at P5. Within the nephrogenic zone (Figure 2A), and the cortical interstitium (Figure 2B), the number of cells positive for HIF-1 $\alpha$  expression was significantly reduced in H animals compared to animals in the NNI control group.

***Apoptosis:*** Overall, there was a significant effect of hyperoxia exposure on the number of apoptotic cells in the nephrogenic zone (Figure 3A), and within glomeruli of the nephrogenic zone (Figure 3B), in animals at P5.

### **Impact of DMOG treatment**

***Body and kidney weight:*** At P5, there was no significant effect of DMOG treatment on body weight, kidney weight, or kidney weight to body weight ratio (Table 1). At P10, however, body weights were significantly reduced in male and female NH and H animals treated with DMOG compared to saline controls (Table 1). There was no difference between groups in kidney weight or kidney weight to body weight ratio at P10.

***Renal morphology:*** As shown in Figure 4A, both hyperoxia exposure and DMOG treatment had a significant effect on nephrogenic zone width in both males and females. A significant increase in nephrogenic zone width was evident in DMOG-treated animals; in H males, nephrogenic zone width averaged  $138.5 \pm 2.2$   $\mu\text{m}$  in saline-treated controls, but was shown to increase 28% to  $191.6 \pm 3.6$   $\mu\text{m}$  in the DMOG-treated animals (Figure 4A). DMOG treatment also had a significant effect on glomerular diameter at P5, with increased glomerular

diameter evident in DMOG-treated male and female animals from both NH and H groups (Figure 4B).

**Glomerular number and density:** At P10, there were no significant differences between groups in the number of glomeruli counted in 20% of each kidney (Figure 4C). Glomerular density, however, was significantly increased in NH males treated with DMOG compared to NH controls (Figure 4D).

**HIF-1 $\alpha$  expression:** Within the nephrogenic zone, and the cortical interstitium, the number of cells positive for HIF-1 $\alpha$  expression was significantly increased in DMOG-treated animals compared to saline-treated controls, within both the NH and H groups (Figure 5); a similar pattern was observed in both males and females. In the Western blot analyses of nuclear extracts, two bands at approximately 116 kDa and 140 kDa were observed, which likely represent HIF-1 $\alpha$  and ubiquitinated-HIF-1 $\alpha$  respectively (32). The ratio of intensity (normalized to  $\beta$ -actin) of HIF-1 $\alpha$  (116 kDa) averaged 23.7% lower in male, but 1.3% higher in female NH+DMOG animals compared to NH Controls; H+DMOG animals had average levels 7.2% higher in males, and 3.2% higher in females compared to H Controls. Ubiquitinated-HIF-1 $\alpha$  (140 kDa) levels averaged 5.5% and 10.5% higher in NH+DMOG compared to NH Control groups in males and females respectively. Similarly, levels averaged 26.1% higher in H+DMOG males and 21.2% higher in H+DMOG females compared to H controls. There was no statistically significant differences between any treatment groups, or between sexes.

**Apoptosis:** There was no significant effect of DMOG treatment on the number of apoptotic cells within the nephrogenic zone, or glomeruli of the nephrogenic zone, in either males or females.

### **3.5 Discussion**

The findings of this study demonstrate that transient hyperoxia exposure in the neonatal period results in impaired nephrogenesis, with a reduced nephrogenic zone width, reduced glomerular size, and increased apoptosis in the neonatal rat kidney. Importantly, HIF-1 $\alpha$  expression in the renal cortex was significantly reduced following hyperoxia exposure. We have shown that inhibiting the oxygen-induced degradation of HIF-1 $\alpha$  results in an attenuation of the adverse effects of hyperoxia on renal development, highlighting the potentially important role of HIF-1 $\alpha$  signaling in renal development.

#### **Neonatal hyperoxia exposure impairs nephrogenesis**

The extrauterine environment represents a significant stress for underdeveloped organ systems, such as the preterm neonatal kidney in which nephrogenesis is ongoing after birth. Nephrogenesis in utero normally occurs at very low oxygen concentrations; after birth, blood oxygen levels quickly rise which can result in oxidative stress of the newborn, particularly with the use of supplemental oxygen therapy (16, 17). Although postnatal nephrogenesis normally occurs in term-born rat pups breathing room air, we propose that exposure to high oxygen levels after birth augments the level of stress imposed on the immature kidneys and consequently models the condition of the preterm newborn. In this regard, we have previously shown that 80% O<sub>2</sub> exposure in the neonatal period results in vascular rarefaction, hypertension, and reduced nephron number in the adult rat (13), similar to clinical outcomes seen in children and adults that were born preterm (3-5). In contrast, a recent study in a mouse model (mice exposed to 65% O<sub>2</sub> from birth to postnatal day 7) showed no changes in nephron number (33); the differences in findings between studies may relate to differences in the concentration of oxygen used, the postnatal days of exposure, and also susceptibilities of the animal model.

The 25% reduction in nephron number observed in adulthood in this model (13) may be the result of an accelerated loss of nephrons, and/or impaired nephrogenesis. In argument for the latter, the findings of this study demonstrate that neonatal hyperoxia exposure results in a significant reduction in nephrogenic zone width at P5 (following 48 hrs of hyperoxia

exposure). These findings are possibly indicative of an early cessation of nephrogenesis, as suggested by the similar findings of a reduced nephrogenic zone width (in addition to other indicators of accelerated postnatal renal maturation) in human neonates following preterm birth (2). An exhausted population of renal progenitor cells has been postulated to be the most likely cause for the cessation of nephrogenesis (34). In this regard, high oxygen levels have previously been shown to reduce the population of progenitor cells in the lung (35), and in renal epithelial cell culture, cells exposed to hyperoxia exhibit early signs of differentiation (36). In the current study, we also observed a significantly increased number of apoptotic cells in the nephrogenic zone of the hyperoxia-exposed kidneys. Cell death (via apoptosis or necrosis) is one of the most predominant pathological findings following hyperoxia exposure, and is particularly evident in the lung (37, 38). In a hyperoxic environment, apoptosis occurs following the increased formation of reactive oxygen species (ROS) by the mitochondria (37). It is possible that both the cessation of nephrogenesis in combination with increased apoptosis may have contributed to the reduced nephrogenic zone width.

Exposure to high oxygen levels is also known to impair vascular development in organs such as the lung and retina (20, 21) with microvascular rarefaction of skeletal muscle also observed in this model (13). It is conceivable that development of the glomerular capillaries during ongoing nephrogenesis may also be impaired, thus resulting in the reduced glomerular size observed in the current study. Previous studies in a baboon model of preterm birth (39), and in human preterm neonates (2), have shown morphologically abnormal glomeruli with enlarged Bowman's space and scant glomerular capillarisation are commonly observed in the outer renal cortex of the kidney following preterm birth, which supports the suggestion that glomerular development may be impaired (and thus contribute to accelerated, or an increased susceptibility to nephron loss in adulthood). No similar morphological evidence was seen in the current study, however, and the cause of these abnormalities is yet to be determined.

Alternative explanations for the impaired renal development following hyperoxia exposure include maternal/neonatal stress and growth restriction; extrauterine growth restriction is a common finding in premature neonates, who have a reduced postnatal growth rate compared to that of normal fetal growth in utero (40). In general, nephron endowment is

directly correlated with body growth (41), with both intrauterine and extrauterine growth restriction associated with impaired renal growth and function in humans (42, 43). Importantly, however, we found no difference in body or kidney weights between groups in this study, suggesting that growth restriction was not the cause of the impaired renal development. The NH group (alternated dams exposed to hyperoxia for 12/24 hrs, normoxic pups) was included in this study in order to control for all stressful interventions, including maternal exposure to high oxygen levels. The general trend in all analyses was that the NH group exhibited intermediate findings between the control NNI and the hyperoxia exposed H groups; as adults, we have previously shown that nephron number in the NH group was significantly reduced compared to controls (13). This suggests that O<sub>2</sub> breathing by the lactating dam and/or neonatal or maternal stress can also impact renal development in the pups, through mechanisms that remain to be determined. The two factors (O<sub>2</sub> exposed dam and stress of interchange) cannot be separately assessed in this study, however we have previously shown that interchanging control (NNI) dams as the sole intervention did not impact offspring blood pressure or nephron number in adulthood (13) which is suggestive of a primary role of maternal O<sub>2</sub> exposure.

In contrast to the findings of a reduced nephrogenic zone width and decreased glomerular size at P5, animals assessed at P10 (after the completion of nephrogenesis) did not exhibit a reduction in glomerular size, or a significant change in the width of the renal cortex. There was also no difference in the total number of glomeruli between NH and H groups. As the postnatal interventions were only imposed in the final stages of nephrogenesis, it is possible that the reduced nephrogenic zone width observed at P5 had a relatively minor impact on overall renal growth. Our previous finding of a reduced nephron number in adulthood (13) in this model may therefore be primarily explained by accelerated nephron loss rather than an observable impact on nephron endowment at the immediate completion of nephrogenesis. Potentially, the change in glomerular size may represent an incipient phase of compensatory renal hypertrophy following the initially suboptimal nephrogenesis. It is also to be noted that in this model, 4-6 pups per litter were sacrificed at P5, with the remainder continued until P10. This reduction in litter size may have had an impact on animal growth and renal development;

future studies involving the assessment of whole litters at each time point would be required in order to investigate this factor.

