

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

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

NOTICE

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

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

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

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

Université de Montréal

**Dissection du rôle fondamental de l'hyperglycémie
sur la morphogenèse rénale**

par

Stella Lê Minh Tran

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)
en Sciences biomédicales

Août, 2008

© Stella Lê Minh Tran, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Dissection du rôle fondamental de l'hyperglycémie
sur la morphogenèse rénale**

présentée par :

Stella Lê Minh Tran

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Lajeunesse, président-rapporteur

Dre Shao-Ling Zhang, directeur de recherche

Dre Lise Coderre, membre du jury

Résumé

Le diabète maternel crée un milieu *in utero* néfaste, mais l'impact sur la néphrogenèse reste encore mal compris. Des souris Hoxb7-green fluorescent protein (GFP) ont été rendues diabétiques par induction à la streptozotocine (STZ) au jour de gestation E13 et la progéniture a été examinée à différents âges après la naissance. Comparée aux animaux contrôles, la progéniture des mères hyperglycémiques démontre un poids corporel, une taille et un poids des reins plus petits ainsi qu'un nombre réduit de néphrons. La dysmorphogenèse rénale observée pourrait être le résultat d'une apoptose augmentée, car l'analyse immunohistochimique révèle une augmentation significative de podocytes apoptotiques ainsi que plus de marquage de l'enzyme caspase-3 active dans les tubules rénaux comparés à la progéniture contrôle. Au niveau des médiateurs possiblement responsables de ces différences, les reins de la progéniture des mères hyperglycémiques présentent une surexpression de l'ARN messager des gènes de l'angiotensine et de la rénine, une activation de la voie NF-kappaB ainsi qu'une régulation à la hausse de ses isoformes p50 et p65. En conclusion, le diabète maternel altère la néphrogenèse possiblement via une stimulation intrarénale du système rénine-angiotensine et de la voie de signalisation NF-kappaB.

Mots-clés : diabète maternel, hyperglycémie, néphrogenèse, évaluation glomérulaire, système rénine-angiotensine, NF-kappaB

Abstract

Maternal diabetes leads to an adverse *in utero* environment, but its effect on impaired nephrogenesis remains unclear. Diabetes was induced with streptozotocine (STZ) in pregnant Hoxb7-green fluorescent protein (GFP) mice at embryonic day 13, and the offspring were examined at several time points after birth. Compared with offspring of non-diabetic controls, offspring of hyperglycaemic mice had lower body weight, body size, kidney weight, and a reduced nephron number. The observed renal dysmorphogenesis may be the result of increased apoptosis, because immunohistochemical analysis revealed significantly more apoptotic podocytes as well as increased active caspase-3 immunostaining in the renal tubules compared with control mice. Regarding potential mediators of these differences, offspring of diabetic mice had increased expression of intrarenal angiotensinogen and renin mRNA, upregulation of NF-kappaB isoforms p50 and p65, and activation of the NF-kappaB pathway. In conclusion, maternal diabetes impairs nephrogenesis, possibly via enhanced intrarenal activation of the renin-angiotensin system and NF-kappaB signaling.

Keywords : maternal diabetes, hyperglycemia, nephrogenesis, glomerular assessment, renin-angiotensin system, NF-kappaB

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiv
1. Introduction.....	1
1.1 Le diabète.....	1
1.2 Le diabète gestationnel.....	2
1.2.1 L'hyperglycémie maternelle légère : phénotype de macrosomie.....	5
1.2.2 L'hyperglycémie maternelle sévère : phénotype de microsomie.....	6
1.3 Pathogenèse de l'embryopathie diabétique.....	7
1.3.1 Diabète gestationnel : anomalies rénales chez la progéniture.....	8
1.4 Le développement rénal.....	9
1.4.1 Pronéphros, mésonéphros et métanéphros.....	9
1.4.2 La néphrogenèse.....	10
1.4.2.1 Les différentes cellules rénales affectées par l'hyperglycémie.....	2
1.4.3 La régulation du développement rénal.....	3
1.4.4 Le système rénine-angiotensine (RAS) et le développement rénal.....	5
1.5 Le diabète maternel et la programmation périnatale.....	7
1.5.1 L'hypothèse de Barker.....	8
1.5.2 Le Bas Poids à la Naissance (BPN) et l'hypothèse du nombre réduit de néphrons (low nephron number, LNN).....	9
1.5.3 Le phénotype économe.....	11

1.6 Mécanismes possibles expliquant la dysmorphogénèse rénale de la progéniture associée à l'hyperglycémie maternelle.....	11
1.6.1 Le stress oxydant.....	11
1.6.2 L'apoptose.....	13
1.6.3 Le système rénine-angiotensine (RAS).....	14
1.6.4 Les facteurs nucléaires de transcription kappa B (NF-kB).....	15
1.7 Modèle expérimental d'étude du diabète gestationnel.....	18
1.7.1 Induction du diabète maternel sévère.....	19
Hypothèse.....	20
Soumission de mémoire par articles	21
Discussion	58
Synthèse	70
Perspectives.....	70
Conclusion	72
Bibliographie.....	I
Stella Lê Minh Tran <i>curriculum vitae</i>	XIX
ANNEXE I	XXI

Liste des tableaux

Tableau I

Facteurs de risque à surveiller afin de tester une hyperglycémie maternelle lors de test médical de routine

Tableau II

Quelques gènes d'importance dans le développement rénal

Tableau III

Facteurs de risque qui prédisposent à IUGR (intrauterine growth retardation, retard de croissance *in utero*)

Liste des figures

Figure 1

Dépistage et diagnostic du GDM (gestational diabetes mellitus).

Figure 2

Étapes séquentielles de la néphrogenèse

Figure 3

Séquence d'événements structuraux de la néphrogenèse

Figure 4

Système rénine-angiotensine classique avec ses sites d'interaction, d'intervention pharmacologiques ainsi que les effets majeurs du RAS (renin-angiotensin system) sur les différents systèmes cardiovasculaires

Figure 5

Théorie de Brenner associant BPN (bas poids de naissance) et LLN (low nephron number)

Figure 6

Les intermédiaires réduits de l'oxygène

Figure 7

Induction des ROS (reactive oxygen species) par l'hyperglycémie

Figure 8

NF-Kb : cible de l'hyperglycémie

Figure 9

NF-kB dans la physiopathologie du diabète

Figure 10

Nouveau-nés de mère diabétique (ODM) et de mère contrôle

Figure 11

Marquage pour l'enzyme caspase-3 active (20X)

Figure 12

ARM messenger pour composantes du système rénine-angiotensine chez le nouveau-né

Liste des abréviations

ACE	angiotensinogen converting enzyme
AGE	advanced glycation end-products, produits terminaux avancés de glycation
Ang II	angiotensine II
AP-1	activator protein 1
AT1-R	récepteur de l'angiotensine II de type 1
AT2-R	récepteur de l'angiotensine II de type 2
BB	BioBreeding
BK	bradykinine
BPN	bas poids de naissance
Casp-3	Caspase 3
CAT	catalase
CFP	cyan fluorescent protein
CRS	caudal regression syndrome
DBA	Dolicho biflorus agglutinin
ECM	extracellular matrix proteins, protéines de la matrice extracellulaire
ESRD	end stage renal disease
EMSA	electrophoretic motility shift assay
FFA	free fatty acids, acides gras libres
FGH	fasting plasma glucose, glucose plasmatique à jeûn
GCT	glucose challenge test

GDM	gestational diabetes mellitus, diabète de gestation
GDNF	glial cell-line-derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
GFR	glomerular filtration rate
GLUT4	transporteur de glucose 4
HAPO	Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome
HE	hématoxyline-oesine
IDF	International Diabetes Federation
IKK	enzyme I κ B kinase
IL-1B	interleukine-1 beta
IMC	indice de masse corporelle
IUGR	intrauterine growth retardation, retard de croissance <i>in utero</i>
JNK	Jun-N terminal Kinase
KAP2	Kidney Androgen-regulated Protein promoter 2
LPS	lipopolysaccharide
LNN	low nephron number
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MM	metanephric mesenchyme, mésenchyme métanéphrique
MGH	mild gestational hyperglycaemia
MnSOD	manganese superoxide dismutase
NADPH	Nicotinamide Adenosine Dinucleotide Phosphate
NF- κ B	facteur nucléaire kappa-B
NICE	National Institute for Health and Clinical Excellence

NO	nitric oxide, oxide nitrique
NOD	non-obese diabetic
NPY	neuropeptide Y
ODM	offspring of diabetic mothers
OGH	overt gestational hyperglycaemia
OGTT	oral glucose tolerance test, hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pax-2	Paired Box Gene 2
PKC	voie protéine kinase C
PKD1	polycystic kidney disease 1
PKD2	polycystic kidney disease 2
PKHD1	polycystic kidney and hepatic disease 1
RAGE	récepteurs des AGE
RAS	renin-angiotensin system, système rénine-angiotensine
RET	Rearranged during Transfection Protooncogenes
ROS	reactive oxygen species, espèces d'oxygène réactif
SM	syndrome métabolique
SOD	superoxide dismutase
STZ	streptozotocine
SVD	Déclaration de St-Vincent
TGF- β	tumor growth factor beta
TNF	tumor necrosis factor
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha

TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling
UB	ureteric bud, bourgeon urétérique
UV	ultraviolet
V_g	volume glomérulaire
WAGR	syndrome de tumeur de Wilms et anomalies uro-génital
WT-1	Wilms Tumor supressor
1hPG	1 hour post-intake glucose
2hPG	2 hours post-intake glucose)

Je tiens à dédier ce travail à mes parents, Maman Chi Linh et Papa Tran Phuc Think, qui ont cru en moi. Avec leur support inconditionnel et amour, j'ai réussi à concrétiser ce rêve qui était de poursuivre une carrière en sciences même si je n'ai pas choisi la médecine (!). Je vous remercie du fond du coeur. Et merci à mon petit frère Binh pour le Ipod Nano qui m'a vraiment été utile dans les moment (lire : heures) de désespoir au microscope.

Remerciements

I would like to thank my supervisor Dr Shao-ling Zhang for trusting me and giving me a chance to discover research and nurture my passion for science. Her unconditional support, guidance and encouragement have given me the opportunity to carry on my graduate studies in the best conditions.

I would also like to thank Dr Chan for his support and pertinent academic and scientific advice throughout my studies.

I would also like to thank all the members of our laboratory at the CHUM. Stacey, Isabelle Marie-Luise, the past years would not have been so fun without you. Thanks for sharing your knowledge and past experiences as well as the laughs and wincing that come with academic research.

1. Introduction

Lors du diabète maternel, le fœtus est exposé à un environnement *in utero* néfaste, ce qui peut altérer l'organogenèse à la fois chez l'humain et dans les modèles animaux (embryopathie diabétique). Le concept de "programmation périnatale", qui prédit que les événements intrautérins et périnataux ont une influence sur la fonction des organes après la naissance, a été bien décrit pour associer un développement embryonnaire perturbé et un risque plus élevé de développer des maladies chroniques telles que l'hypertension et les désordres cardiovasculaires à l'âge adulte. Plus précisément, nous nous intéressons aux malformations congénitales rénales chez le fœtus causées par des conditions d'hyperglycémie.

1.1 Le diabète

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par un taux élevé de glucose dans le sang dû à l'incapacité du corps à contrôler la glycémie. C'est l'insuline, hormone sécrétée par le pancréas, qui est responsable de la régulation métabolique du glucose. Cet excès de glucose non-métabolisé est excrété dans l'urine. Les personnes souffrant de diabète de type 1, souvent des enfants et jeunes adultes, produisent peu ou pas d'insuline, tandis que la personne souffrant de diabète de type 2 n'est pas capable de normaliser sa glycémie car son corps ne peut utiliser efficacement l'insuline. Ce dernier type de diabète, souvent idiopathique, est plus commun chez les personnes âgées de 40 ans et plus et regroupe 90% des cas de diabète. Il est aussi alarmant de voir la prévalence de ce sous-type de maladie de plus en plus élevée dans les populations plus jeunes, autrefois non considérées à risque [1]. L'obésité, la sédentarité, ainsi que la prédisposition génétique sont des facteurs de risques importants qui ont été identifiés comme pouvant précipiter l'apparition du diabète de type 2. Plus de deux millions de Canadiens sont diabétiques et il est estimé que ce chiffre atteindra les 3 millions d'ici l'an 2010 [2]. Catégorisé comme un troisième type de diabète, le diabète gestationnel est habituellement diagnostiqué chez des femmes qui ne présentaient pas de tendance diabétique avant leur grossesse. Une intolérance au glucose, qu'elle soit

diagnostiqué durant la grossesse ou de condition pré-existante, définit le diabète de gestation.

Les dégénérescences pathologiques dues à l'exposition à des niveaux élevés de glucose affectent gravement les systèmes oculaire, nerveux et circulatoire. Le diabète est aussi une des causes premières de néphropathie et de cardiopathie : 10-20% des personnes diabétiques décèdent des suites d'une insuffisance rénale et près de 50% des diabétiques succombent à des complications cardiovasculaires [3]. Afin de minimiser les risques de dommages aux organes associés à une hyperglycémie chronique, le contrôle du diabète est primordial. Mondialement, 5% de la mortalité globale est reliée aux complications du diabète et ces chiffres pourraient augmenter de 50% si aucune action à grande échelle n'est prise pour contrôler cette menace grandissante [4].