### **The role of HIF-1 $\alpha$ in nephrogenesis**

HIF-1 $\alpha$  expression was shown to be markedly reduced following hyperoxia exposure in both the nephrogenic zone and cortical interstitium of H males and females, compared to normoxic controls. This result was certainly expected due to the known role of oxygen tension in the control of HIF-1 $\alpha$  protein levels, whereby under normoxic and hyperoxic conditions HIF-1 $\alpha$  is rapidly hydroxylated by prolyl hydroxylase domain (PHD) proteins which results in its ubiquitination (23, 24); under hypoxic conditions, as occurs during renal development, HIF-1 $\alpha$  is stabilised (44). Even though logically expected, this is, to our knowledge, the first study to demonstrate that exposure to high oxygen concentrations in vivo markedly decreases HIF-1 $\alpha$  expression in the kidney. The exact function of HIF-1 $\alpha$  during nephrogenesis is largely unknown (45), but the localisation of expression to the nephrogenic zone suggests that it plays an important role. We observed nuclear expression of HIF-1 $\alpha$  in cells located within the nephrogenic zone of the neonatal rat kidney, which corresponds with a previous study that demonstrated strong HIF-1 $\alpha$  expression in the nuclei of ureteric bud epithelia, and in cells of the proximal portion of S-shaped bodies within the nephrogenic zone of developing human kidneys (46).

In order to determine what effects HIF signaling had on nephrogenesis in this model, we counteracted the oxygen-induced reduction in HIF-1 $\alpha$  via systemic treatment with DMOG (a PHD inhibitor). In accordance with a previous study, we found (via immunohistochemical analysis) that systemic DMOG treatment resulted in a significant increase in HIF-1 $\alpha$  expression in the kidney (47); increased HIF-1 $\alpha$  levels were observed in both NH control and H (hyperoxia-exposed) animals, within the nephrogenic zone and cortical interstitium of the developing kidney at P5. Although western blot analyses of HIF-1 $\alpha$  protein expression did not show a statistically significant difference between groups (and was complicated by the presence of the two separate bands), the general pattern of expression was similar to that of the immunohistochemistry results. Importantly, the observed adverse effects of hyperoxia

exposure on nephrogenesis were shown to be abrogated by the DMOG treatment (and consequent increase in HIF-1 $\alpha$  expression) which highlights the role of HIF signaling during nephrogenesis. Both nephrogenic zone width and glomerular size were increased in the hyperoxia-exposed DMOG-treated animals to levels equivalent to the NNI normoxic controls. Interestingly, an increase in nephrogenic zone width and glomerular size also paralleled a significant increase in HIF-1 $\alpha$  expression in the NH (normoxic) controls following DMOG treatment. This finding indicates that augmenting HIF-1 $\alpha$  levels in the normoxic environment may be able to enhance ongoing postnatal nephrogenesis. Indeed, the increase in oxygen tension after birth has been previously postulated to trigger the cessation of nephrogenesis in rodents (48); determining the exact role of HIF signaling in renal development is certainly an important area for future research.

In animals assessed at P10, DMOG treatment had no effect on the total number of glomeruli. As discussed above, given that DMOG treatment was only administered at the latter stages of nephrogenesis, it may be expected that the resultant improvements at P5 may not have ultimately resulted in an observable augmentation of nephron endowment. Furthermore, as animals were only administered the DMOG at P2 and P4, it is possible that the treatment protocol was not able to fully counteract the oxygen-induced reduction in HIF-1 $\alpha$  expression for the full 7 days of hyperoxia exposure. Glomerular density, however, was significantly increased in DMOG-treated NH males compared to saline controls, but no significant difference was observed in females. In accordance with the positive effects on nephrogenesis observed at P5, this finding may be indicative that postnatal HIF stabilization increases nephron endowment in normoxic males; alternatively, given the relatively low numbers of glomeruli in that group (see Figure 4), the nephron density of NH males administered saline may have also been decreased by an unknown mechanism.

HIF-1 $\alpha$  is known to be a major transcriptional regulator of genes involved in nephrogenesis, in particular vascular endothelial growth factor (VEGF) which is an essential factor in the development of the renal vasculature and tubules (49-52). Given the importance of HIF-1 $\alpha$  and VEGF signaling in vascular development (27, 46), it is possible that decreased VEGF expression as a result of the low HIF-1 $\alpha$  levels may have contributed to the reduced glomerular size observed following hyperoxia exposure in the current study. Future studies

involving ultrastructural analyses of the glomeruli and renal vasculature would be important in order to determine whether glomerulogenesis is adversely affected, as well as follow-up studies to determine whether this does result, as hypothesized, in accelerated nephron loss. HIF-1 $\alpha$  also transcriptionally controls the expression of a multitude of genes involved in cell proliferation, differentiation, and apoptosis (27, 53) which supports an extended role for HIF in nephrogenesis besides its known function in vasculogenesis and angiogenesis. In the current study, however, DMOG treatment did not have a significant effect on the number of apoptotic cells in the developing kidney.

Throughout this study we focused on HIF-1 $\alpha$  as it had previously been shown to be expressed in the nephrogenic zone of the developing kidney (46); however, it is possible that another HIF isoform, HIF-2 $\alpha$ , may also be involved in the observed improvements in cell survival, glomerular size and nephrogenic zone width following DMOG treatment in the current study. In the developing kidney, HIF-2 $\alpha$  expression is limited to interstitial cells of the medulla, podocytes, and endothelial cells (46); the localisation of HIF-2 $\alpha$  to the glomeruli suggests a possible role in the development and/or maintenance of glomerular capillaries. In other studies, HIF-2 $\alpha$  has been shown (independently of HIF-1 $\alpha$ ) to be involved in the regulation of Oct4 (stem cell factor) expression (54), to regulate antioxidant gene expression (55), and it is also protective against ischaemia-reperfusion injury in the kidney (56) but overall its role in renal development remains uncertain (45). Additionally, it should be noted that besides the prevention of oxygen-induced HIF degradation, PHD inhibitors such as the oxoglutarate analogue DMOG likely independently influence other pathways, including NF $\kappa$ B signaling and vascular development (57). In this regard, the body weight of DMOG-treated animals was significantly reduced at P10 suggestive of an adverse effect on growth (either via biochemical changes, or perhaps through peritoneal irritation following injection). Further studies are required in order to fully elucidate the role of the HIF isoforms (and/or PHD) in nephrogenesis and apoptosis.