1.2 Le diabète gestationnel

La prévalence du diabète gestationnel (gestational diabetes mellitus, GDM) varie selon les méthodes de diagnostic ainsi que les populations à risque de développer le diabète. Entre 3 et 8 femmes sur 100 présenteront un diagnostic de GDM, mais ce chiffre peut atteindre près de 12% chez les femmes aborigènes [5-7]. À l'exception des patientes présentant un diabète pré-existant, le contrôle de la glycémie maternelle redevient habituellement normal après la naissance de l'enfant mais cet antécédant augmente les risques de la mère de développer du diabète de type 2 après l'accouchement [8]. Il est suggéré que les changements hormonaux durant la grossesse interfèrent avec la capacité du corps à utiliser efficacement son insuline pour régulariser la glycémie de la femme gestante.

En 2002, le groupe de recherche HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome) résume une perspective de 10 ans couvrant plus de 25 000 patientes dans 7 pays [9]. Cette étude tentait d'établir les critères de diagnostic du diabète gestationnel ainsi que les valeurs seuils de corrélation entre l'hyperglycémie maternelle et les conséquences néfastes sur la

périnatalité [10]. En attendant les hypothèses et conclusions de cette étude détaillée, l'*American Diabetes Association* recommande la surveillance des grossesses diabétiques à risques pour le fœtus, surtout dans les situations où le FGH (fasting plasma glucose, glucose plasmatique à jeûn) est ≥ 5.8 mmol/L ou 105 mg/dL [11].

La prévention des effets néfastes du diabète gestationnel commence par l'identification de la pathologie. La *Canadian Diabetes Association* suggère de tester systématiquement les femmes gestantes entre 24-28 semaines de gestation, avec double vigilance durant le premier trimestre avec ré-évaluation ultérieure durant la grossesse pour les populations à risque présentant les critères présentés au tableau I.

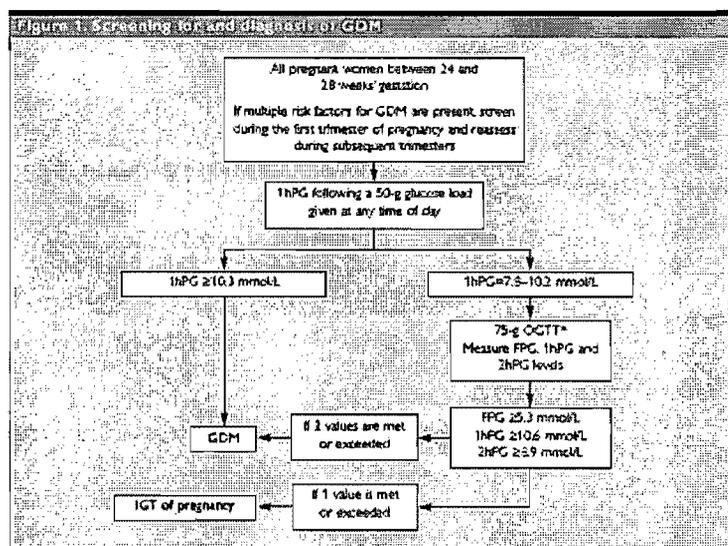
Tableau I : Facteurs de risque à surveiller afin de tester une hyperglycémie maternelle lors de test médical de routine. Tiré du Canadian Diabetes Association, 2008 [12]

Critères prédisposant au développement du diabète gestationnel
Âge ≥ 35 ans Obésité : indice de masse corporelle (IMC) >30 kg/m ² Antécédant de diabète gestationnel Antécédant de grossesse avec nouveau-né macrosomique (> 4500 g) Antécédent familial de diabète maternel (membre de la famille au premier degré) Origine familiale avec prévalence de diabète gestationnel élevée (Asie de l'Est, Caraïbes Noire, Moyen-Orient)

Considérée comme une condition pré-diabétique, l'intolérance au glucose signifie que la régulation du glucose est altérée mais que l'hyperglycémie qui en découle n'est pas assez sévère pour un diagnostic de diabète. Généralement, le premier test de dépistage recommandé est un test de mesure du glucose plasmatique 1 heure après bolus de 50g de glucose administré sans jeûn (glucose challenge test, GCT). Toutefois, un deuxième test est administré si la patiente démontre des valeurs de glucose plasmatique entre 7.8 et 10.2 mmol/L au point 1hPG (1 hour post-intake glucose) lors du GCT. Le second test, soit un

test de tolérance au glucose oral (oral glucose tolerance test, OGTT / hyperglycémie provoquée par voie orale HGPO) de 75g de glucose, consiste en 3 mesures de glycémie, soit FPG, 1hPG et 2hPG [13]. Un résumé de la procédure de dépistage recommandée par la *Canadian Diabetes Association* est présenté à la figure 1 indiquant que deux tests avec lectures de glycémie anormales sont généralement nécessaires pour diagnostiquer un diabète gestationnel. Une diète contrôlée ainsi qu'un régime d'exercice approprié jouent des rôles-clé dans le maintien d'une glycémie cible. Ultiment, un traitement à l'insuline ou des agents hypoglycémiques tels que le metformin peuvent être prescrits pour aider à traiter l'hyperglycémie maternelle [14].

Figure 1 : Dépistage et diagnostic du GDM. Tiré du Canadian Diabetes Association, 2008 [15]



*In view of the controversies about diagnostic tests, other accepted methods may be used

1hPG = 1-hour plasma glucose
2hPG = 2-hour plasma glucose
FPG = fasting plasma glucose
GDM = gestational diabetes mellitus
IGT = impaired glucose tolerance
OGTT = oral glucose tolerance test

1.2.1 L'hyperglycémie maternelle légère : phénotype de macrosomie

L'hyperglycémie maternelle légère (mild gestational hyperglycemia, MGH) est caractérisée par des valeurs de glycémie d'environ 20% plus élevées que la normale. L'inquiétude première associée avec une situation de MGH est le risque plus élevé de donner naissance à un bébé macrosomique. Les définitions de macrosomie recommandées s'établissent selon le poids à la naissance des nouveaux-nés qui est supérieur à une certaine limite : 4000g (macrosomie de grade 1 avec risque de complications périnatales à l'accouchement), 4500g (macrosomie de grade 2 comme facteur de prédiction de morbidité foetale) et 5000g (macrosomie de grade 3 comme indicateur de risque de morbidité infantile) [16]. Au Canada, il y a une légère tendance à l'augmentation depuis 1981 dans le pourcentage de naissance à terme avec poids du nouveau-né excédant le 90^{ième} percentile du poids moyen normal pour l'âge gestationnel, se chiffrant à 12% en 2000 [17;18]. Silverman et al. rapportent que de 50% des enfants nés de mères diabétiques présentent un poids à la naissance dépassant le 90^{ième} percentile à la naissance [19].

La macrosomie augmente les risques de traumatismes à la naissance autant pour la mère que pour l'enfant. Dès les 7^{ième} et 8^{ième} semaines du développement embryonnaire humain, les premières cellules endocrines pancréatiques peuvent être détectées. Les îlots bêta du pancréas sont considérés matures vers le dernier trimestre de gestation et sont alors en différenciation, donc très sensibles aux variations de glucose [20;21]. L'hyperglycémie de la mère implique que des niveaux élevés de glucose sont transmis au fœtus par le flot placental. Les cellules pancréatiques du fœtus sont alors hyperstimulées, causant ainsi une hyperinsulinémie foetale. L'insuline étant le facteur de croissance le plus sollicité durant la période tardive de gestation, l'enfant est donc exposé à des risques de macrosomie plus élevés affectant surtout le cœur, le foie ainsi que le gras sous-cutané, ce qui résulte en un bébé de plus grande taille.

Le contrôle strict du MGH permet de réduire les risques de macrosomie foetale, de malformations congénitales et autres traumatismes périnataux [22]. En effet, Langer et al.

rapportent des risques de 2 à 4 fois plus élevés de macrosomie et de complications métaboliques chez la progéniture exposée à un MGH non-traité comparé à la progéniture de mères diabétiques sous traitement et des mères du groupe contrôle [23]. Une mécanisme autre postulé par Plagemann et al. suggèrent qu'une altération du neuropeptide Y (NPY) de l'hypothalamus, acquis par programmation périnatale, contribuait à l'hyperphagie et l'intolérance au glucose observées chez la progéniture adulte d'un modèle de GDM chez le rat [24]. Des études ont aussi établi un lien entre les enfants macrosomiques et les risques plus élevés de développer des troubles reliés au syndrome métabolique (SM) ou syndrome X [25;26]. Décrit pour la première fois dans les années 1950, le SM prédispose les enfants macrosomiques à présenter une plus grande prévalence que la normale aux maladies cardiovasculaires, à l'obésité et à l'intolérance au glucose. Ainsi, Boney et al suggèrent que l'hyperglycémie des mères légèrement diabétiques, qui sont aussi souvent obèses, pourrait entraîner une hyperinsulinémie chez le fœtus, un autre facteur qui pourrait contribuer au développement du SM chez la progéniture macrosomique [27;28]. Considérant la prévalence croissante de l'obésité dans les pays industrialisés, les observations sur ce groupe d'enfants impliquent la perpétuation d'un cycle pernicieux de problèmes de santé pour les générations futures.

1.2.2 L'hyperglycémie maternelle sévère : phénotype de microsomie

Les modèles animaux d'hyperglycémie sévère (overt gestational hyperglycemia, OGH) impliquent une destruction quasi-totale des îlots bêta chez la mère, donc l'hyperglycémie maternelle sévère durant la gestation crée un environnement très riche en glucose mais néfaste pour le développement fœtal et le métabolisme de la progéniture. Chez l'humain, des valeurs de glucose plasmatique suivant le jeûn de > 6.7 mmol/L ou post-prandial de > 7.8 mmol/L sont proposées pour diagnostiquer l'hyperglycémie maternelle sévère [29]. Chez le fœtus, il y a hyperstimulation du pancréas par les niveaux très élevés de glucose dans le sang. L'excès de stimulation des cellules bêta fœtales induit l'hypertrophie et/ou

l'hyperplasie, pour enfin les rendre non-fonctionnelles. Outre la dégranulation des cellules bêta, le fœtus peut aussi subir une restriction de croissance *in utero*, et possiblement une hypoplasie des organes. Par conséquent, l'hypoinsulinémie foetale est due à la fois à la baisse de sécrétion d'insuline et un nombre réduit de cellules bêta [30]. Malgré les niveaux élevés de glucose dans le sang, l'OGH chez la mère est caractérisée pas une diminution du flot sanguin utérin, ce qui altère profondément la balance de nutriments fournis au fœtus. Le fœtus est donc incapable de profiter de cet apport élevé de glucose à cause de l'hypoinsulinémie, ce qui résulte en des nouveaux-nés microsomiques souffrant de malnutrition foetale [31]. Selon le *Canadian Institute for Health Information*, une naissance sur 16 présente un phénotype de bas poids à la naissance (BNP) avec une tendance à l'augmentation de ce taux depuis 2000 [32].

Un bébé présentant une taille plus petite que la moyenne pour son âge est exposé à plusieurs risques à la naissance car son corps et son métabolisme ne présentent pas un développement normal. Par ailleurs, Van Assche et al. postulent aussi que l'hypoinsulinémie foetale, causée par une hyperglycémie maternelle sévère, pourrait avoir des effets divergeants sur les différents organes sensibles à l'insuline car le développement des récepteurs à l'insuline est privé de stimulation [33].

1.3 Pathogenèse de l'embryopathie diabétique

Un milieu hyperglycémique expose le fœtus à un environnement métabolique néfaste qui peut être caractérisé par des anomalies congénitales pouvant menacer les systèmes nerveux, cardiovasculaire, gastrointestinal, musculo-squelettique et uro-génital [34]. Une corrélation spécifique entre l'hyperglycémie en tant que tératogène et l'incidence élevée de malformations cardiaques et du syndrome de régression caudale (caudal regression syndrome, CRS) est rapportée dans la littérature [35]. Ce syndrome, quoique rare, est

caractérisé par des anomalies du développement neurologique, urologique et orthopédique. Le CRS peut aussi entraîner une agénésie partielle, simple ou bilatérale des reins [36].

Malgré les mesures de prévention ainsi que les progrès de la médecine, les risques de malformations congénitales et complications retrouvées chez la progéniture de mères diabétiques (offspring of diabetic mothers, ODM) qui persistent sont surtout causées par l'hyperinsulinémie, l'hypoxie et la naissance prématurée, tandis que les risques à long terme peuvent impliquer une tendance à développer de l'obésité, une intolérance au glucose ou le diabète mellitus. Que ce soit durant l'accouchement ou dans la vie ultérieure de l'enfant, une grossesse diabétique expose le nouveau-né et la mère à plusieurs risques : prévalence plus élevée de césarienne, hypoglycémie chez le nouveau-né, détresse respiratoire, polycythémie, hyperbillirubinurie, dystocie des épaules et risques plus élevés de troubles moteurs et neurologiques chez l'enfant [37].

1.3.1 Diabète gestationnel : anomalies rénales chez la progéniture

Durant la période critique de l'embryogenèse, une organogenèse altérée peut laisser des séquelles sur la fonction de différents systèmes à long terme. Une étude des cas de malformations congénitales au Danemark décrit une association spécifique entre le diabète pré-gestationnel traité à l'insuline et l'agénésie rénale, ainsi que les anomalies congénitales obstructives du système urinaire et cardiaque chez le fœtus [38]. Expérimentalement, la progéniture de rats diabétiques présente des taux de filtration glomérulaire (glomerular filtration rate, GFR) plus basses et plus d'anomalies cardiovasculaires comparée aux contrôles [39].