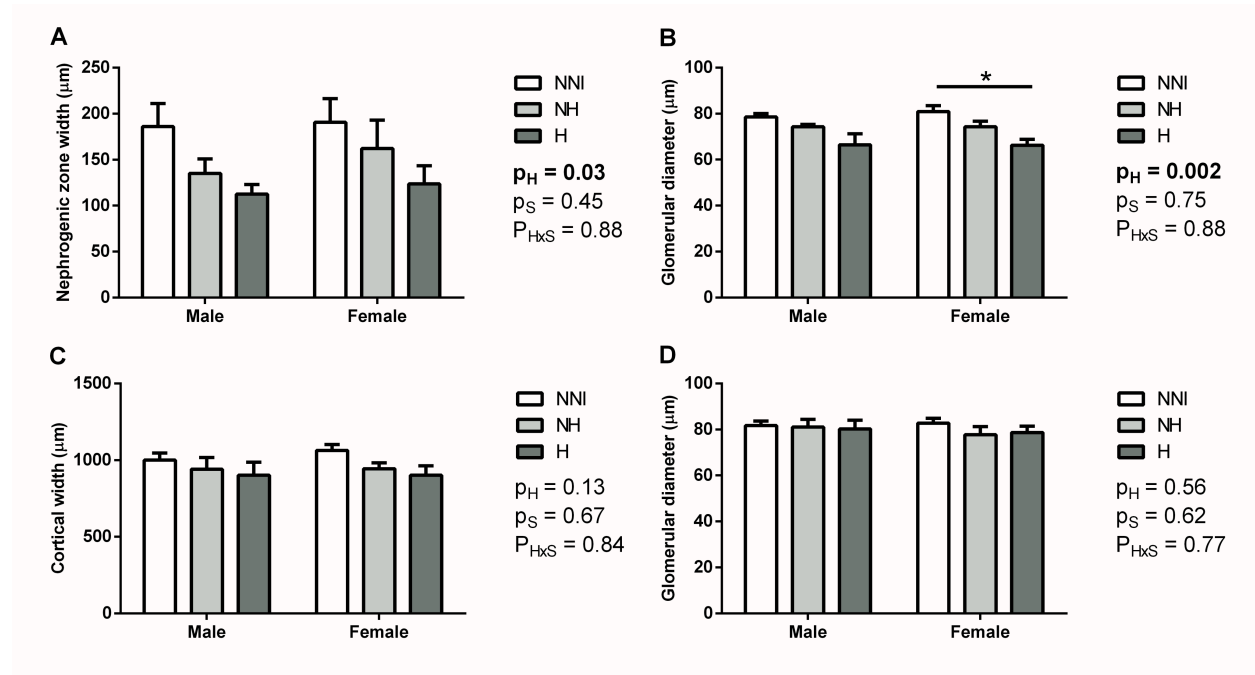


## **Conclusions**

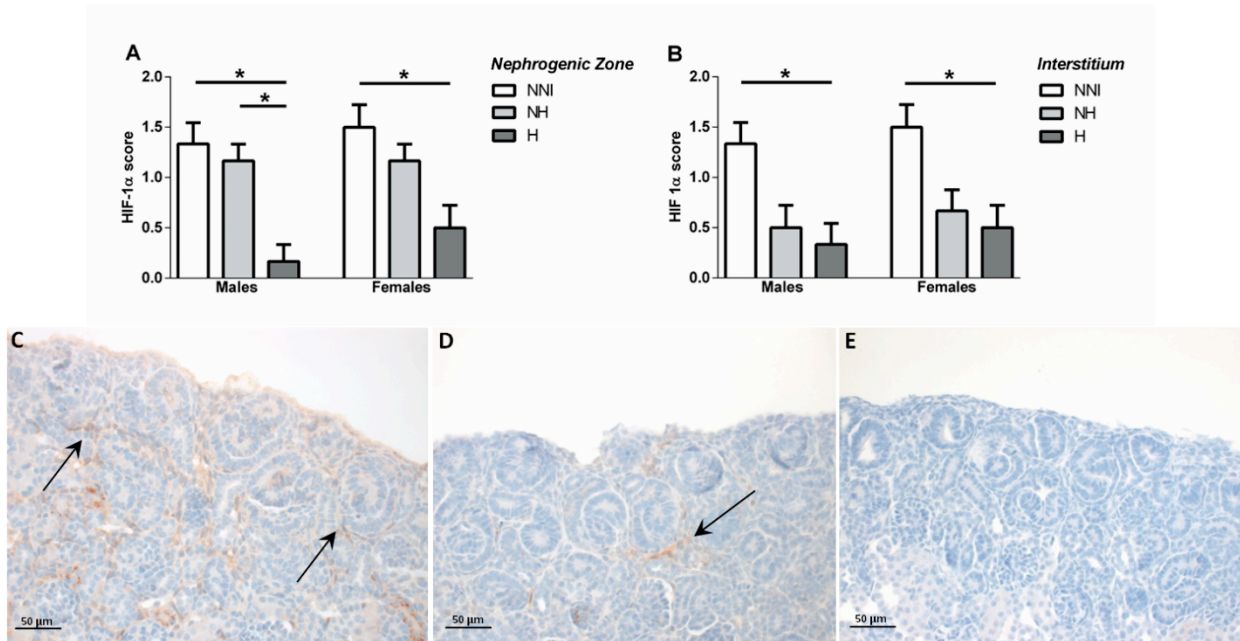
Overall, the findings of this study support the premise that neonates exposed prematurely to the oxygen-rich extrauterine environment are vulnerable to impaired renal development. We have shown that transient hyperoxia exposure, at a time when renal development was still ongoing, results in impaired nephrogenesis in the neonatal rat kidney. Although nephron number was not significantly reduced at the completion of nephrogenesis, the early indicators of maldevelopment suggest the potential for later nephron loss. Importantly, hyperoxia exposure significantly reduced HIF-1 $\alpha$  expression. By using DMOG treatment to prevent the oxygen-induced reduction in HIF-1 $\alpha$  we have shown that the adverse effects of hyperoxia exposure on nephrogenesis may be HIF-1 $\alpha$ -mediated. Maintaining HIF-1 $\alpha$  levels in the kidney may allow ongoing nephrogenesis to proceed and improve the long-term renal health of infants born preterm.

## 3.6 Figures and tables

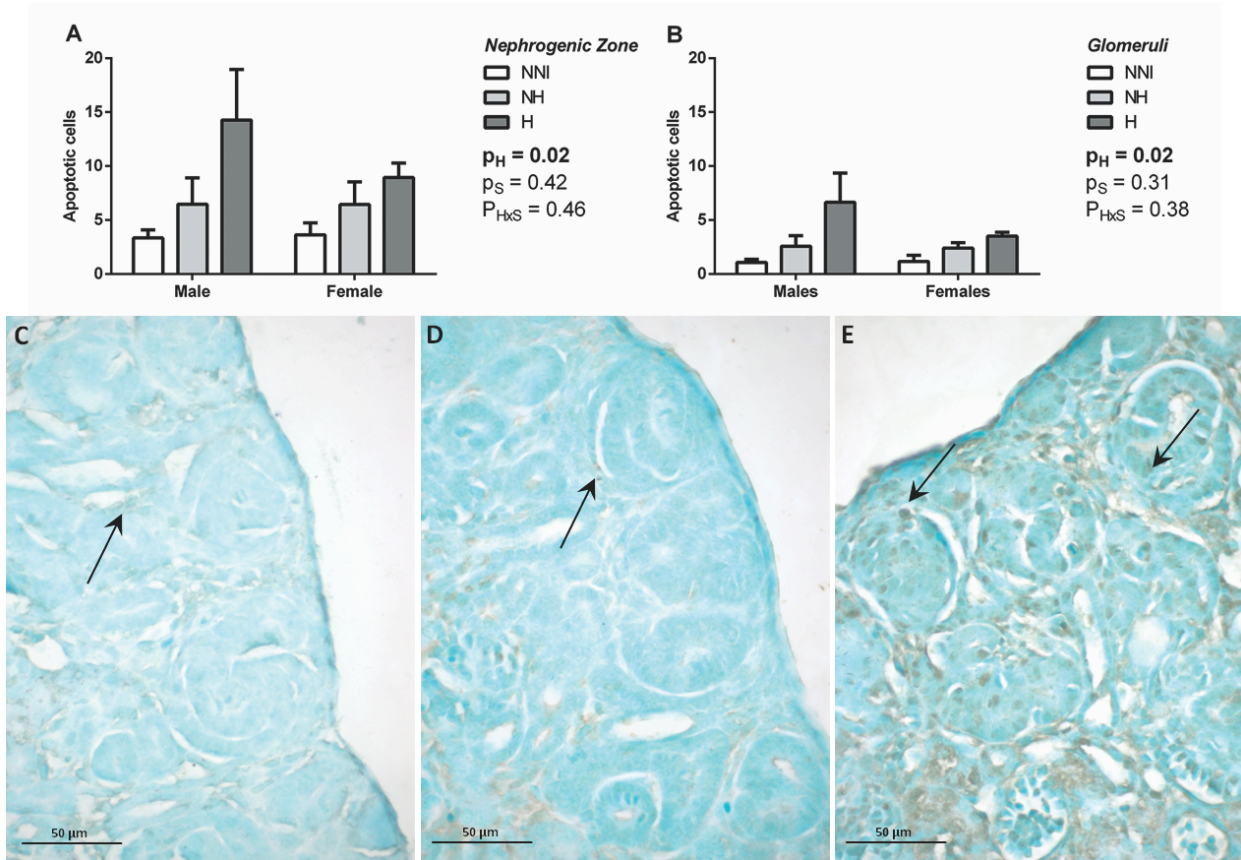
### Figure legends



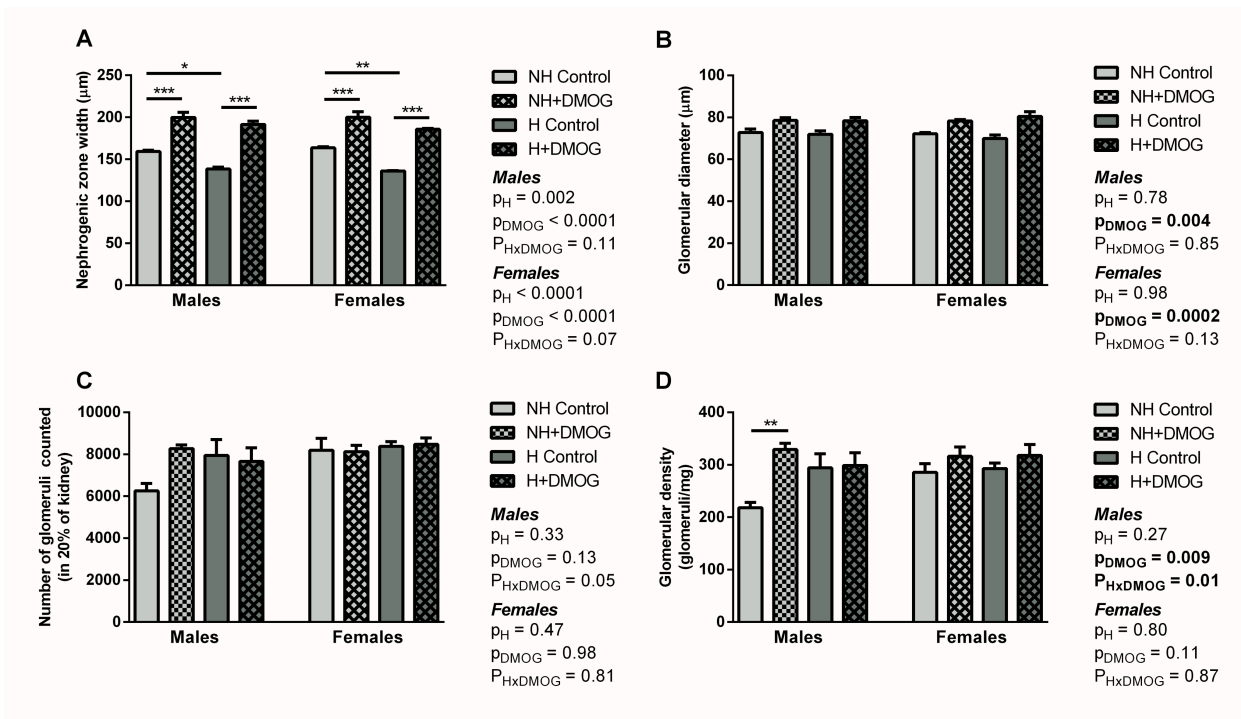
**Figure 1:** Nephrogenic zone width (A), glomerular diameter (B, D) and cortical width (C) in male and female animals from control (NNI, NH) and hyperoxia-exposed (H) groups at P5 (A-B) and P10 (C-D). There was a significant effect of hyperoxia exposure (p<sub>H</sub>) on nephrogenic zone width and glomerular diameter at P5 (A-B), but no effect at P10 (C-D). There was no effect of sex (p<sub>S</sub>) on any parameter. \*p<0.05 according to Bonferroni post-hoc analysis.



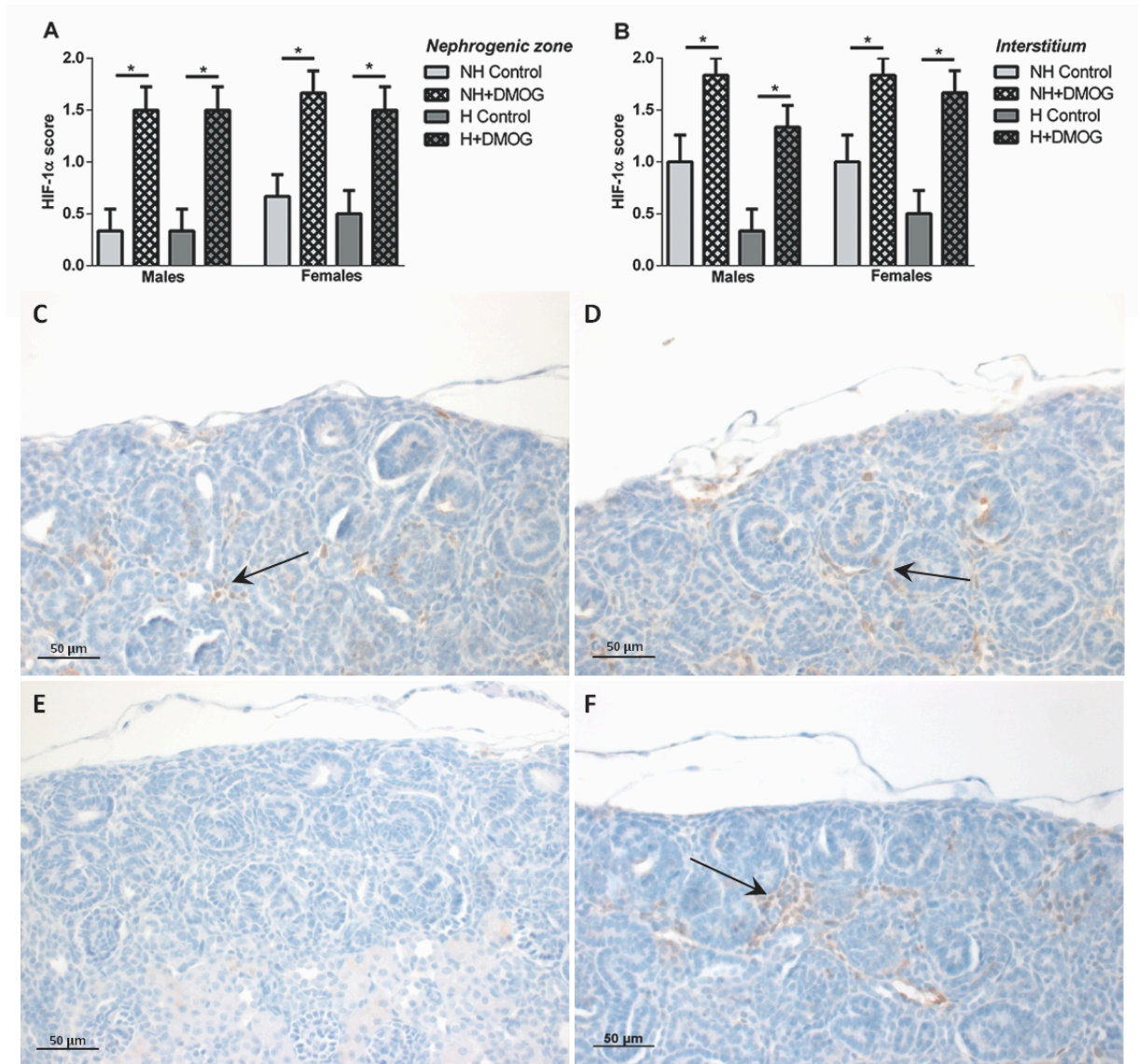
**Figure 2:** HIF-1 $\alpha$  score (indicating the percentage of cells positive for HIF-1 $\alpha$  expression) in the nephrogenic zone (A) and the cortical interstitium (B) in male and female animals from control (NNI, NH) and hyperoxia-exposed (H) groups at P5. \* $p < 0.05$  between groups as indicated. Representative photomicrographs of HIF-1 $\alpha$  expression (indicated by brown staining; arrows) in the nephrogenic zone of NNI (C), NH (D) and H animals (E) at P5.



**Figure 3:** The number of apoptotic cells in the area of nephrogenic zone (A) and glomeruli (B) of male and female animals from control (NNI, NH) and hyperoxia-exposed (H) groups at P5. There was a significant effect of hyperoxia exposure ( $p_H$ ) on the number of apoptotic cells, but no effect of sex ( $p_S$ ). Representative photomicrographs of TUNEL staining of apoptotic cells (indicated by brown staining; arrows) in the nephrogenic zone of NNI (C), NH (D) and H animals (E) at P5.



**Figure 4:** Nephrogenic zone width (A) and glomerular diameter (B) in NH and H males and females at P5 that were treated with DMOG, compared to saline-treated controls. There was a significant effect of hyperoxia exposure (p<sub>H</sub>) and DMOG treatment (p<sub>DMOG</sub>) on nephrogenic zone width in males and females (A). There was a significant effect of DMOG treatment (p<sub>DMOG</sub>), but no effect of hyperoxia (p<sub>H</sub>), on glomerular diameter in both males and females (B). The number of counted glomeruli in 20% of the kidney (C) and glomerular density (D) in in NH and H males and females at P5 that were treated with DMOG, compared to saline-treated controls. There was no significant difference in glomerular number between groups, but glomerular density was significantly increased in NH+DMOG males. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 according to Bonferroni post-hoc analysis.



**Figure 5:** HIF-1 $\alpha$  score (indicating the percentage of cells positive for HIF-1 $\alpha$  expression) in the nephrogenic zone (A) and the cortical interstitium (B) in NH and H males and females at P5 that were treated with DMOG, compared to saline-treated controls. \* $p < 0.05$  between groups as indicated. Representative photomicrographs of HIF-1 $\alpha$  expression (indicated by brown staining; arrows) in the nephrogenic zone of NH Control (C), NH+DMOG (D), H Control (E) and H+DMOG (F) animals at P5.