En 1999, Amir et al. ont identifié pour la première fois le diabète maternel comme facteur de risque à l'attribution innée d'un nombre réduit de néphrons. En utilisant des études *in vivo* et *ex vivo*, ils ont démontré les effets adverses de l'hyperglycémie sur la morphogenèse des reins de la progéniture du rat diabétique [40]. Plus récemment, Magaton et al., en

utilisant un protocole légèrement différent d'induction du diabète maternel, ont aussi rapporté les effets de l'hyperglycémie maternelle sur les reins de la progéniture du rat diabétique. Ils ont trouvé un nombre similaire de néphrons et de marqueurs de prolifération chez les ODM et la progéniture contrôle, mais les ODM présentaient une hypertrophie glomérulaire de même qu'une plus grande incidence d'hypertension à l'âge de 2 mois [41]. Par conséquent, ils postulent donc que l'apparition précoce des changements fonctionnels rénaux chez les ODM ne découlent pas d'un mauvais développement du rein.

1.4 Le développement rénal

Chez l'humain, dès la 4^{ème} semaine de gestation, il est possible de déceler l'émergence des crêtes uro-génitales du mésoderme intermédiaire postérieur qui constituent le commencement du développement rénal. Trois jeux de reins distincts (pronéphros, mésonéphros et métanéphros) se succèdent pendant le développement rénal embryonnaire pour qu'enfin, seules certaines structures du métanéphros demeurent pour devenir le rein mature chez le mammifère. Le déroulement séquentiel des événements ainsi que l'induction réciproque des différents tissus sont primordiaux à la prolifération et différenciation cellulaire rénale [34].

1.4.1 Pronéphros, mésonéphros et métanéphros

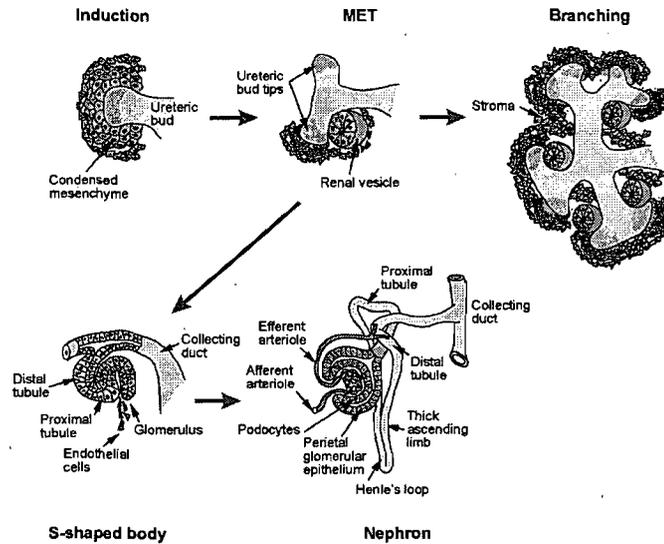
Premièrement, le pronéphros, ou rein primitif, émerge et s'attache au conduit pronéphrique, ou canal Wolffien. Les agrégats de cellules mésenchymales subissent ensuite une dégénération progressive pour laisser place au mésonéphros. Ce dernier, aussi appelé rein intermédiaire, est le second jeu de reins transitoire dans le développement rénal. Il est constitué d'une multitude de tubules Wolffiens qui, d'un côté sont connectés au canal Wolffien, et de l'autre extrémité vont s'invaginer pour former un lit de capillaires qui

deviendra le glomérule. Puis, le mésonéphros dégénère aussi, mais certaines de ses structures sont à l'origine du système reproducteur mâle. Finalement, le métanéphros, ou rein final, se développe par l'élongation du bourgeon urétérique (ureteric bud, UB) à partir de la portion caudale du canal Wolffien autour de la 5^{ième} semaine de gestation chez l'humain et environ au jour embryonnaire 11.5 (E11.5) chez la souris [42]. Le développement du UB à partir du conduit postérieur et l'invasion des cellules UB dans le mésenchyme métanéphrique initie le développement du rein mature. Par interaction avec les cellules du mésenchyme métanéphrique (metanephric mesenchyme, MM), il y a induction et condensation autour de chaque bourgeon dont les branches distales croissantes du UB sont à la base du réseau collecteur. Enfin, les extrémités des UB stimulent un groupe de cellules hyperspécialisées qui se différencient en néphrons.

1.4.2 La néphrogenèse

La formation des néphrons, unités fonctionnelles du rein mature, commence à la 5^{ième} semaine de gestation chez l'humain. La compréhension des événements cellulaires spécifiques du développement rénal s'est faite à travers l'étude du rein du rongeur. Comme présenté à la figure 2, les deux processus clés de la néphrogenèse sont la ramification du bourgeon urétérique (UB) pour former le système collecteur du rein et la transformation du mésenchyme métanéphrique (MM) [43-45].

Figure 2 : Étapes séquentielles de la néphrogenèse. Tirée de Dressler, 2006 [46]



 Dressler GR. 2006. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:509-29

Grâce à une interaction réciproque entre les extrémités UB et MM, une certaine polarité est induite qui dirige l'émergence des nouvelles branches urétériques, fondements des tubules collecteurs, calices, uretères et vessie structurale. D'autre part, les cellules du MM reçoivent des signaux de conversion et subissent une transformation cellulaire de mésenchyme à épithélium, à l'origine des cellules glomérulaires et tubulaires, qui formeront les tubules proximaux, distaux ainsi que certains éléments du glomérule rénal [47]. Une ablation *ex vivo* du tissu MM cause une absence d'induction des cellules du bourgeon urétérique en culture [48;49]. Enfin, il y a alors fusion du néphron au bourgeon urétérique, ce qui forme le système collecteur final.

Comme présenté à la figure 3, la différenciation des cellules du MM en néphrons se résume en une séquence de structures : 1) Vésicule, 2) Condensation des cellules en corpuscules en forme de virgule, 3) Corpuscules en forme de S, 4) Vascularisation du futur glomérule (développement de l'anse capillaire), 5) Stage gloméculaire, 6) Maturation de la tubulogenèse. Le néphron est constitué des composantes suivantes : capsule de Bowman,

glomérule, tubule proximal, anse de Henle, tubule distal et tubule collecteur. Évidemment, en plus de la formation des structures essentielles à la filtration rénale, la vascularisation, l'innervation et l'encapsulation sont autant d'autres événements importants durant le développement rénal. Chez l'humain, la néphrogenèse est un processus strictement embryonnaire et, malgré la grande disparité des décomptes glomérulaires chez les individus dits normaux, il est estimé que le rein adulte contient environ 1 million de néphrons. Chez la souris, la néphrogenèse se termine 2 semaines après la naissance, tandis que le rein humain complète son développement à 38 semaines de gestation.

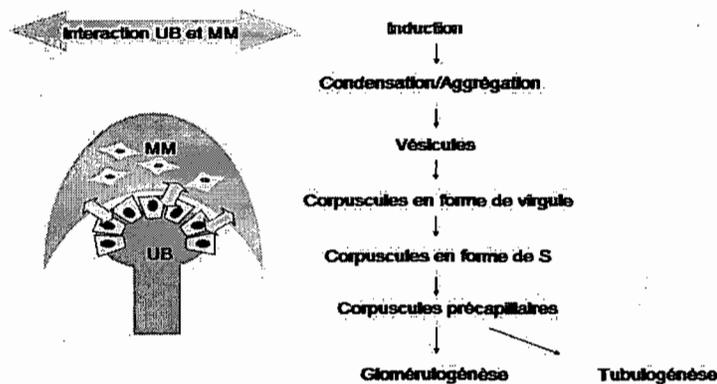


Figure 3 : Séquence d'événements structuraux de la néphrogenèse

1.4.2.1 Les différentes cellules rénales affectées par l'hyperglycémie

Le rein humain est composé de différents types cellulaires : endothélial, épithélial, mésangial, podocyte et interstitiel. Par exemple, les tubules proximaux, responsable de la réabsorption de près des 2/3 de l'eau et du sel ainsi que que de la majorité des solutés

organiques, se distinguent par leurs cellules avec une bordure en brosse qui augmente la surface de réabsorption luminale.

L'hyperglycémie peut affecter une multitude de voies cellulaires, moduler des cellules de signalisation moléculaires et altérer l'expression génique ou protéique ce qui entraîne une dysfonction cellulaire responsable des dommages causés par un milieu riche en glucose. Par exemple, des défauts dans les interactions épithélium-mésenchyme peuvent entraîner des malformations dans le développement rénal. Des changements dans le glomérules et les compartiments tubulo-interstitiels sont caractéristiques de la néphropathie diabétique. Le glomérule rénal peut démontrer de l'hyperplasie des cellules mésangiales et endothéliales tel que l'épaississement de la membrane basale glomérulaire et l'expansion de la matrice extracellulaire. Un effacement des podocytes, cellules épithéliales essentielles à la filtration, est aussi typique de la dégradation de la barrière de filtration glomérulaire. L'épaississement de la membrane basale tubulaire, de la fibrose interstitielle ainsi que l'effacement de l'endothélium des artérioles sont aussi des conséquences de l'environnement hyperglycémique chronique [50].

1.4.3 La régulation du développement rénal

Même si l'étude du développement rénal date de plus d'un demi-siècle, la compréhension du contrôle moléculaire de la néphrogenèse n'est qu'à ses débuts. Plusieurs altérations génétiques ont été identifiées comme étant responsables de désordres rénaux humains connus, dont les mutations des gènes PKD1 (polycystic kidney disease 1), PKD2 (polycystic kidney disease 2) et PKHD1 (polycystic kidney and hepatic disease 1) associés aux maladies polycystiques. [51] Les études animales, surtout les modèles transgéniques murins et les explants de rongeurs, ont aussi défini plusieurs gènes importants au développement du rein, mais leur importance chez l'humain reste encore à démontrer. [52] Par exemple, tel que décrit au tableau II, les gènes *gdnf* (glial cell-line-derived neurotrophic

factor, GDNF), RET (Rearranged during Transfection Protooncogenes), Pax-2 (Paired Box Gene 2) , WT-1 (Wilms Tumor suppressor) sont cruciaux dans l'organogénèse rénale murine. De plus, les gènes de la famille Wnt, notamment Wnt4 [53;54], et leur activation de la voie des JNK (Jun-N terminal Kinase) [55] sont aussi connus pour être essentiels dans la ramification du bourgeon urétérique, un événement-clé dans la formation rénale. [56] Enfin, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le développement rénal. Gong et al. ont rapporté que le réseau *Hox11-Eyal-Pax2* est essentiel pour l'expression de *Six2* et *gdnf*, tous deux fondamentaux au développement du rein. [57] Cheng et al. ont aussi démontré que la voie Notch est cruciale au développement du glomérule rénal. [58;59]

Tableau II : Quelques gènes d'importance dans le développement rénal

Gènes	Expression dans le rein	Certaines malformations rénales associées à la déficience ou mutation génétique
<i>RET</i>	Conduit mésonéphrique, UB (et plus tard restreinte aux bouts UB) [60]	<p>Souris :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défauts du UB [61;62] - Agénésie rénale, dysplasie sévère [63;64] <p>Humain :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Agénésie rénale [65;66] - Maladie de Hirschprung [67]
<i>gdnf</i>	MM à proximité des bouts UB [68]	<p>Souris :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Similaire aux souris RET-null, dysplasie uni/bi-latérale [69-71] <p>Humain :</p> <ul style="list-style-type: none"> - agénésie rénale [72;73] - Maladie de Hirschprung [74]
<i>Pax-2</i>	Conduit mésonéphrique caudal, UB et cellules mésenchymales	<p>Souris :</p>

	condensées [75;76]	<ul style="list-style-type: none"> - Développement du UB défaillant, agénésie rénale [77] - Hypoplasie rénale [77] - Dérèglement de l'expression de Pax-2 : maladies rénales polycystiques et dysplasiques [77] <p>Humain :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dérèglement de l'expression de Pax-2 : maladies rénales polycystiques et dysplasiques [78;79] - Fibrose glomérulaire et interstitielle; reflux vesicoureterique [80] - Syndrome rénal de coloboma [81] - Tumeur de Wilms [82]
<i>WT-1</i>	Mésenchyme métanéphrique indifférencié précoce, mésenchyme condensé et podocytes (âge adulte) [83]	<p>Souris :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Similaire aux souris mutante Pax2, léthalité embryonnaire pour les souris WT-1 null [84] <p>Humain :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Syndrome de WAGR (tumeur de Wilms, anomalies uro-génital) [85] - Syndrome Drash de Deny [86]

1.4.4 Le système rénine-angiotensine (RAS) et le développement rénal

Durant les dernières années, le système rénine-angiotensine (renin-angiotensin system, RAS), dont la structure classique est présentée à la figure 4, a révélé plusieurs nouvelles composantes telles que l'ACE 2 (angiotensinogen converting enzyme, ACE) [87;88] et les angiotensines 1-7 et 1-12 [89]. Généralement responsable du maintien du volume et de la

pression plasmatique, une surexpression du RAS chronique peut entraîner plusieurs effets pathologiques : hypertrophie, hyperplasie, stress oxydatif, fibrose, inflammation et athérosclérose à la source de l'hypertension artérielle [90].