**Table 1: Average body weight, kidney weight, and kidney to body weight ratio in H, NH and NNI pups at P5 and P10, and in NaCl and DMOG treated NH and H animals at P5 and P10.**

	Body Weight (g)		Kidney Weight (g)		Kidney to Body Weight Ratio (mg/g)	
	<i>Male</i>	<i>Female</i>	<i>Male</i>	<i>Female</i>	<i>Male</i>	<i>Female</i>
<b>P5</b>						
<b>NNI</b>	9.61 ± 0.18	9.02 ± 0.43	0.059 ± 0.002	0.056 ± 0.004	6.08 ± 0.39	6.24 ± 0.60
<b>NH</b>	10.39 ± 0.34	9.90 ± 0.29	0.064 ± 0.007	0.069 ± 0.003	6.15 ± 0.55	6.92 ± 0.16
<b>H</b>	9.64 ± 0.85	9.22 ± 0.77	0.050 ± 0.008	0.057 ± 0.008	5.16 ± 0.88	6.16 ± 0.48
<b>P10</b>						
<b>NNI</b>	21.97 ± 1.37	23.33 ± 1.13	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.01	6.84 ± 0.56	7.23 ± 0.21
<b>NH</b>	21.33 ± 0.81	22.17 ± 2.16	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.03	7.21 ± 0.23	7.41 ± 0.48
<b>H</b>	23.60 ± 1.96	21.60 ± 1.23	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	6.62 ± 0.54	6.42 ± 0.48
<b>P5 DMOG</b>						
<b>NH Control</b>	11.35 ± 1.28	13.68 ± 1.79	0.075 ± 0.009	0.093 ± 0.008	6.67 ± 0.32	6.72 ± 0.40
<b>NH+DMOG</b>	12.55 ± 1.87	10.66 ± 0.18	0.080 ± 0.000	0.073 ± 0.003	6.46 ± 0.82	6.92 ± 0.29
<b>H Control</b>	10.79 ± 0.20	11.01 ± 0.64	0.070 ± 0.006	0.075 ± 0.006	6.39 ± 0.43	6.77 ± 0.31
<b>H+DMOG</b>	10.17 ± 0.46	9.99 ± 0.47	0.070 ± 0.004	0.070 ± 0.006	6.67 ± 0.19	7.06 ± 0.19
<b>P10 DMOG</b>						
<b>NH Control</b>	31.52 ± 0.94	32.15 ± 0.75	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	6.65 ± 0.35	6.75 ± 0.29
<b>NH+DMOG</b>	28.66 ± 0.99*	29.03 ± 1.00*	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	6.75 ± 0.17	6.91 ± 0.23
<b>H Control</b>	31.92 ± 0.57	32.12 ± 1.05	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	6.54 ± 0.20	6.82 ± 0.16
<b>H+DMOG</b>	29.55 ± 0.23*	29.87 ± 0.85*	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	6.67 ± 0.21	7.08 ± 0.18

Data shown as mean ± SEM. \*p<0.01 DMOG versus Control.

### 3.7 References

1. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest.* 1991;64(6):777-84.
2. Sutherland MR, Gubhaju L, Moore L, Kent AL, Dahlstrom JE, Horne RS, et al. Accelerated maturation and abnormal morphology in the preterm neonatal kidney. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2011;22(7):1365-74. Epub 2011/06/04.
3. Rodriguez MM, Gomez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr Dev Pathol.* 2004;7:17-25.
4. Cooper R, Atherton K, Power C. Gestational age and risk factors for cardiovascular disease: evidence from the 1958 British birth cohort followed to mid-life. *Int J Epidemiol.* 2009;38(1):235-44. Epub 2008/07/29.
5. Bonamy AK, Martin H, Jorreskog G, Norman M. Lower skin capillary density, normal endothelial function and higher blood pressure in children born preterm. *J Intern Med.* 2007;262(6):635-42. Epub 2007/11/08.
6. Doyle LW, Faber B, Callanan C, Morley R. Blood pressure in late adolescence and very low birth weight. *Pediatrics.* 2003;111(2):252-7. Epub 2003/02/04.
7. Kwinta P, Klimek M, Drozd D, Grudzien A, Jagla M, Zasada M, et al. Assessment of long-term renal complications in extremely low birth weight children. *Pediatric Nephrology.* 2011;26(7):1095-103. Epub 2011/04/05.
8. Keijzer-Veen MG, Devos AS, Meradji M, Dekker FW, Nauta J, van der Heijden BJ. Reduced renal length and volume 20 years after very preterm birth. *Pediatric Nephrology.* 2010;25:499-507. Epub 2009/12/17.
9. Zaffanello M, Brugnara M, Bruno C, Franchi B, Talamini G, Guidi G, et al. Renal function and volume of infants born with a very low birth-weight: a preliminary cross-sectional study. *Acta Paediatr.* 2010;99(8):1192-8. Epub 2010/03/27.



10. Iacobelli S, Loprieno S, Bonsante F, Latorre G, Esposito L, Gouyon JB. Renal function in early childhood in very low birthweight infants. *Am J Perinatol*. 2007;24(10):587-92. Epub 2007/11/01.
11. Rodriguez-Soriano J, Aguirre M, Oliveros R, Vallo A. Long-term renal follow-up of extremely low birth weight infants. *Pediatric Nephrology*. 2005;20:579-84.
12. Nuyt AM, Alexander BT. Developmental programming and hypertension. Current opinion in nephrology and hypertension. 2009;18(2):144-52. Epub 2009/05/13.
13. Yzydorczyk C, Comte B, Cambonie G, Lavoie JC, Germain N, Ting Shun Y, et al. Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension*. 2008;52(5):889-95. Epub 2008/10/15.
14. Nuyt AM. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(1):1-17. Epub 2007/12/01.
15. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2010;15(4):191-5. Epub 2010/05/11.
16. Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, Garcia-Sala F, Vina J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr*. 2003;142(3):240-6. Epub 2003/03/18.
17. Vento M, Asensi M, Sastre J, Garcia-Sala F, Pallardo FV, Vina J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics*. 2001;107(4):642-7. Epub 2001/05/23.
18. Lee YS, Chou YH. Antioxidant profiles in full term and preterm neonates. *Chang Gung Med J*. 2005;28(12):846-51. Epub 2006/03/07.
19. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovacs A, Kovacs L, et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002;103(2):136-9. Epub 2002/06/19.
20. Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2001;13(2):147-53. Epub 2001/04/24.
21. Park AM, Sanders TA, Maltepe E. Hypoxia-inducible factor (HIF) and HIF-stabilizing agents in neonatal care. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2010;15(4):196-202. Epub 2010/07/06.

22. Tufro-McReddie A, Norwood VF, Aylor KW, Botkin SJ, Carey RM, Gomez RA. Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. *Dev Biol.* 1997;183(2):139-49. Epub 1997/03/15.
23. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292(5516):468-72. Epub 2001/04/09.
24. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-8.
25. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & development.* 1998;12(2):149-62. Epub 1998/03/07.
26. Compernelle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, et al. *Cardia bifida*, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovascular research.* 2003;60(3):569-79. Epub 2003/12/09.
27. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine.* 2003;9(6):677-84. Epub 2003/06/05.
28. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;394(6692):485-90. Epub 1998/08/11.
29. Sears JE, Hoppe G, Ebrahim Q, Anand-Apte B. Prolyl hydroxylase inhibition during hyperoxia prevents oxygen-induced retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(50):19898-903. Epub 2008/12/06.
30. Murawski IJ, Maina RW, Gupta IR. The relationship between nephron number, kidney size and body weight in two inbred mouse strains. *Organogenesis.* 2010;6(3):189-94. Epub 2011/01/05.
31. Li N, Yi F, Sundry CM, Chen L, Hilliker ML, Donley DK, et al. Expression and actions of HIF prolyl-4-hydroxylase in the rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(1):F207-16. Epub 2006/08/04.

32. Groulx I, Lee S. Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(15):5319-36. Epub 2002/07/09.
33. Sutherland MR, O'Reilly M, Kenna K, Ong K, Harding R, Sozo F, et al. Neonatal hyperoxia: effects on nephrogenesis and long-term glomerular structure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(10):F1308-16. Epub 2013/02/22.
34. Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4:a008300. Epub 2012/05/03.
35. Balasubramaniam V, Mervis CF, Maxey AM, Markham NE, Abman SH. Hyperoxia reduces bone marrow, circulating, and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;292(5):L1073-84. Epub 2007/01/09.
36. Dreher D, Rochat T. Hyperoxia induces alkalinization and dome formation in MDCK epithelial cells. *Am J Physiol*. 1992;262(2 Pt 1):C358-64. Epub 1992/02/01.
37. Gore A, Muralidhar M, Espey MG, Degenhardt K, Mantell LL. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease. *Journal of immunotoxicology*. 2010;7(4):239-54. Epub 2010/07/01.
38. Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1010:405-16. Epub 2004/03/23.
39. Gubhaju L, Sutherland MR, Yoder BA, Zulli A, Bertram JF, Black MJ. Is nephrogenesis affected by preterm birth? Studies in a non-human primate model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(6):F1668-77. Epub 2009/09/18.
40. Clark RH, Thomas P, Peabody J. Extrauterine growth restriction remains a serious problem in prematurely born neonates. *Pediatrics*. 2003;111(5 Pt 1):986-90. Epub 2003/05/03.
41. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2011;20(1):7-15. Epub 2010/11/26.
42. Bacchetta J, Harambat J, Dubourg L, Guy B, Liutkus A, Canterino I, et al. Both extrauterine and intrauterine growth restriction impair renal function in children born very preterm. *Kidney International*. 2009;76(4):445-52. Epub 2009/06/12.

43. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney International*. 2000;58:770-3.
44. Freeburg PB, Robert B, St John PL, Abrahamson DR. Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 during glomerular development. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003;14(4):927-38. Epub 2003/03/28.
45. Gunaratnam L, Bonventre JV. HIF in kidney disease and development. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(9):1877-87. Epub 2009/01/02.
46. Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Munchenhagen PM, Grone HJ, Frei U, et al. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney International*. 2006;69(1):114-22. Epub 2005/12/24.
47. Song YR, You SJ, Lee YM, Chin HJ, Chae DW, Oh YK, et al. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2010;25(1):77-85. Epub 2009/09/10.
48. Brunskill EW, Lai HL, Jamison DC, Potter SS, Patterson LT. Microarrays and RNA-Seq identify molecular mechanisms driving the end of nephron production. *BMC Dev Biol*. 2011;11:15. Epub 2011/03/15.
49. Tufro A, Norwood V, Carey R, Gomez R. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999;10(10):2125-34.
50. Karihaloo A, Karumanchi SA, Cantley WL, Venkatesha S, Cantley LG, Kale S. Vascular endothelial growth factor induces branching morphogenesis/tubulogenesis in renal epithelial cells in a neuropilin-dependent fashion. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(17):7441-8. Epub 2005/08/19.
51. Mattot V, Moons L, Lupu F, Chernavsky D, Gomez RA, Collen D, et al. Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13(6):1548-60. Epub 2002/06/01.

52. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest.* 2003;111(5):707-16. Epub 2003/03/06.
53. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological reviews.* 2012;92(3):967-1003. Epub 2012/07/20.
54. Covelto KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development.* 2006;20(5):557-70. Epub 2006/03/03.
55. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*<sup>-/-</sup> mice. *Nature genetics.* 2003;35(4):331-40. Epub 2003/11/11.
56. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Kato H, Yamashita T, Sakiyama A, et al. Protective role of hypoxia-inducible factor-2alpha against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2007;18(4):1218-26. Epub 2007/03/09.
57. Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell death and differentiation.* 2008;15(4):635-41. Epub 2008/02/09.

## **4. Discussion**

Ce travail illustre l'influence de l'exposition à l'oxygène en période néonatale sur le développement rénal. Celle-ci se manifeste par la diminution de la zone de néphrogenèse et du diamètre glomérulaire précoce et est associée à la suppression de l'expression du HIF-1 $\alpha$ . Sa restauration aux niveaux physiologiques mène à la normalisation de la structure rénale.

### **4.1 L'impact de l'hyperoxie sur la néphrogenèse**

Tel que mentionné, notre groupe a précédemment identifié des altérations au niveau cardiovasculaire et rénal chez des rats exposés en période néonatale à des concentrations supraphysiologiques d'oxygène, notamment une réduction de 25% du nombre de néphrons par rapport au groupe contrôle (53). Le but de la présente étude a été donc de détailler davantage les effets et de commencer à élucider les mécanismes responsables de ces conséquences sur le rein en développement. Devant cette diminution du capital néphronique, nos hypothèses pour l'expliquer sont, soit un développement déficitaire, soit une perte précoce et accélérée de néphrons ou la combinaison de ces deux.

La première constatation en comparant nos groupes expérimentaux a été l'amointrissement de la zone de néphrogenèse. Pour la mesurer, on s'assure d'inclure seulement la région du cortex rénal (entre la médullaire et la capsule rénale) qui contient les formes immatures de néphrons : les corps en virgule et les corps en S. Sa réduction suggère une croissance rénale déficiente chez les rats exposés à l'hyperoxie. À l'appui vient notre deuxième observation : la diminution du diamètre moyen des glomérules matures à P5, après 48 heures d'hyperoxie. Ce fait est remarquablement semblable avec les trouvailles histologiques chez l'humain et le babouin quand ceux-ci sont exposés à plus d'oxygène qu'attendu pour un certain âge gestationnel (26, 28). Il semblerait ainsi que, dans le cas d'un sujet né prématurément, même l'exposition à l'équivalent de l'air ambiant représente une augmentation de la concentration d'oxygène qui perturbe la néphrogenèse. Ce processus est fort probablement multifactoriel.

## **4.2 Mécanismes sous-tendant la perte néphronique**

### **4.2.1 La cessation de la néphrogenèse**

La cause précise de l'arrêt de la néphrogenèse n'a pas encore été identifiée. Cependant, la perte progressive du mésenchyme métanéphrique non différencié pourrait en représenter une. Plusieurs facteurs y contribueraient : l'épuisement du blastème par manque de renouvellement, la mort cellulaire programmée au sein de celui-ci ou une différenciation accélérée en néphrons matures.

Chez la souris, des observations supportent l'hypothèse d'une maturation rapide et synchrone du blastème métanéphrique qui mène à son épuisement (74). Aussi, lorsqu'elles sont exposées à des fortes concentrations d'oxygène, des cellules épithéliales rénales canines subissent un processus de formation des dômes (« dôme formation »). Ce phénomène comporte un transport actif d'eau et des ions qui est caractéristique aux cellules épithéliales rénales matures (75). Ensemble, l'hyperoxie causerait ainsi une spécialisation précoce et la perte du caractère non différencié, accélérant la consommation des cellules progénitrices. Ces hypothèses n'ont pas encore été prouvées chez l'humain ni démontrées dans la présente étude, soit dans notre modèle animal.

### **4.2.2 L'apoptose**

La mort cellulaire programmée fait partie du développement rénal normal (76). Cependant, lorsque nous avons quantifié le nombre de cellules apoptotiques chez nos groupes expérimentaux, on en a constaté une augmentation significative chez les animaux exposés à l'hyperoxie par rapport au groupe contrôle. Celle-ci a été mise en évidence dans la zone de néphrogenèse (ou se situe le blastème métanéphrogène) et aussi dans les glomérules. On peut donc suspecter la contribution d'une mort cellulaire amplifiée au développement rénal sous-optimal.

La naissance implique une augmentation marquée du stress oxydatif. Ce dernier peut persister jusqu'à quatre semaines après l'exposition à des fortes concentrations d'oxygène

(77). Surtout au niveau pulmonaire, l'hyperoxie est connue pour causer des dommages tissulaires. Le terme HALI (pour « hyperoxia-induced acute lung injury ») est utilisé pour décrire des changements inflammatoires importants qui mènent à la destruction des macrophages, cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires. La génération massive des ROS par le stress oxydatif accru serait le facteur déclenchant (78, 79).

### **4.3 L'implication du HIF-1 $\alpha$ dans le développement rénal**

Dans notre modèle, l'abondance du HIF-1 $\alpha$  détectée par immunohistochimie au niveau du tissu rénal a été significativement réduite par l'exposition à l'oxygène. La baisse la plus marquée a été observée, autant chez les mâles que chez les femelles, dans la zone active de néphrogenèse. Tel que détaillé plus haut, en conditions normoxiques, le HIF-1 $\alpha$  est rapidement dégradé. Toutefois, à notre connaissance, nos trouvailles sont les premières à rapporter une diminution supplémentaire de son niveau causée par l'exposition à des concentrations élevées d'oxygène en comparaison à la normoxie.

Dans la littérature, on n'a pas encore défini le rôle précis du HIF-1 $\alpha$  dans la néphrogenèse. Cependant, des données existent concernant son expression et sa localisation pendant le développement rénal.

À cette fin, Bernhardt et al. ont utilisé du tissu rénal provenant des fœtus humains pour cibler le HIF-1 $\alpha$  par immunohistochimie. Ils ont mis en évidence que son expression la plus robuste se trouve au niveau de la zone de néphrogenèse. Sa localisation au bout des ramifications du bourgeon urétéral et dans les corps en S suggère ainsi un rôle important dans le développement des structures épithéliales du rein. De plus, le même groupe a aussi démontré sa colocalisation avec le VEGF (80). Ce facteur de croissance vasculaire fait partie de la voie de signalisation du HIF-1 $\alpha$  et son rôle sera détaillé ultérieurement. Conséquemment, le HIF-1 $\alpha$  contribuerait autant à la tubulogenèse qu'à la vasculogenèse rénale.

Ainsi, l'étape suivante de ce projet a impliqué la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  pour mieux pouvoir délinéer son implication dans la néphrogenèse. L'injection intrapéritonéale de la



DMOG en représente une façon efficace avec des effets systémiques qui ont déjà été décrits (81).