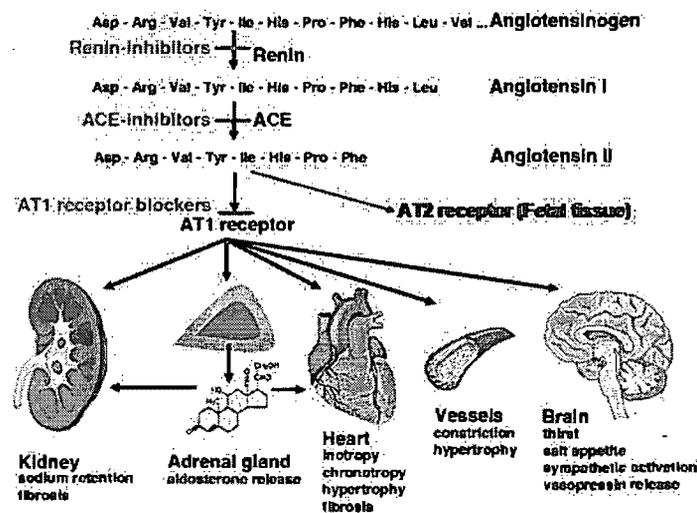


Figure 4 : Système rénine-angiotensine classique avec ses sites d'interaction, d'intervention pharmacologiques ainsi que les effets majeurs du RAS sur les différents systèmes cardiovasculaires. Tiré (avec modification) de Bader et al, 2008. [91]

Une multitude d'études ont démontré le rôle essentiel de plusieurs composantes du RAS durant le développement rénal. Par exemple, les souris déficientes en angiotensinogène [92;93], en rénine [94] et en récepteurs de l'angiotensine II de type 1 (AT1-R) [95;96] et de type 2 (AT2-R) [97] présentent une myriade d'anomalies rénales incluant des malformations vasculaires, une glomérulogenèse anormale, de la dysplasie de la papille, de l'hydronéphrose, un système uro-génital altéré, de la fibrose interstitielle et enfin, un taux de survie considérablement bas. Chez l'humain, l'utilisation des inhibiteurs de ACE est déconseillée durant la grossesse car des cas de fétopathie, dont de la dysplasie rénale tubulaire, ont été rapportés. [98]

L'angiotensine II (Ang II), le peptide le plus actif dans le RAS, induit la prolifération cellulaire via AT1-R et l'apoptose essentielle via AT2-R. Elle joue donc un rôle important augmente l'expression de Pax-2, gène crucial à la néphrogenèse, via AT2-R durant le développement foetal. [99] L'inhibition pharmacologique de l'Ang II ou la déficience génétique en AT1-R affecte l'organogenèse normale car l'Ang II est reconnu comme un puissant facteur de croissance. [100] Il est intéressant de mentionner que AT2-R est reconnu comme étant important dans l'organogenèse car il est abondamment exprimé dans les tissus foetaux de souris [101], de rat [102] et de primate [103]. Notre laboratoire s'intéresse aux malformations rénales causées par une déficience en AT2-R et nous avons démontré que l'absence de récepteurs AT2 altère l'expression des gènes Pax-2 et N-Myc durant la néphrogenèse [104].

1.5 Le diabète maternel et la programmation périnatale

L'hypothèse de la programmation périnatale est un concept qui prédit que les événements intrautérins et périnataux ont une influence sur la fonction des organes après la naissance [105]. L'embryon, lorsqu'exposé à une modulation génétique ou une altération environnementale durant une période critique de son développement, peut porter les séquelles permanentes dans sa physiologie et son métabolisme. Durant la période cruciale du premier trimestre de gestation, l'organogenèse peut être perturbée à plusieurs niveaux affectant le tube neural, l'angiogenèse ainsi que la formation des organes cardiaques, rénaux et gastrointestinaux. Différents facteurs peuvent être responsable de ces malformations : stress oxydant, biosynthèse altérée des prostaglandines et de l'ADN, expression perturbée de certaines molécules (protéines de la matrice extracellulaire, facteurs de transcription, proto-oncogènes) responsables de la morphogenèse. Les espèces d'oxygène réactif (reactive oxygen species, ROS), considérées comme le dénominateur commun des complications adultes reliées au diabète, peuvent endommager l'ADN et altérer l'expression de certaines

molécules essentielles au développement embryonnaire normal [106]. Par exemple, il a été démontré que le stress oxydant entrave les processus de réparation de l'ADN *in vitro* [107].

Freinkel a postulé pour la première fois il y a près de 30 ans que des malformations congénitales et des pathologies tératogènes pourraient être causées par la malnutrition du fœtus [108]. D'une part, l'hypothèse du phénotype économe (thrifty phenotype) dicte que le développement et le métabolisme d'un fœtus déjà exposé à peu de ressources durant la vie intra-utérine va reprogrammer son organisme pour la survie post-natale, bouleversant ses mécanismes régulateurs [109]. D'autre part, un postulat potentiel de mécanisme moléculaire de la programmation périnatale suggère que les glucocorticoïdes, de par leur rôle régulateur, réorganisent les priorités du métabolisme du fœtus. En effet, plusieurs études présentent les effets délétères des glucocorticoïdes sur la morphogenèse des os et des poumons [110;111]. Quelle que soit l'hypothèse qui tente d'expliquer la programmation périnatale, les grands responsables restent le milieu hormonal altéré, la diminution de l'anabolisme et une croissance *in utero* restreinte.

1.5.1 L'hypothèse de Barker

Un environnement perturbé durant la vie embryonnaire aura des conséquences sur la vie de l'enfant. L'hypothèse de Barker englobe les corrélations entre maladies à l'âge adulte (troubles cardiovasculaires, intolérance au glucose, hypertension) et restriction des ressources nutritionnelles intra-utérines durant des étapes-clé de l'organogenèse foetale [112;113]. Le sous-développement des organes et des tissus affecte le métabolisme du fœtus et les séquelles se reflèteront sur l'homéostasie et la santé adulte. Se classant seulement derrière la prématurité, le retard de croissance *in utero* (intrauterine growth retardation, IUGR) occupe la deuxième place dans la liste des causes de mortalité et morbidité périnatale [114]. Le tableau III présente les facteurs de risque pouvant prédisposer au IUGR. Malgré le fait qu'il puisse être diagnostiqué à n'importe quel âge de gestation,

IUGR est spécifiquement utilisé pour décrire un nouveau-né dont le poids est plus petit que le 10^{ème} percentile pour son âge gestationnel. En 2008, une étude de cohorte réalisée en Norvège a établi une association significative entre IUGR et une fonction rénale réduite chez les hommes âgés de 20 à 30 ans présentant un bas poids à la naissance [115]. Des organes hypoplasiques ou une hyperinsulinémie pourraient être des séquelles des effets de l’empreinte périnatale laissée par le diabète maternel [116].

Tableau III : Facteurs de risque qui prédisposent à IUGR. Tableau tiré de Peleg, 1998 [117]

Nature du trouble	Facteurs
Maternel	Maladies chroniques - Cardiaques - Rénales - Métaboliques tel que le diabète - Hypertension Substances toxiques (alcool, drogues, nicotine) Malnutrition maternelle Infection Anémie Lactation réduite
Placenta et foetal	Flot sanguin anormal entre utérus et foetus Malformations congénitales Prédisposition génétique Grossesse multiple (jumeaux, triplés etc.) Oligohydramnios

1.5.2 Le Bas Poids à la Naissance (BPN) et l’hypothèse du nombre réduit de néphrons (low nephron number, LNN)

Selon l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la littérature scientifique reconnaît généralement que les nouveaux-nés présentant un poids inférieur à 2500g sont considérés de

bas poids de naissance (BPN) [118]. Grâce aux progrès de la médecine moderne, les pays industrialisés observent une élévation de la prévalence de BPN car les chances de survie post-natale se sont améliorées chez les grossesses à risque. Proposée il y a près de 30 ans, la figure 4 présente la théorie de Brenner et al. qui suggère, chez les enfants de BPN, une relation inverse entre un nombre réduit de néphrons (Low Nephron Number, LNN), donc une surface réduite de filtration glomérulaire et le développement de l'hypertension à l'âge adulte (voir figure 5) [119]. Plus récemment, Manalich et al. ont revisité cette théorie chez l'humain en examinant la morphogenèse des néphrons chez les nouveaux-nés IUGR et rapportent que le LNN est directement corrélé avec le BPN avec une hypertrophie glomérulaire. [120] Enfin, en 2008, deux études de cohortes différentes ont aussi rapporté un lien entre le bas poids à la naissance (BPN), souvent associé au diabète gestationnel sévère, et les maladies rénales chroniques pouvant mener à la défaillance rénale (end-stage renal disease, ESRD) [121;122]. La déficience congénitale ou expérimentale en néphrons reliée au BPN est un facteur de risque associé au développement de maladies rénales et de défaillance rénale dans la vie post-natale.

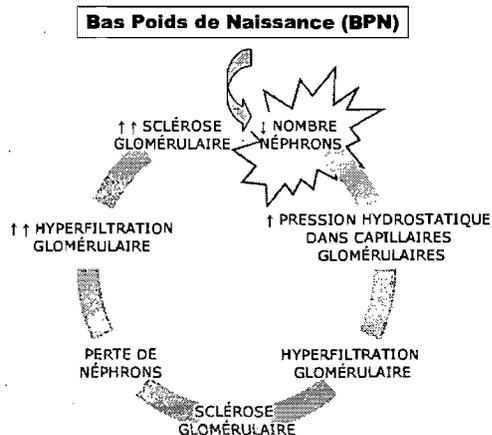


Figure 5 : Théorie de Brenner associant BPN et LLN

1.5.3 Le phénotype économe

Hales CN rapporte l'impact néfaste du rattrapage de croissance chez le rat et les conséquences délétères sur différents organes [123] et suggère que le phénotype économe (thrifty phenotype) sert à reprogrammer l'organisation des ressources in utero sub-optimales [124;125]. Il est suggéré que cette modification du métabolisme du fœtus sous des conditions sub-optimales lors de la vie intra-utérine est une adaptation de la nature afin de favoriser la survie de celui-ci à la naissance, au détriment de sa longévité.

1.6 Mécanismes possibles expliquant la dysmorphogénèse rénale de la progéniture associée à l'hyperglycémie maternelle

1.6.1 Le stress oxydant

Tel que présenté à la figure 6, une partie de l'oxygène moléculaire résultant de la phosphorylation oxydative est convertie en radicaux libres sous les formes superoxide (O_2^-), hydroxyle (OH^-) et peroxyde ($R-OO^-$) [126;127].

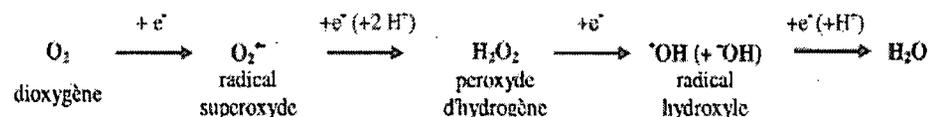


Figure 6 : Les intermédiaires réduits de l'oxygène. Tiré de Benrahmoune et al., 2000 [128]

Les ROS sont normalement éliminés par le système de défense anti-oxydant grâce aux enzymes telles la superoxide dismutase (SOD) et les catalases (CAT). Cependant, en situation de stress oxydant, l'augmentation des ROS dans divers tissus couplée à l'incapacité des antioxydants endogènes à compenser la balance redox, surtaxe le système et

mène à l'activation de plusieurs voies intracellulaires. Les radicaux libres oxygénés sont extrêmement réactifs et attaquent les tissus biologiques. Leur rôle a été démontré dans plusieurs pathologies dont l'athérosclérose, le diabète et certaines maladies dégénératives comme l'Alzheimer.

Le stress oxydant, induit par les taux élevés de glucose, constitue un élément-clé dans le développement initial des complications associées au diabète. Godin et al. ont observé la diminution des mécanismes de défense antioxydants en situation de diabète, rendant l'organisme plus vulnérable aux attaques du stress oxydant [129]. Comme décrit à la figure 7, l'hyperglycémie induit la production des ROS. Les cellules en prolifération cellulaire sont particulièrement sensibles au stress oxydant car elle sont en croissance rapide et en différenciation donc à risque de développer de la tératogénéicité, menant à des malformations du développement [130]. D'autres part, les protéines de la matrice extracellulaire (extracellular matrix proteins, ECM) sont considérées essentielles pendant l'embryogenèse car elles modulent les interactions épithéliales-mésenchymales. Toutefois ces molécules morphogénétiques sont à renouvellement lent et donc peu aptes à la réparation des dommages à l'ADN. Par conséquent, le développement des ramifications du bourgeon urétérique rénal est altéré de façon sévère [131;132].

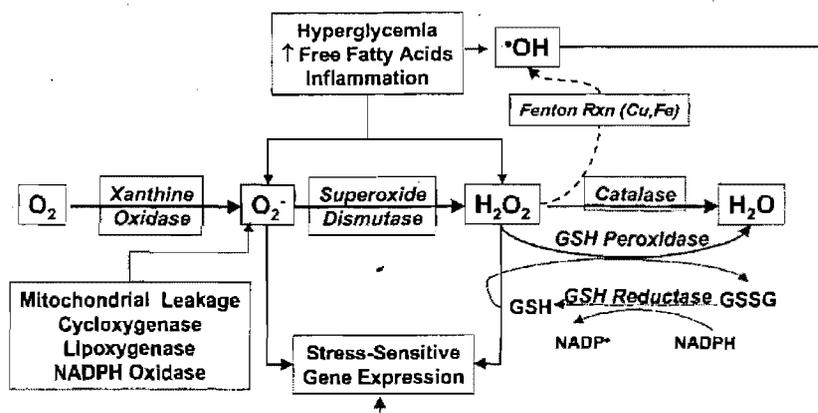


Figure 7 : Induction des ROS par l'hyperglycémie. Tiré de Evans et al, 2002 [133]

Dans la pathologie de l'hyperglycémie chronique, la production de ROS peut causer des dommages tissulaires à travers plusieurs mécanismes: voie des polyols, voie protéine kinase C (PKC), induction des produits terminaux avancés de glycation (advanced glycation end-products, AGE), voie des hexosamines, voie de signalisation du facteur nucléaire kappa-B (NF-kB), p38 MAPK et voie JNK, pouvant toutes être activées par le stress [106;134].

Un environnement *in utero* hyperglycémique affecte l'embryon par une augmentation des ROS, entraînant une modulation génétique et des dommages causés par le stress oxydant, résultant en une augmentation de l'apoptose et une organogenèse altérée. Lorsque la balance entre antioxydants et radicaux libres penche en faveur des ROS, le stress oxydant peut alors endommager l'organisme au niveau cellulaire et tissulaire. Pavlova et al ont rapporté une augmentation progressive de l'activité oxydative dans l'urine et le sang d'enfants affectés par les maladies rénales telles que la glomérulonéphrite, la pyélonéphrite, l'infection inférieure du tractus urinaire et la défaillance rénale, supportant les mécanismes inflammatoires et immunologiques pouvant expliquer les pathologies rénales citées [135]. Les antioxydants, comme cibles pharmacologiques pour contrer les dommages dû au stress oxydant, sont une option intéressante pour de nouvelles thérapies dans la prévention et le ralentissement des pathologies reliées aux dommages causés par les ROS.

1.6.2 L'apoptose

L'apoptose, communément définie comme la mort cellulaire programmée, est une composante normale des événements cellulaires. Depuis 1972 où elle a été décrite pour la première fois par Kerr et al. [136], l'apoptose a été étudiée avec intérêt pour son rôle dans le cancer et le maintien du système immunitaire. L'apoptose est gouvernée par deux voies activatrices de la cascade des caspases signalisatrices : la voie extrinsèque implique les récepteurs de la superfamille TNF (tumor necrosis factor) tandis que la voie intrinsèque sollicite la mitochondrie et les gènes Bcl-2. À la fois chez l'humain et le rongeur, une

activité apoptotique dysfonctionnelle a été associée aux maladies rénales polycystiques où l'emphase est sur le rôle essentiel de l'apoptose dans la prolifération et différenciation normales des tissus du rein [137;138;138]. Une surexpression du marqueur apoptotique caspase-3 a aussi été associée avec la dysmorphogenèse embryonnaire reliée à l'embryopathie diabétique [139].

1.6.3 Le système rénine-angiotensine (RAS)

Le rôle crucial du RAS dans le rein en formation est indéniable. Une diminution de l'expression des gènes AT1-R de sous-type a et b, AT2-R, angiotensinogène et rénine est observée dans les reins hypoplasiques des rats atteints d'hernie diaphragmatique congénitale [140]. En situation d'inhibition de l'Ang II dans le rein en développement, Laisatienne et Chen ont observé une tubulogenèse perturbée, de la fibrose interstitielle et de l'atrophie médullaire [141;142]. De plus, l'importance d'Ang II réside à la fois dans sa localisation spécifique ainsi que son expression durant les périodes critiques du branchement urétérique [143].

L'Ang II a été identifié comme pivot dans le stress oxydatif induisant des dommages associés à la maladie rénale progressive, plus précisément dans son action stimulatrice sur la prolifération, l'inflammation et la fibrose du rein. Le groupe du Dr John S.D. Chan s'intéresse au rôle du RAS et à la néphropathie diabétique. Expérimentalement, Liu et al. ont démontré que l'apoptose des tubules proximaux durant la néphropathie diabétique est exacerbée par la surexpression de l'angiotensinogène. [144] Plus précisément, l'Ang II exacerbe la néphropathie diabétique par l'induction de la production de ROS. [145] Le rôle du RAS, associé à l'expression de TGF- β (Tumor Growth Factor beta), a aussi été rapporté dans l'hypertrophie des tubules rénaux en condition hyperglycémique. [146] De même, Allard et al. rapportent la prévention de la glomérulosclérose due à la néphropathie diabétique par l'inhibition de ACE 1 via l'activation du récepteur de la bradykinine 2. [147]

La thérapie par les inhibiteurs d'ACE est cliniquement prouvée pour réduire les effets pathologiques cardiovasculaires associés avec l'augmentation d'Ang II [148] tout en améliorant la sensibilité à l'insuline [149;150]. Les voies de signalisation d'Ang II et des bradykinines sont toutes deux contrôlées par les ACE : cela peut s'expliquer par le fait que ACE possède un rôle analogue à la kininase 2, donc les inhibiteurs de ACE agissent sur l'Ang II, tout augmentant l'action biologique des kinines endogènes. Ainsi, les inhibiteurs d'ACE peuvent non seulement prévenir la formation d'Ang II mais possiblement intervenir dans la dégradation du puissant vasodilatateur bradykinine (BK). En plus de ses actions angiogéniques et proinflammatoires, BK peut aussi moduler le métabolisme du glucose via la translocation des transporteurs du glucose, dont GLUT4 dans les adipocytes et les cellules du myocarde [151]. Le rôle potentiel du système bradykinines est substantiel dans la néphropathie diabétique tel que démontré par l'utilisation de souris déficientes en récepteurs B₂-kinine (B2KR) diabétiques qui présentaient moins de dommage aux cellules glomérulaires et tubulaires [152]. Cependant, contrairement aux effets bénéfiques de BK pour le coeur [153] découvert par Schoelkens et al., la perfusion de kallikrein dans le rein ischémique a augmenté la production de stress oxydatif, d'apoptose et de dommage tissulaire [154].

1.6.4 Les facteurs nucléaires de transcription kappa B (NF-kB)

La régulation génique est au centre de l'adaptabilité des organismes supérieurs aux stress extérieurs. Présent dans une large variété de cellules eucaryotes, le facteur de transcription NF-kB est un régulateur cellulaire qui possède un rôle crucial dans la survie, la différenciation et la prolifération des cellules, ainsi que dans la réponse inflammatoire et immunitaire. En effet, NF-kB est un régulateur important de la mort cellulaire programmée, que ce soit l'apoptose ou la nécrose, puisqu'il possède des qualités à la fois pro- et anti-apoptotiques. NF-kB régule un large éventail de gènes comme des facteurs de croissance et

cytokines proinflammatoires. Dans une boucle rétro-active, plusieurs produits des gènes modulés par NF- κ B peuvent à leur tour activer la voie de signalisation.

Une multitude de stimuli à la fois exogènes et endogènes peuvent induire NF- κ B : hyperglycémie, niveaux élevés d'acides gras libres (free fatty acids, FFA), ROS, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukine-1beta (IL-1B) et autres cytokines proinflammatoires, AGE, p38 MAPK, dommages à l'ADN, infection virale, LPS (lipopolysaccharide), activation des cellules B ou T et irradiation aux UV (ultraviolet). Une régulation altérée de NF- κ B est associée à différentes maladies telles le diabète, l'athérosclérose et le cancer.

Séquestré dans le cytosol, le complexe NF- κ B existe sous forme d'hétérodimère inactif et est composé des sous-unités p50 et p65 en complexe avec la protéine inhibitrice I κ B. Un stimuli d'induction va déclencher une cascade de sérine kinases et amorcer le mouvement de NF- κ B vers le noyau. Cette translocalisation nucléaire est contrôlée par la phosphorylation puis la dégradation de l'unité I κ B, qui libère alors l'hétérodimère p50-p65. L'enzyme I κ B kinase (IKK) est responsable de la phosphorylation de I κ B, étape limitante dans l'activation de NF- κ B [155;156]. L'aspirine et le salicylate sont des inhibiteurs connus de IKK [157]. Enfin, le complexe p50-p65 peut alors se lier à l'ADN et régulariser l'expression du gène. Le rôle crucial de NF- κ B a été rapporté par Beg et Baltimore en 1996 : chez les souris I κ B-knockout (I κ B-alpha -/-), la léthalité dans les premiers jours après la naissance, avec déformations majeures du squelette, est une indication de l'importance de NF- κ B dans l'embryogenèse et le développement tissulaire normal [158;159].

Comme on peut le voir à la figure 8, le complexe NF- κ B, joueur-clé dans la réponse au stress ainsi que l'activité inflammatoire, reste une cible intracellulaire centrale de l'hyperglycémie et du stress oxydatif. Hoffman a démontré une corrélation entre l'activité de NF- κ B et la sévérité de l'albuminurie chez les patients atteints de néphropathie diabétique. Les patients diabétiques démontrent également une suppression significative de l'activation de NF- κ B lors de traitement aux antioxydants [160].

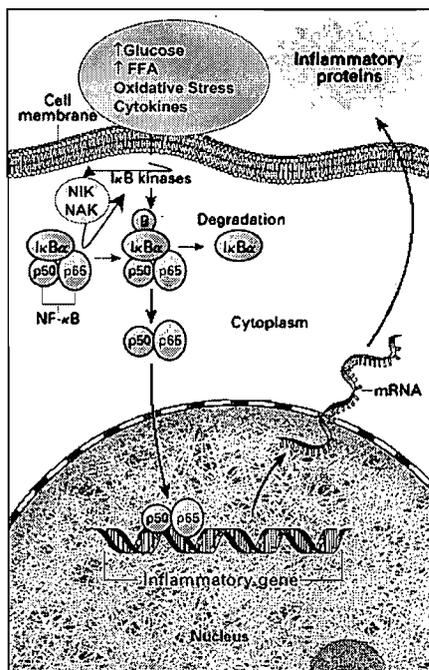


Figure 8 : NF-κB : cible de l'hyperglycémie. Tiré de Evans, 2002 [161]

Comme présenté à la figure 9, l'activation de la voie NF-κB suite à la surproduction de ROS en situation de néphropathie diabétique, semble précéder la stimulation des autres voies impliqués dans les dommages découlant de l'hyperglycémie chronique.

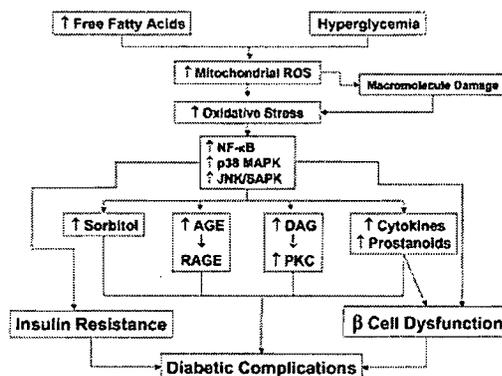


Figure 9 : NF-κB dans la physiopathologie du diabète. Tiré de Evans, 2002 [162]

1.7 Modèle expérimental d'étude du diabète gestationnel

Dans les études expérimentales de diabète chez les rongeurs, l'utilisation de l'agent chimique streptozotocine (STZ) pour cibler la destruction des cellules productrices d'insuline dans le pancréas est une méthode largement répandue pour induire l'hyperglycémie. [163] Des modèles expérimentaux de diabète gestationnel avec injections répétées au STZ à faible dose chez le rat [164] rapportent que la stratégie à faible dose n'est pas idéale pour une étude de l'hyperglycémie maternelle légère avec phénotype de macrosomie chez la progéniture. Cependant, l'utilisation de STZ (50mg/kg à dose unique) pour induire le diabète gestationnel chez le rat a été utilisée avec succès comme modèle expérimental de myocardie foetale. [165]

Différents facteurs génétiques et environnementaux peuvent prédisposer au développement du GDM. Les souris hétérozygotes mutantes pour le récepteur de la leptine ($Lepr^{db/+}$) développent spontanément de l'intolérance au glucose lors de la période de gestation et leur progéniture est macrosomique. [166] Toutefois, l'administration de leptine améliore seulement la réponse au glucose durant la période de gestation sans affecter la macrosomie de la progéniture, ce qui suggère que la régulation de la croissance foetale est indépendante des niveaux de glucose maternel dans ce modèle de GDM transgénique de la leptine. [167] Les études expérimentales sur le rat BioBreeding (BB), un modèle avec développement spontané du diabète de type 1, révèlent que les effets de l'hyperglycémie sévère du rat BB sur le pancréas foetal et la croissance in utero sont similaires aux conditions métaboliques induites par l'injection du STZ pour créer un environnement hyperglycémique sévère. [168] L'utilisation d'une diète riche (de type cafeteria : 33% nourriture standard pour rat, 33% lait sucré condensé, 7% sucrose et 27% eau) pour induire le GDM chez le rat Wistar est un autre modèle expérimental qui a été utilisé pour démontrer l'apparition d'une intolérance au glucose chez la mère durant la gestation, soulignant le rôle de l'obésité dans ce désordre métabolique. [169] Enfin, la souris diabétique non-obèse (nonobese diabetic, NOD), par la

dysfonction de son système autoimmun, peut aussi servir en tant que modèle de diabète maternel avec macrosomie et hyperinsulinémie foetale. [170;171]

1.7.1 Induction du diabète maternel sévère

Inspiré par un modèle publié par Loeken et al. [172], notre laboratoire a choisi la stratégie suivante pour créer un modèle d'hyperglycémie maternelle sévère. Nous injectons par voie intra-péritonéale (i.p.) une seule dose de STZ (150mg/kg) à des souris gestantes au jour embryonnaire E13. Ainsi, nous obtenons un environnement in utero élevé en glucose et pouvons étudier l'effet de cette hyperglycémie sévère chez la progéniture microsomique avec anomalies morphologiques du rein similaire, à celui décrit par Kanwar. [173] Il est à noter que ce modèle de diabète maternel sévère ne reproduit pas la situation généralement retrouvée chez l'humain de pays industrialisés, soit du diabète gestationnel léger avec contrôle de l'hyperglycémie et, par conséquent, un nouveau-né macrosomique. Une autre limite de ce modèle réside dans la néphrotoxicité connue du STZ.

Hypothèse

Nous postulons qu'un milieu *in utero* élevé en glucose aura un effet néfaste sur le développement rénal, affectant la formation des néphrons en observant différents paramètres tels que le nombre de glomérules, la prolifération des podocytes, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Notre objectif est d'élucider la relation entre les pathologies dues à un faible poids à la naissance, un nombre réduit de glomérules rénaux et une programmation périnatale qui les prédisposera à de l'hypertension à l'âge adulte.