Premièrement, malgré l'exposition à 80% d'oxygène, on a prouvé que la DMOG augmentait et rétablissait son expression à un niveau similaire au groupe contrôle demeurant à l'air ambiant. Celle-ci a été quantifiée, de façon similaire, dans la zone de néphrogenèse et dans l'interstitium cortical.

Deuxièmement, on a répété l'évaluation de l'histologie rénale après 48 heures d'exposition à l'oxygène. De manière importante, on a montré que l'administration de la DMOG renversait les effets dommageables de l'hyperoxie : l'épaisseur de la zone de néphrogenèse et le diamètre glomérulaire moyen chez les animaux traités étaient nettement supérieurs comparativement au groupe non traité. Similairement à l'expression du HIF-1 $\alpha$ , ces paramètres histologiques sont restaurés aux niveaux du groupe contrôle à l'air ambiant. Ceci souligne l'importance de ce facteur de transcription dans le développement du rein et implique un certain rôle de l'oxygène dans le contrôle de la néphrogenèse. Cette confirmation est particulièrement importante pour les enfants nés prématurément qui, tel qu'illustré précédemment, naissent avant d'atteindre leur potentiel complet par rapport à l'organogenèse.

Dans certaines conditions, le HIF-1 $\alpha$  est considéré comme un facteur protecteur par rapport à la maladie rénale. Sa stabilisation préalable diminue les dommages en cas d'insulte rénale (AKI – « acute kidney injury ») ou de glomérulonéphrite aiguë. Ceci a aussi été démontré *in vivo* en cas de toxicité rénale causée par le cisplatine, un agent chimiothérapeutique. Également, des modèles de maladie rénale chronique (par néphrectomie unilatérale et induction d'une glomérulonéphrite progressive) démontrent un bénéfice de l'inhibition de sa dégradation (82-85).

Finalement, HIF-1 $\alpha$  contrôle l'expression de la protéine Bcl-2. Cette dernière a un rôle antiapoptotique en inhibant la libération mitochondriale du cytochrome c (86). En contrepartie, la surexpression de la protéine Bax stimule l'apoptose cellulaire par ce même mécanisme en augmentant la sortie du cytochrome c dans le cytosol et l'activation des caspases (87). Au niveau rénal, dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion, la

stabilisation préalable du HIF-1 $\alpha$  produit l'augmentation de l'expression du Bcl-2 et du ratio Bcl-2/Bax. Ceci mène à la diminution de l'apoptose entraînée par Bcl-2 (88).

#### **4.4 VEGF, podocytes et vaisseaux sanguins**

Tel que mentionné dans l'introduction, le VEGF est fortement lié à la croissance des tubules et vaisseaux rénaux et sa neutralisation mène à des anomalies significatives et sévères du développement rénal (89, 90). Son expression ainsi que celle de ses récepteurs est essentiellement contrôlée par le HIF-1 $\alpha$  (91). *Ex vivo*, des explants de métanéphros en culture révèlent une prolifération augmentée quand exposés à des concentrations faibles d'oxygène (3%) comparativement à ceux exposés à l'air ambiant. Ce fait dépend d'une expression augmentée du VEGF, car sa neutralisation par des anticorps prévient la croissance amplifiée des tubules rénaux et des vaisseaux sanguins (92). De plus, dans un modèle expérimental similaire au notre, l'hyperoxie cause un arrêt du développement alvéolaire associé à une diminution du VEGF au niveau pulmonaire chez des rats exposés à 95% d'oxygène pendant 10 jours (93). Ces données illustrent la complexité du « dialogue » entre les différentes populations cellulaires au niveau rénal : les cellules épithéliales secrètent le VEGF qui assure la prolifération et le maintien des vaisseaux sanguins et en même temps protège la survie des cellules épithéliales (94).

Ce concept n'a pas juste un intérêt théorique ou mécanistique: son importance est essentielle pour une fonction rénale normale. Ainsi, les podocytes sont les cellules épithéliales glomérulaires qui ensemble avec les capillaires forment la barrière de filtration glomérulaire. L'intégrité de cette barrière participe à maintenir l'homéostasie de l'organisme par l'excrétion des résidus du métabolisme et le contrôle de la balance hydro-électrolytique. L'expression du VEGF par les podocytes s'est avérée primordiale pour le développement et le maintien de cette structure complexe. Son absence ou son surexpression mènent à un développement rénal anormal avec une fonction altérée (95, 96).

## Conclusion et perspectives

Dans notre modèle expérimental, la diminution du capital néphronique à l'âge adulte observée chez les rats ayant été exposés à l'oxygène en période néonatale est associée à une néphrogenèse sous optimale et la suppression de l'expression du HIF-1 $\alpha$ .

La voie de signalisation du HIF-1 $\alpha$  mérite ainsi une attention particulière dans le développement et la préservation d'une bonne fonction rénale. La famille de ces facteurs de transcription contrôle une multitude de gènes impliqués dans le métabolisme, la prolifération et la mort cellulaire. Le rôle d'une autre isoforme, le HIF-2 $\alpha$ , commence aussi à être détaillé.

Semblable à l'utilisation de tout agent pharmacologique, l'inhibition non sélective des prolyl-hydroxylases par la DMOG administrée de façon systémique serait en mesure de causer des effets secondaires. La diminution du poids observée dans notre groupe pourrait en représenter un, quoique, à ce stade-ci, on ne puisse pas tirer une conclusion ferme en termes de lien de causalité. Évidemment, une recherche exhaustive au niveau des autres organes et systèmes ainsi que sur une période plus longue devrait être entreprise à la recherche de possibles effets négatifs. Vu le potentiel d'inhiber multiples enzymes et voies de signalisation par l'administration systémique, l'étude spécifiquement des prolyl-hydroxylases au niveau rénal apporterait plus d'information sur de potentielles cibles thérapeutiques. Dans le futur, l'avancement de ces connaissances supporterait le développement des stratégies pharmacologiques dont bénéficieraient les enfants nés prématurément.

## Bibliographie

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-128. Epub 2012/12/19.
2. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305. Epub 2004/09/24.
3. Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation*. 2006;74(7):402-21.
4. Dressler GR. Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development*. 2009;136(23):3863-74.
5. Mori K, Yang J, Barasch J. Ureteric bud controls multiple steps in the conversion of mesenchyme to epithelia. *Semin Cell Dev Biol*. 2003;14(4):209-16.
6. Nigam SK, Shah MM. How does the ureteric bud branch? *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1465-9.
7. Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays*. 2006;28(2):117-27.
8. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell*. 2010;18(5):698-712.
9. Brenner BM, Rector FC. Brenner & Rector's the kidney. 7th<sup>e</sup> éd. Philadelphia, Pa.: Saunders; 2004.
10. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev*. 2000;92(1):31-45.
11. Kitamoto Y, Tokunaga H, Miyamoto K, Tomita K. VEGF is an essential molecule for glomerular structuring. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 9:25-7. Epub 2002/10/19.
12. Ballermann BJ. Glomerular endothelial cell differentiation. *Kidney Int*. 2005;67(5):1668-71.

13. Eremina V, Quaggin SE. The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13(1):9-15. Epub 2004/04/20.
14. Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL. The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood*. 2004;103(12):4527-35.
15. Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(10):2125-34. Epub 1999/10/03.
16. Luyckx VA, Bertram JF, Brenner BM, Fall C, Hoy WE, Ozanne SE, et al. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *The Lancet*. 2013;382(9888):273-83.
17. Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992;99(4):296-301. Epub 1992/04/01.
18. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest*. 1991;64(6):777-84. Epub 1991/06/01.
19. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int*. 2000;58(2):770-3. Epub 2000/08/01.
20. Hughson M, Farris AB, 3rd, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int*. 2003;63(6):2113-22. Epub 2003/05/20.
21. Schreuder M, Delemarre-van de Waal H, van Wijk A. Consequences of intrauterine growth restriction for the kidney. *Kidney Blood Press Res*. 2006;29(2):108-25. Epub 2006/07/14.
22. Luyckx VA, Brenner BM. The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):898-910. Epub 2010/02/13.
23. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time

trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*. 2012;379(9832):2162-72. Epub 2012/06/12.

24. Abitbol CL, Rodriguez MM. The long-term renal and cardiovascular consequences of prematurity. *Nature reviews Nephrology*. 2012;8(5):265-74. Epub 2012/03/01.

25. Rodriguez MM, Gomez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr Dev Pathol*. 2004;7(1):17-25. Epub 2004/07/17.

26. Sutherland MR, Gubhaju L, Moore L, Kent AL, Dahlstrom JE, Horne RS, et al. Accelerated maturation and abnormal morphology in the preterm neonatal kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(7):1365-74. Epub 2011/06/04.

27. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, Locci A, Cabras T, et al. Marked interindividual variability in renal maturation of preterm infants: lessons from autopsy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010;23 Suppl 3:129-33. Epub 2010/09/15.