Soumission de mémoire par articles

Stella Tran, Yun-Wen Chen, Isabelle Chenier, John S.D. Chan, Susan Quaggin, Marie-Josée Hébert, Julie R. Ingelfinger and Shao-Ling Zhang: *Maternal Diabetes Modulates Renal Morphogenesis in Offspring*. J Am Soc Nephrol 19: 943-952, 2008

Mon apport dans ce projet de recherche fut majeur et essentiel à cet article scientifique J'ai contribué de façon significative à la collecte des données in vivo. J'ai aussi effectuées toutes les analyses immunohistochimiques (RAS, NF-kB) ainsi que l'évaluation glomérulaire (volume et nombre néphrons). J'ai effectué la culture d'explants et l'imagerie de fluorescence (Nephrin-CFP, double marquage fluorescent des podocytes). J'ai aussi fait les tests de détection de l'apoptose (TUNEL et Casp-3). Enfin, j'ai effectué les analyses statistiques pour toutes les données que j'ai généré incluant les figures finales.

**Maternal Diabetes Induces Intrarenal Apoptosis and
Modulates Renal Morphogenesis in Young Offspring**

Stella Tran ^{1*}, Yun-Wen Chen ^{1*}, Isabelle Chenier ¹, John S.D.Chan ¹, Susan Quaggin ², Marie-Josée Hébert ¹, Julie R. Ingelfinger ³ and Shao-Ling Zhang ^{1§}

¹University of Montreal
Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)- Hôtel-Dieu
Research Centre, Pavillon Masson
3850 Saint Urbain Street
Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada

²University of Toronto
The Samuel Lunenfeld Research Institute
600 University Avenue, Toronto, Ontario, M5G 1X5 Canada

³Harvard Medical School
Pediatric Nephrology Unit
Massachusetts General Hospital
55 Fruit Street, BHX-411
Boston, MA 02114-3117, USA

^{1§}To whom correspondence should be addressed

Tel: (514) 890-8000 ext. 15633

Fax: (514) 412-7204

Email 

^{1*} Miss Stella Tran and Yun-Wen Chen contributed equally in this article.

Short Title: Diabetic mellitus and renal morphogenesis

Keywords: Maternal diabetes, Apoptosis, Nephrogenesis

Word Count: Abstract 224; Text 2,904

Abstract

Maternal diabetes leads to an adverse *in utero* environment that may fundamentally and dynamically impair the process of nephrogenesis. The objective is to dissect the role of maternal diabetes in modulating renal morphogenesis in offspring *in vivo*. Offspring from pregnant diabetic Hoxb7-GFP mice (rendered diabetic by streptozotocin (STZ) at E13) were euthanized at 4 time points after birth: at birth, 1-week, 2-weeks and 3-weeks after birth. Offspring from pregnant non-diabetic mice served as controls. Renal morphology, nephron number and mean glomerular volume were assessed. Cellular apoptosis was determined by TUNEL assay and caspase-3 immunostaining. Intrarenal angiotensinogen (ANG) and renin mRNA expression and NF- κ B pathway components were evaluated by quantitative real time-PCR and immunohistochemistry. NF- κ B activation was performed by gel mobility shift assay (GMSA). Body weight, body size and kidney weight, as well as nephron number, in offspring of pregnant diabetic mice were significantly lower as compared to controls. Immunohistochemical analysis revealed significantly more apoptotic podocytes in glomeruli, as well as, increased active caspase-3 immunostaining in renal tubules of kidneys from offspring of pregnant diabetic dams as compared to controls. Intrarenal ANG and renin mRNA, and NF- κ B expression, and isoforms of NF- κ B (p50 and p65) were significantly upregulated in kidneys of offspring of pregnant diabetic mice as compared to controls. In conclusion, maternal diabetes impairs nephrogenesis via enhanced intrarenal RAS activation and NF- κ B signaling.

Introduction

Diseases such as maternal diabetes create an adverse *in utero* environment that may impair the process of embryogenesis, thus predisposing infants of low birth weight (LBW) to subsequent increased risk of future disease¹⁻⁵. The developing kidney appears particularly sensitive to a high glucose milieu, exposure to which may result in congenital renal malformations, i.e., renal agenesis, dysplasia or hypoplasia.⁶⁻⁹

Intrauterine growth retardation, defined as birth weight below the 10th percentile for gestational age, is associated with a reduction in nephron number.¹⁰ Although the so-called "thrifty phenotype" hypothesis suggesting that LBW is linked to perinatal programming,^{10;11} the underlying mechanisms whereby nephron number may be affected and/or nephron function altered, are not yet completely delineated.

The NF- κ B pathway has been reported to be a major intracellular target in hyperglycemia and oxidative stress,^{12;13} and its two functional pathways (canonical-classical and noncanonical) have been studied in the diabetic kidney.¹⁴⁻¹⁶ Five members of the NF- κ B family have been identified: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, and c-Rel. It appears that RelA (p65) and p50, in particular, can contribute to p53-, tumor necrosis factor- α (TNF- α)- and reactive oxygen species (ROS)-mediated cell apoptosis¹⁷⁻²¹. There is a growing consensus that a high glucose milieu and diabetes-induced activation of the NF- κ B pathway has a functional impact on the course of diabetic nephropathy.^{15;16;22;23} However, the underlying mechanisms of NF- κ B signaling in impairing renal morphogenesis are not well understood.

Deficiency, mutation or abnormal expression of genes of the intrarenal renin angiotensin system (RAS) during organogenesis in experimental animal models often leads to abnormal kidneys,^{12;24-28} with a decrease in ultimate nephron numbers.²⁹⁻³⁶ Studies including ours have demonstrated that intrarenal RAS activation plays a key role in the development of

hypertension and renal injury in diabetes.³⁷⁻⁴⁰ In a model of experimental diabetes in the rat Lee et al reported a functional interaction between NF- κ B (in particular, the p65 subunit) and the Ang II type I receptor (AT₁-R).⁴¹ Given these data, we hypothesize that, in diabetes, enhanced intrarenal RAS activation and NF- κ B signaling are two key elements intimately involved in the process of apoptosis in nascent nephrons, ultimately leading to nephron deficiency.

RESULTS

Neonatal Offspring from Control- and Diabetic -Hoxb7-GFP-Tg Mothers

The body length of neonatal offspring of STZ-induced diabetic mothers was significantly smaller as compared to those from control mothers (control vs diabetic neonate offspring in length (cm): 2.54 ± 0.27 vs 2.03 ± 0.25), as shown in Figure 1(A+B).

Biological Parameters

Offspring from diabetic mice remained significantly smaller and lighter (average 20% less) than control offspring during the entire suckling period. Figure 2A shows body weight (BW) for control vs STZ offspring (1.414 ± 0.11 vs 1.03 ± 0.07 g ($p \leq 0.001$) in neonate; 3.744 ± 0.90 vs 3.00 ± 1.01 g ($p \leq 0.05$) in 1 week; 6.93 ± 1.32 vs 5.71 ± 1.11 ($p \leq 0.001$) 2 week old; 12.12 ± 1.16 vs 9.79 ± 2.07 ($p \leq 0.001$) 3 week old animals), and Figure 2B indicates the ratio of kidney weight (KW) to BW, suggesting that kidneys of diabetic offspring are relatively large for their BW.

Renal Morphology, Nephron Number and Glomerular Volume in Neonatal Kidneys

H&E stained sections of whole-mount neonatal kidneys indicated that offspring from diabetic pregnant mice had smaller kidneys with smaller glomeruli size as compared to the kidneys of control offspring (Figure 3A). Meanwhile, we have found that the glomerular volume (V_G) of young diabetic offspring from neonate to 2 week-old is persistently less than one of control animals (Figure 3B). By carefully counting the number of nephrons, we have observed that neonatal nephron number in diabetic offspring is significantly lower than in control animals (average 40% less) [control vs diabetic neonate offspring in number: $3,038 \pm 175.52$ (N=6) vs $1,862 \pm 128.74$ (N=5) ($p \leq 0.001$)] (Figure 3C)..

STZ Toxicity Effect

STZ is an unstable product with a biological half-life in cell culture medium of approximately 19 minutes (www.sigmaaldrich.com). Since STZ administration does not induce diabetes 100% of the time, we had the opportunity to examine nephrogenesis in fetuses of STZ-exposed animals with or without diabetes. We performed additional experiments to determine whether STZ could affect nephrogenesis in Nephrlin-CFP-Tg mice *in vivo*. We have observed that renal damage (kidney size and number of glomeruli forming) appeared to be dependent on the level of maternal hyperglycemia (Figure 4A) but independent of STZ administration (Figure 4B) or the length of exposure to STZ (from 0 to 5 days (Figure 4C)). Thus, we feel that it is unlikely that a small amount of STZ (if it crosses the placenta) exerts toxicity in the fetus *in utero* in our model.

Apoptosis in Kidneys of Diabetic Offspring

TUNEL assay revealed that apoptotic cells appear to be increased in the collapsed nephron region in neonates and 1 week-old offspring of diabetic mothers as compared to control offspring at the same ages (Figure 5A). Double immunostaining with anti-Wilms tumor-1 (WT-1) and anti-active cleaved caspase-3 antibody indicates that glomerular podocytes undergo apoptosis, which ultimately results in nephron collapse (Figure 5B). Similarly, we have observed augmented cleaved caspase-3 immunostaining in renal tubule of offspring of diabetic mothers from neonate to 3-weeks of age as shown in Figure 6. Taken together, these data suggest that high glucose milieu creates an adverse *in utero* environment that dynamically triggers nascent nephron apoptosis during nephrogenesis, consequently resulting in dysmorphogenesis with small kidneys.

Activation of the Intrarenal RAS and NF- κ B pathways in Diabetic Offspring

RT-qPCR assays revealed that high glucose milieu *in utero* is capable of affecting intrarenal RAS gene expression in kidneys of offspring of diabetic dams; in particular, ANG and renin mRNA expression was persistently upregulated from the neonatal period to 3 weeks of age (Figure 7). Immunohistochemical examination of renal sections confirmed that augmented ANG protein expression is generally localized to the proximal tubule region in kidneys of

offspring of diabetic mother (Figure 8), whereas cells positive for renin appear in a glomerular or tubular position in offspring of diabetic mothers rather than in the juxtaglomerular apparatus as in normal offspring (Figure 9). Moreover, we have observed that the p50 and p65 subunits of NF- κ B were up-regulated and translocated from the cytosol to the nucleus in the proximal tubules of offspring from diabetic mother (Figure 10A). In gel mobility shift assays (GMSA), we have found that NF- κ B activation is more elevated in the neonatal kidneys of offspring from diabetic mothers compared to the offspring of control dams (Figure 10B). Taken together, our data indicate that a hyperglycemic environment *in utero* reduces kidney size and triggers apoptosis of nascent nephrons, possibly via the activation of the intrarenal RAS and NF- κ B pathways.

DISCUSSION

In the present work we aimed to delineate the functional role of maternal diabetes in modulating renal morphogenesis in their offspring and to study their underlying mechanisms. Our data indicate that a hyperglycemic environment *in utero* reduces kidney size and triggers nascent nephron apoptosis via intrarenal RAS activation and NF- κ B signaling.

Maternal diabetes presents an environmental challenge *in utero* and may fundamentally and dynamically impair the process of embryogenesis, thus predisposing to low birth weight (LBW).¹⁻⁵ By comparing the global phenotypes displayed in young offspring of control and diabetic mothers, we have observed that LBW pups with small kidneys are frequent in the offspring of diabetic dams. In the kidneys, we observed that glomeruli are smaller and that there are a relatively low number of nephrons; there is evidence of nephron collapse in these kidneys. These findings may constitute the genesis of low glomerular endowment.

In the 1980s Brenner and associates hypothesized that “low glomerular endowment” or “fewer numbers of nephrons” are a risk factor for hypertension and ESRD in adulthood.⁴²⁻⁴⁵ In principle, decreased nephron number leads to renal hyperfiltration (higher filtration pressure and an increased glomerular filtration rate (GFR) per glomerulus). Consequently, later in life, pressure natriuresis curves shift, leading to increase in blood pressure (BP), thereby enhancing the risk of injury due to hypertension and ESRD. Although outcomes such as LBW, small kidneys, fewer nephron numbers resulting from an adverse intrauterine environment that might predispose to future hypertension are known, the mechanisms by which this occurs remain incompletely delineated.

Increased apoptosis in the blastocyst, and later, in embryonic kidney, has been reported in rodent embryos developing in diabetic dams.⁴⁶⁻⁵¹ We would suggest that apoptosis, in particular differential apoptosis of specific renal lineages during nephrogenesis, induced by a high glucose milieu, is the major mechanism by which renal function is ultimately affected in diabetic offspring over time. The activation of intrarenal RAS and NF- κ B pathways are two

key mechanisms that appear critical in the apoptosis induced by an intrauterine high glucose milieu.

In normal nephrogenesis, apoptotic events occur normally throughout renal organogenesis until the formation of the final kidney is complete. For example, the undifferentiated stromal mesenchyme either becomes interstitial cells or is destined undergo apoptosis to make space for the expanding loops of Henle; in contrast the differentiated metanephric mesenchyme (MM) normally undergoes epithelialization as a result of mesenchymal-to-epithelial transformation and becomes the proximal portion of the nephron^{52,53}. However, under certain circumstances, for example, in maternal diabetes, if the resultant high glucose milieu triggers apoptotic events in cells that do not normally undergo apoptosis (e.g., differentiated mesenchymal mesenchyme), nephron formation may be altered and result in nephron collapse. Indeed, our data suggest that a high glucose milieu *in utero* retards renal morphogenesis by inducing a significantly higher number of apoptotic podocytes in the developing glomeruli and inducing a high level of caspase-3 activity in the renal tubule, perhaps via activation of NF- κ B pathways and the intrarenal RAS.

Based on our observations and those of others, we propose that high glucose-induced cell apoptosis resulting in nephron collapse in diabetic offspring may be due to several factors. First, although the NF- κ B pathway has been reported as a major intracellular target in hyperglycemia and oxidative stress,^{12,13,54} the expression pattern of NF- κ B in the kidneys of diabetic adults is still controversial,¹⁴⁻¹⁶ Regarding the offspring of diabetic mothers, the functional impact of NF- κ B pathways on apoptosis is unknown. We observed that NF- κ B pathway is upregulated in kidneys of diabetic offspring. Further, p50 and p65 subunits of NF- κ B were markedly upregulated, and these subunits were translocated from the cytosol to the nucleus in proximal tubular cells of diabetic offspring. Linking this observation to apoptosis, a first possibility might be that NF- κ B activation evokes several pro- and anti-apoptotic genes including Fas (CD95), TRAIL receptors (DR4, 5 and 6), the death-inducing ligands FasL, TNF α and TRAIL, tumor suppressor p53, Bcl-xL and Bcl-xS,^{17,19} which could lead to apoptosis of proximal tubular cells, consequently resulting in nephron collapse and,

ultimately, in nephron deficiency. Secondly, the intrarenal RAS, which has been extensively linked to diabetes-induced apoptosis in both human ⁵⁵ and experimental animal models, ⁵⁶ may play a role. ANG and renin are major contributors to the production of Ang II, the most physiologically active peptide of the RAS. We have observed that the expression of ANG and renin are dramatically activated and correlate with apoptotic events in kidneys of offspring of diabetic mother. Additionally, the cells that express renin, mainly in the renal juxtaglomerular apparatus ⁵⁷⁻⁵⁹ in the kidneys of the normal offspring, are found in the glomerular or tubular region in kidneys of offspring from diabetic mother. This shift in renin expression together with increased mANG expression might be capable of stimulating increased local Ang II formation, which could contribute to the observed increase in glomerular or tubular apoptosis; Finally, the cross-talk between NF- κ B pathways and the intrarenal RAS ^{23,60} may be fundamentally associated with nephron deficiency.

In conclusion, our present results demonstrate that maternal diabetes impairs renal development and induces nascent nephron cell apoptosis via enhanced intrarenal RAS activation and NF- κ B signaling.

METHODS

Animals

For these present *in vivo* studies we employed two fertile transgenic mouse (Tg) lines that have normal phenotype: Hoxb7- green fluorescent protein (GFP)-Tg (Hoxb7-GFP-Tg) and Nephrin- cyan fluorescent protein (CFP)-Tg (Nephrin-CFP-Tg). Hoxb7-GFP-Tg mice were kindly provided by Dr. Frank Costantini (Columbia University Medical Center, NY, NY, USA),^{61;62} which have been used to study ureteral bud branching in nephrogenesis.⁵⁴ Nephrin-CFP-Tg mice, which have CFP expression driven by the podocyte-specific nephrin promoter in glomeruli, were obtained from Dr. Susan Quaggin (University of Toronto, Toronto, ON, Canada).⁶³; these mice permit us to follow glomerular development during nephrogenesis.

Animal care in this set of studies met the standards set forth by the Canadian Council on Animal Care, and the procedures utilized were approved by the Institutional Animal Care Committee of the CHUM. Mice were housed under standard humidity and lighting conditions (12 hour light-dark cycles) and were allowed free access to standard mouse chow and water *ad libitum*. Timed-pregnant hoxb7-GFP mice aged 8-10 weeks were used in all experiments. Vaginal wet mounts were made to determine the estrous cycles of the mice. On the evening before estrus, female mice were housed overnight with male mice; the presence of spermatozoa in a vaginal smear the next morning was defined as day 1 of pregnancy.

Animal Model and Experimental Design

Based on our previous report⁶⁴ as well as those of others,⁶⁵⁻⁷¹ maternal diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, Sigma) at a dose of 150 mg/kg of body weight (BW) at E13 gestation age in Hoxb7-GFP mice. Meanwhile, we have performed pilot studies regarding STZ potential toxicity effect on nephron formation in Nephrin-CFP mice.

Offspring from diabetic Hoxb7-GFP pregnant mice were euthanized at 4 time periods after birth (N=24 at each time point): neonates, 1-week, 2-weeks and 3-weeks; Offspring from non-diabetic pregnant mice at same time point were used as controls.

Isolation of Metanephroi

Post-STZ embryos were micro-dissected aseptically from timed-pregnant Nephhrin-CFP mice (E16 and E18), and the metanephroi were isolated under sterile conditions as previous report.^{54,64} Glomerular images and quantification in nephrin-CFP-Tg were analyzed by fluorescence microscopy (Nikon Eclipse TE 2000-S Microscope, Montreal, QC, CA).

Biological Parameters, Renal Morphology Review & Renal Endowment Measurement (Mean Glomerular Volume (V_G) and N):

Biological parameters such as kidney weight, body weight and body length were carefully monitored during the entire suckling period. Hematoxylin/eosin (H/E) staining was used to review renal morphology;⁶⁴ We measured glomerular size using an estimate of mean glomerular volume (V_G) and also quantitated nephron number. V_G was determined by the method of Weibel and Gomez⁷² with the aid of an image analysis software system (Motic Images Plus 2.0, Motic, Richmond, BC, Canada). The V_G was estimated by the mean glomerular tuft area (A_T) derived from the light microscopic measurement of 30 random sectional profiles of glomeruli from each group (n=6 animals per group) using the formula: $V_g = \beta/k \times A_T^{1.5}$, where $\beta = 1.382$ (shape coefficient for spheres) and $k = 1.1$ (size distribution coefficient). Quantification of nephron number was adapted from J.F. Bertram's method using serial sections.⁷³

Real-Time -Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR [iQTM SYBR[@] Green Supermix Kit and MiniOpticonTM Real-Time PCR machine (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada)] was performed as reported previously^{36,54}. The forward and reverse primers corresponding to mouse (m) angiotensinogen (mANG), mouse renin (mRen) and β -actin cDNA^{36,54} in RT-qPCR assays were as follows:

mANG forward primer (5'- CCA CGC TCT CTG GAT TTA TC-3') and reverse primer (5'- ACA GAC ACC GAG ATG CTG TT-3') (NM_007428); mRen forward primer (5'- CTG GCC AAG TTT GAC GGT GTT-3') and reverse primer (5'- GTG TCC ACC ACT ACC GCA CAG -3') (BC061053); β -actin forward primer (5'- CGT GCG TGA CAT CAA AGA GAA -3') and reverse primer (5'- GCT CGT TGC CAA TAG TGA TGA -3') (NM_007393).

Terminal Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate (dUTP) Nick End-labeling (TUNEL) Assay

Paraffin-embedded kidney sections (5 μ m) fixed in 4% paraformaldehyde were deparaffinized in xylene and rehydrated. Apoptosis quantified with a TUNEL kit (La Roche Biochemicals, Laval, QC, Canada) according to the supplier's instructions.

Immunohistochemistry and Immunofluorescent staining

Paraffin-embedded kidney sections (5 μ m) fixed in 4% paraformaldehyde were deparaffinized in xylene and rehydrated. Immunohistochemical examination for ANG, renin, caspase-3 and NF- κ B pathway (p50 and p65) was performed by the standard avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA).^{39,74} The primary antibodies used include a polyclonal anti-ANG antibody^{39,74} (gift from Dr John S.D. Chan, CHUM-Hôtel Dieu Hospital, Montreal, QC, Canada) in a 1:100 dilution; anti-Wilms tumor-1 (WT-1) (clone 6F-H2, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) in 1:100 dilution; anti-cleaved caspase-3 polyclonal antibody (Cell Signaling, USA) in a 1:100 dilution; a polyclonal NF- κ B pathway antibody (p50/p65, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) in 1:100 dilution; and a polyclonal anti-renin antibody (Cat.#: RDI-rtreninabm) (Research Diagnostics Inc., Concord, MA, USA) in a 1:500 dilution.

Gel Mobility Shift Assay (GMSA)

Nuclear protein extracts were prepared from neonatal kidneys of control and diabetic offspring. GMSAs were performed as described previously,^{75;76} employing ³²P-labeled NF- κ B probes [NF- κ B consensus oligonucleotide: C1 (5' – AGT TGA GGG GAC TTT CCC

AGG C – 3') and C2 (5' –GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T– 3'); NF- κ B mutant oligonucleotide: M1 (5' – AGT TGA GGC GAC TTT CCC AGG C – 3') and M2 (5' –GCC TGG GAA AGT CGC CTC AAC T– 3')] (Cat.# SC-2505 and SC-2511, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA).

Statistical Analysis

Statistical significance between experimental groups was analyzed initially by Student's *t* test or by 1-way ANOVA followed by the Bonferroni test as appropriate. Three to four separate experiments were performed for each protocol. Data are expressed as means \pm SD. A probability level of $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the kind gifts of Hoxb7-GFP mice from Dr. Frank Costantini (Columbia University, New York, NY, USA). We also thank Dr. Indra R. Gupta (Montreal Children's Hospital, Montreal, QC, Canada), who taught us to count the number of nephrons using J.F. Bertram's method in serial sections and thank Dr. Maxime Bouchard (McGill Cancer Center, Montreal, QC, Canada), who provided us with anti-WT-1 antibody. Special thanks are to Dr. John S.D. Chan (CHUM-Hôtel-Dieu, Montreal, QC, Canada) and Dr. Julie R Ingelfinger (Massachusetts General Hospital, Boston, USA) for their unconditional support and discussion for this project. This research was supported by KRESCENT-CIHR and Kidney Foundation of Canada (KFOC) and a New Investigator Award (KRESCENT-CIHR scholarship) for Dr. Shao-Ling Zhang.

ABBREVIATIONS: CFP, cyan fluorescent protein; GFP, green fluorescent protein; GFR, glomerular filtration rate; H/E, hematoxylin/eosin; LBW, low birth weight; mANG, mouse angiotensinogen; MM, metanephric mesenchyme; mRen, mouse rennin; NF-kB, nuclear factor kappa B; RAS, renin-angiotensin system; ROS, reactive oxygen species; RT-qPCR, real-time-quantitative polymerase chain reaction; STZ, streptozotocin; Tg, transgenic mouse; TNF-a, tumor necrosis factor-a; TUNEL, terminal Transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end-labeling.

Reference List

1. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Fetal growth and long-term consequences in animal models of growth retardation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 81:149-156, 1998
2. Holemans K, Gerber RT, Meurrens K, De CF, Poston L, Van Assche FA: Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42:81-89, 1999
3. Holemans K, Caluwaerts S, Van Assche FA: Unravelling the fetal origins hypothesis. *Lancet* 360:2073-2075, 2002
4. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig* 10:392-399, 2003
5. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol* 547:11-20, 2003
6. Kitzmiller JL, Gavin LA, Gin GD, Jovanovic-Peterson L, Main EK, Zigrang WD: Preconception care of diabetes. Glycemic control prevents congenital anomalies. *JAMA* 265:731-736, 1991
7. Lynch SA, Wright C: Sirenomelia, limb reduction defects, cardiovascular malformation, renal agenesis in an infant born to a diabetic mother. *Clin Dysmorphol* 6:75-80, 1997
8. Soler NG, Walsh CH, Malins JM: Congenital malformations in infants of diabetic mothers. *Q J Med* 45:303-313, 1976
9. Woolf AS: Multiple causes of human kidney malformations. *Arch Dis Child* 77:471-473, 1997
10. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM: Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension* 47:502-508, 2006
11. Manning J, Vehaskari VM: Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* 16:417-422, 2001
12. Mercurio F, Manning AM: NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18:6163-6171, 1999
13. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofler S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP: The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors* 10:157-167, 1999
14. Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, Paludan SR, Rasch R: Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 53:166-172, 2004
15. Morcos M, Sayed AA, Bierhaus A, Yard B, Waldherr R, Merz W, Kloeting I, Schleicher E, Mentz S, bd el Baki RF, Tritschler H, Kasper M, Schwenger V, Hamann A, Dugi KA, Schmidt AM, Stern D, Ziegler R, Haering HU, Andrassy M, van der WF, Nawroth PP: Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Diabetes* 51:3532-3544, 2002
16. Starkey JM, Haidacher SJ, LeJeune WS, Zhang X, Tieu BC, Choudhary S, Brasier AR, Denner LA, Tilton RG: Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor-kappaB pathways in renal cortex. *Diabetes* 55:1252-1259, 2006
17. Perkins ND, Gilmore TD: Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 13:759-772, 2006
18. Janssen I, Katzmarzyk PT, Boyce WF, King MA, Pickett W: Overweight and obesity in Canadian adolescents and their associations with dietary habits and physical activity patterns. *J Adolesc Health* 35:360-367, 2004
19. Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinis C: Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25:6800-6816, 2006

20. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumura K: Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ* 13:730-737, 2006
21. Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, Yagita H, Okumura K, Harding H, Nakano H: Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* 280:33917-33925, 2005
22. Bierhaus A, Schiekofe S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP: Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50:2792-2808, 2001
23. Lee FT, Cao Z, Long DM, Panagiotopoulos S, Jerums G, Cooper ME, Forbes JM: Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2139-2151, 2004
24. Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I: Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 272:F299-F304, 1997
25. Okubo S, Niimura F, Matsusaka T, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I: Angiotensinogen gene null-mutant mice lack homeostatic regulation of glomerular filtration and tubular reabsorption. *Kidney Int* 53:617-625, 1998
26. Matsusaka T, Kon V, Takaya J, Katori H, Chen X, Miyazaki J, Homma T, Fogo A, Ichikawa I: Dual renin gene targeting by Cre-mediated interchromosomal recombination. *Genomics* 64:127-131, 2000
27. Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I: Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101:755-760, 1998
28. Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, Yoshida H, Ichiki T, Threadgill D, Phillips JA, III, Hogan BM, Fogo A, Brock JW, III, Inagami T, Ichikawa I: Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell* 3:1-10, 1999
29. Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P: The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiol Scand* 181:529-535, 2004
30. Ingelfinger JR, Woods LL: Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am J Hypertens* 15:46S-49S, 2002
31. Iosipiv IV, Schroeder M: A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F199-F207, 2003
32. Moritz KM, Dodic M, Wintour EM: Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays* 25:212-220, 2003
33. Pan L, Gross KW: Transcriptional regulation of renin: an update. *Hypertension* 45:3-8, 2005
34. Solhaug MJ, Bolger PM, Jose PA: The developing kidney and environmental toxins. *Pediatrics* 113:1084-1091, 2004
35. Wolf G: Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 9:48-51, 2002
36. Zhang SL, Moini B, Ingelfinger JR: Angiotensin II increases Pax-2 expression in fetal kidney cells via the AT2 receptor. *J Am Soc Nephrol* 15:1452-1465, 2004
37. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 143:2975-2985, 2002