28. Gubhaju L, Sutherland MR, Yoder BA, Zulli A, Bertram JF, Black MJ. Is nephrogenesis affected by preterm birth? Studies in a non-human primate model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(6):F1668-77. Epub 2009/09/18.

29. Keijzer-Veen MG, Devos AS, Meradji M, Dekker FW, Nauta J, van der Heijden BJ. Reduced renal length and volume 20 years after very preterm birth. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(3):499-507. Epub 2009/12/17.

30. Kwinta P, Klimek M, Drozd D, Grudzien A, Jagla M, Zasada M, et al. Assessment of long-term renal complications in extremely low birth weight children. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(7):1095-103. Epub 2011/04/05.

31. Zaffanello M, Brugnara M, Bruno C, Franchi B, Talamini G, Guidi G, et al. Renal function and volume of infants born with a very low birth-weight: a preliminary cross-sectional study. *Acta Paediatr*. 2010;99(8):1192-8. Epub 2010/03/27.

32. Bonamy AK, Martin H, Jorreskog G, Norman M. Lower skin capillary density, normal endothelial function and higher blood pressure in children born preterm. *J Intern Med*. 2007;262(6):635-42. Epub 2007/11/08.

33. de Jong F, Monuteaux MC, van Elburg RM, Gillman MW, Belfort MB. Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension*. 2012;59(2):226-34. Epub 2011/12/14.

34. Doyle LW, Faber B, Callanan C, Morley R. Blood pressure in late adolescence and very low birth weight. *Pediatrics*. 2003;111(2):252-7. Epub 2003/02/04.
35. Abitbol CL, Bauer CR, Montane B, Chandar J, Duara S, Zilleruelo G. Long-term follow-up of extremely low birth weight infants with neonatal renal failure. *Pediatr Nephrol*. 2003;18(9):887-93. Epub 2003/07/02.
36. Rodriguez-Soriano J, Aguirre M, Oliveros R, Vallo A. Long-term renal follow-up of extremely low birth weight infants. *Pediatr Nephrol*. 2005;20(5):579-84. Epub 2005/03/23.
37. Iacobelli S, Loprieno S, Bonsante F, Latorre G, Esposito L, Gouyon JB. Renal function in early childhood in very low birthweight infants. *Am J Perinatol*. 2007;24(10):587-92. Epub 2007/11/01.
38. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989;298(6673):564-7. Epub 1989/03/04.
39. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2(8663):577-80. Epub 1989/09/09.
40. Barker DJ, Bagby SP. Developmental antecedents of cardiovascular disease: a historical perspective. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(9):2537-44. Epub 2005/07/29.
41. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol*. 2002;31(6):1235-9. Epub 2003/01/24.
42. Lackland DT, Bendall HE, Osmond C, Egan BM, Barker DJ. Low birth weights contribute to high rates of early-onset chronic renal failure in the Southeastern United States. *Arch Intern Med*. 2000;160(10):1472-6. Epub 2000/05/29.
43. Hallan S, Euser AM, Irgens LM, Finken MJ, Holmen J, Dekker FW. Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trondelag Health (HUNT 2) Study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2008;51(1):10-20. Epub 2007/12/25.
44. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Hallan S, Iversen BM. Low birth weight increases risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(1):151-7. Epub 2007/12/07.
45. Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, Wang Z. A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int*. 1999;56(3):1072-7. Epub 1999/09/01.

46. White SL, Perkovic V, Cass A, Chang CL, Poulter NR, Spector T, et al. Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2009;54(2):248-61. Epub 2009/04/03.
47. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. 1988;1(4 Pt 1):335-47. Epub 1988/10/01.
48. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(6):1315-25. Epub 2001/05/25.
49. Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy: an inborn cause of adult hypertension and progressive renal injury? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993;2(5):691-5. Epub 1993/09/01.
50. Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1995;26(1):91-8. Epub 1995/07/01.
51. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med*. 2003;348(2):101-8. Epub 2003/01/10.
52. Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, Zimanyi M, Samuel T, Hughson MD. Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(3):258-65. Epub 2008/04/15.
53. Yzydorczyk C, Comte B, Cambonie G, Lavoie JC, Germain N, Ting Shun Y, et al. Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension*. 2008;52(5):889-95. Epub 2008/10/15.
54. Larsson L, Aperia A, Wilton P. Effect of normal development on compensatory renal growth. *Kidney Int*. 1980;18(1):29-35.
55. Lee YM, Jeong CH, Koo SY, Son MJ, Song HS, Bae SK, et al. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn*. 2001;220(2):175-86. Epub 2001/02/13.
56. Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, Garcia-Sala F, Vina J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr*. 2003;142(3):240-6.



57. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:176-82. Epub 2004/08/12.
58. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J*. 1998;17(22):6573-86.
59. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11205-14.
60. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4. Epub 1995/06/06.
61. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1230-7. Epub 1995/01/20.
62. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(5):343-54.
63. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72. Epub 2001/04/09.
64. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP. Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*. 2002;296(5574):1886-9.
65. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature*. 2002;417(6892):975-8.
66. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*. 2001;292(5516):464-8.
67. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107(1):43-54.

68. Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30772-80.
69. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* 2003;22(16):4082-90.
70. Li N, Yi F, Sundry CM, Chen L, Hilliker ML, Donley DK, et al. Expression and actions of HIF prolyl-4-hydroxylase in the rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(1):F207-16.
71. Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, Jurgensen JS, Willam C, Bachmann S, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J.* 2003;17(9):1186-8.
72. Bernhardt WM, Campean V, Kany S, Jurgensen JS, Weidemann A, Warnecke C, et al. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1970-8.
73. Asikainen TM, Schneider BK, Waleh NS, Clyman RI, Ho WB, Flippin LA, et al. Activation of hypoxia-inducible factors in hyperoxia through prolyl 4-hydroxylase blockade in cells and explants of primate lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(29):10212-7.
74. Hartman HA, Lai HL, Patterson LT. Cessation of renal morphogenesis in mice. *Dev Biol.* 2007;310(2):379-87.
75. Dreher D, Rochat T. Hyperoxia induces alkalization and dome formation in MDCK epithelial cells. *Am J Physiol.* 1992;262(2 Pt 1):C358-64.
76. Carev D, Krnic D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babic M. Role of mitotic, proapoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol.* 2006;21(5):627-36.
77. Vento M, Asensi M, Sastre J, Garcia-Sala F, Pallardo FV, Vina J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics.* 2001;107(4):642-7.
78. Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:405-16.

79. Gore A, Muralidhar M, Espey MG, Degenhardt K, Mantell LL. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease. *J Immunotoxicol.* 2010;7(4):239-54.
80. Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Munchenhagen PM, Grone HJ, Frei U, et al. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int.* 2006;69(1):114-22. Epub 2005/12/24.
81. Sears JE, Hoppe G, Ebrahem Q, Anand-Apte B. Prolyl hydroxylase inhibition during hyperoxia prevents oxygen-induced retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(50):19898-903. Epub 2008/12/06.
82. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med (Berl).* 2007;85(12):1325-30.
83. Rosenberger C, Rosen S, Shina A, Frei U, Eckardt KU, Flippin LA, et al. Activation of hypoxia-inducible factors ameliorates hypoxic distal tubular injury in the isolated perfused rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(11):3472-8. Epub 2008/06/03.
84. Song YR, You SJ, Lee YM, Chin HJ, Chae DW, Oh YK, et al. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):77-85.
85. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, Daniel C, Buchholz B, Campean V, et al. HIF activation protects from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(3):486-94. Epub 2008/02/08.
86. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275(5303):1132-6.
87. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM, et al. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene.* 1998;17(26):3401-15.
88. Yang CC, Lin LC, Wu MS, Chien CT, Lai MK. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 alpha-dependent bcl-2 signaling. *Transplantation.* 2009;88(11):1251-60. Epub 2009/12/10.
89. Freeburg PB, Abrahamson DR. Hypoxia-inducible factors and kidney vascular development. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(11):2723-30. Epub 2003/10/22.

90. Kitamoto Y, Tokunaga H, Tomita K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99(10):2351-7. Epub 1997/05/15.
91. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):993-8.
92. Tufro-McReddie A, Norwood VF, Aylor KW, Botkin SJ, Carey RM, Gomez RA. Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. *Dev Biol.* 1997;183(2):139-49. Epub 1997/03/15.
93. Hosford GE, Olson DM. Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2alpha in the newborn rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(1):L161-8.
94. Villegas G, Lange-Sperandio B, Tufro A. Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2005;67(2):449-57. Epub 2005/01/28.
95. Eremina V, Cui S, Gerber H, Ferrara N, Haigh J, Nagy A, et al. Vascular endothelial growth factor a signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(3):724-35.
96. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest.* 2003;111(5):707-16. Epub 2003/03/06.