38. Hsieh TJ, Fustier P, Wei CC, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Fantus IG, Hamet P, Chan JS: Reactive oxygen species blockade and action of insulin on expression of angiotensinogen gene in proximal tubular cells. *J Endocrinol* 183:535-550, 2004
39. Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL, Liu F, Hsieh TJ, Brezniceanu ML, Guo DF, Filep JG, Ingelfinger JR, Sigmund CD, Hamet P, Chan JS: RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 69:1016-1023, 2006
40. Zhang SL, Chen X, Wei CC, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS: Insulin inhibits dexamethasone effect on angiotensinogen gene expression and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *Endocrinology* 143:4627-4635, 2002
41. Lee FT, Cao Z, Long DM, Panagiotopoulos S, Jerums G, Cooper ME, Forbes JM: Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2139-2151, 2004
42. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S: Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1:335-347, 1988
43. Brenner BM, Mackenzie HS: Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 63:S124-S127, 1997
44. Mackenzie HS, Brenner BM: Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis* 26:91-98, 1995
45. Mackenzie HS, Lawler EV, Brenner BM: Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney Int Suppl* 55:S30-S34, 1996
46. Chi MM, Pingsterhaus J, Carayannopoulos M, Moley KH: Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst 12. *J Biol Chem* 275:40252-40257, 2000
47. Keim AL, Chi MM, Moley KH: Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53 10. *Mol Reprod Dev* 60:214-224, 2001
48. Leunda-Casi A, Genicot G, Donnay I, Pampfer S, De HR: Increased cell death in mouse blastocysts exposed to high D-glucose in vitro: implications of an oxidative stress and alterations in glucose metabolism 4. *Diabetologia* 45:571-579, 2002
49. Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM: Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways 14. *Nat Med* 4:1421-1424, 1998
50. Pampfer S, Donnay I: Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat 19. *Cell Death Differ* 6:533-545, 1999
51. Pampfer S, Cordi S, Vanderheyden I, Van Der SP, Courtoy PJ, Van CA, Alexandre H, Donnay I, De HR: Expression and role of Bcl-2 in rat blastocysts exposed to high D-glucose 11. *Diabetes* 50:143-149, 2001
52. Ekblom P, Miettinen A, Virtanen I, Wahlstrom T, Dawnay A, Saxen L: In vitro segregation of the metanephric nephron 4. *Dev Biol* 84:88-95, 1981
53. Piscione TD, Rosenblum ND: The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights 3. *Differentiation* 70:227-246, 2002
54. Chen YW, Liu F, Tran S, Zhu Y, Hebert MJ, Ingelfinger JR, Zhang SL: Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in

- mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
55. Kumar D, Robertson S, Burns KD: Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem* 259:67-70, 2004
 56. Brezniceanu ML, Liu F, Wei CC, Tran S, Sachelletti S, Zhang SL, Guo DF, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JS: Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. *Kidney Int* 2007
 57. Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA: Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F345-F356, 2001
 58. Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ: Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100:1566-1574, 1997
 59. Gomez RA, Tufro-McReddie A, Norwood VF, Harris M, Pentz ES: Renin-angiotensin system: kidney growth and development. *Exp Nephrol* 2:130, 1994
 60. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA, Caorsi I, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J: Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* S64-S70, 2003
 61. Srinivas S, Goldberg MR, Watanabe T, D'Agati V, al-Awqati Q, Costantini F: Expression of green fluorescent protein in the ureteric bud of transgenic mice: a new tool for the analysis of ureteric bud morphogenesis. *Dev Genet* 24:241-251, 1999
 62. Watanabe T, Costantini F: Real-time analysis of ureteric bud branching morphogenesis in vitro. *Dev Biol* 271:98-108, 2004
 63. Cui S, Li C, Ema M, Weinstein J, Quaggin SE: Rapid isolation of glomeruli coupled with gene expression profiling identifies downstream targets in Pod1 knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 16:3247-3255, 2005
 64. Zhang SL, Chen YW, Tran S, Chenier I, Hebert MJ, Ingelfinger JR: Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18:2105-2115, 2007
 65. Cuezva JM, Burkett ES, Kerr DS, Rodman HM, Patel MS: The newborn of diabetic rat. I. Hormonal and metabolic changes in the postnatal period. *Pediatr Res* 16:632-637, 1982
 66. Kanwar YS, Akagi S, Nayak B, Sun L, Wada J, Xie P, Thakur A, Chugh SS, Danesh FR: Renal-specific oxidoreductase biphasic expression under high glucose ambience during fetal versus neonatal development. *Kidney Int* 68:1670-1683, 2005
 67. Eriksson U, Andersson A, Efendic S, Elde R, Hellerstrom C: Diabetes in pregnancy: effects on the foetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentration and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 94:354-364, 1980
 68. Oh W, Gelardi NL, Cha CJ: Maternal hyperglycemia in pregnant rats: its effect on growth and carbohydrate metabolism in the offspring. *Metabolism* 37:1146-1151, 1988
 69. Kervran A, Guillaume M, Jost A: The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 15:387-393, 1978
 70. Aerts L, Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC, Malaisse WJ, Van Assche FA: The diabetic intrauterine milieu has a long-lasting effect on insulin secretion by B cells and on insulin uptake by target tissues. *Am J Obstet Gynecol* 159:1287-1292, 1988
 71. Oh W, Gelardi NL, Cha CJ: The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. *Pediatr Res* 29:606-610, 1991
 72. Weibel ER: Numerical density: shape and size of particles. In: *Stereological Methods* Vol 2 Theoretical Foundations (ed. Weibel ER). London, Academic Press, 1980, pp 149-152
 73. Bertram JF: Counting in the kidney. *Kidney Int* 59:792-796, 2001

74. Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL, Hsieh TJ, Guo DF, Hebert MJ, Ingelfinger JR, Filep JG, Chan JS: Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 69:1977-1985, 2006
75. Chen X, Zhang SL, Pang L, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS: Characterization of a putative insulin-responsive element and its binding protein(s) in rat angiotensinogen gene promoter: regulation by glucose and insulin. *Endocrinology* 142:2577-2585, 2001
76. Wei CC, Guo DF, Zhang SL, Ingelfinger JR, Chan JS: Heterogenous nuclear ribonucleoprotein F modulates angiotensinogen gene expression in rat kidney proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 16:616-628, 2005

Figure Legends

Figure 1 Image of representative newborn Hoxb7-GFP mice from non-diabetic and diabetic mother. The offspring of diabetic mother are significantly smaller than one of non-diabetic mother (control).

Figure 2 Physical parameters in offspring of Hoxb7-GFP-Tg Mice. Offspring from diabetic mother had significantly lower body weight (20% less on average) than control offspring during the entire suckling period (Neonate to 3 weeks of age) (A); The ratios of kidney weight (KW) to BW in offspring from diabetic mother were also significantly higher than control offspring (B). (Blue bar: control offspring; purple bar: offspring from diabetic mother). *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.001$.

Figure 3 Renal Morphology and V_G Measurement. (A) Hematoxylin & Eosin (HE) staining indicates that kidney and glomerular size of neonatal offspring from diabetic mother are apparently smaller as compared control offspring. (control neonate in blue frame; neonate from diabetic mother in red frame; Magnification, 20X and 60X). (B) Quantification of V_G value in control and diabetic offspring from neonate to 3 week-old. The y axis shows the percentage of V_G value compared to control animal (100%). [Blue bar: control offspring (Neonate: N=9; 1week-old: N=12; 2 week-old: N=9; 3week-old: N=8); Red bar: Diabetic offspring (Neonate: N=8; 1week-old: N=8; 2 week-old: N=7; 3week-old: N=8)]. **, $P \leq 0.01$; (C) Quantification of neonatal nephron number. The y axis shows the percentage of nephron number compared to control animal (100%). [Blue bar: control offspring (Neonate: N=6); Red bar: Diabetic offspring (Neonate: N=5). ***, $p \leq 0.001$].

Figure 4 STZ toxicity studies in Nephrin-CFP-Tg mice. Figure 3A show that E16 embryonic kidney isolated from pregnant mice with three different maternal hyperglycemic levels: normal (6.0 mmol), mild (14.3 mmol) and severe (24.9 mmol) after 3 days of STZ

administration (150 mg/kg, ip, at E13). Figure 4B depicts E16 embryonic kidneys isolated from pregnant mice in normal maternal glucose range with or without administration of STZ at E13. Figure 4C shows E16 and E18 embryonic kidneys isolated from pregnant mice in normal maternal glucose level with STZ administration at E13 (Magnification, 2X and 4X).

Figure 5 Apoptotic assay (TUNEL, Figure 5A) in kidneys of offspring from non-diabetic and diabetic mothers. Neonate (a and b); offspring at 1-week old (c and d); offspring at 2-weeks old (e and f); and offspring at 3 week-old (g and h) (Magnification 60X); Figure 5B shows the double immunostaining of WT-1 (a) and active caspase-3 expression (b) as well as a merged image (c) in neonatal kidneys of offspring from non-diabetic and diabetic mothers. (Magnification 60X).

Figure 6 Active caspase-3 expression in kidneys of offspring from non-diabetic (control) and diabetic mothers: neonate (a and b); offspring at 1-week old (c and d); offspring at 2-weeks old (e and f); and offspring at 3 week-old (g and h) (Magnification 60X).

Figure 7 Mouse ANG and renin mRNA expression assayed by RT-qPCR. Figure 6A and Figure 6B show that the expression levels of ANG and renin mRNA, respectively, in kidneys of offspring from non-diabetic and diabetic mothers aged from neonate to 3 week-old. **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.005$.

Figure 8 ANG protein expression in kidneys of offspring from non-diabetic (control) and diabetic mothers: neonate (a and b); offspring at 1-week old (c and d); offspring at 2-weeks old (e and f); and offspring at 3 week-old (g and h) (Magnification 60X).

Figure 9 Renin protein expression in kidneys of offspring from non-diabetic (control) and diabetic mothers: neonate (a and b); offspring at 1-week old (c and d); offspring at 2-weeks old (e and f); and offspring at 3 week-old (g and h) (Magnification 60X).

Figure 10 NF- κ B expression and localization as well as activation in neonate kidneys from control and diabetic mothers. (A) Expression and localization of two isoforms of NF- κ B, p50 and p65, were displayed by immunostaining (Magnification 60X); (B) EMSA assay. The labeled DNA probe (0.1 pmol) was incubated without (lane 1) or with BSA (10 μ g) (lane 2) or renal nuclear protein(s) (N.P., 10 μ g each) of neonatal kidney (lanes 3-8) in the presence of 0.3 units of poly dI-dC. Renal N.P. from neonatal control (line 3, 5 and 7) and diabetic offspring (line 4, 6, 8) is incubated with consensus NF- κ B DNA cold probe (line 3 and 4), consensus NF- κ B DNA probe (line 5 and 6) and mutant NF- κ B DNA probe (line 7 and 8), respectively.

(A) Neonate-Control Offspring (Ruler)



0 cm

1 cm

2 cm

3 cm

(B) Neonate-Diabetic Offspring



0 cm

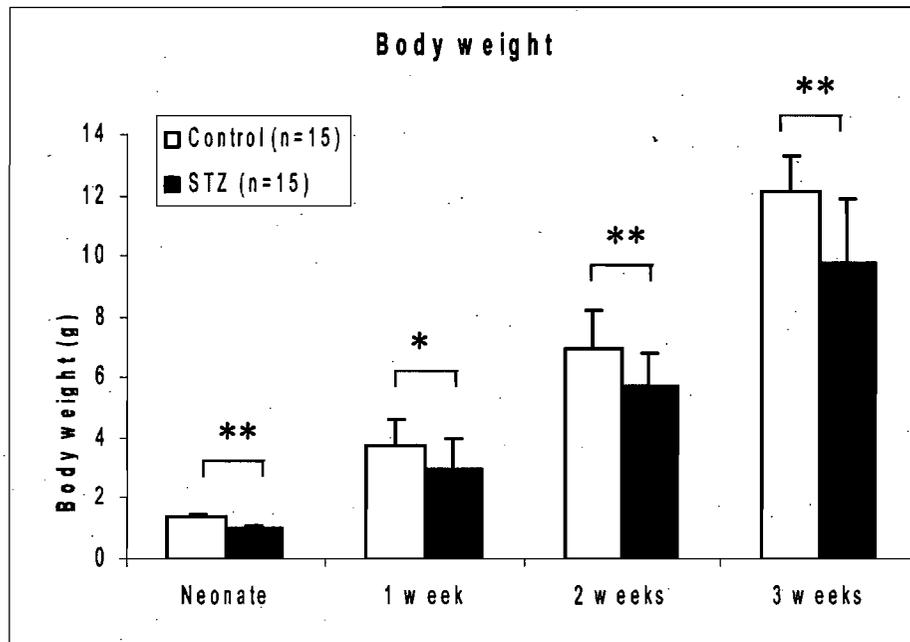
1 cm

2 cm

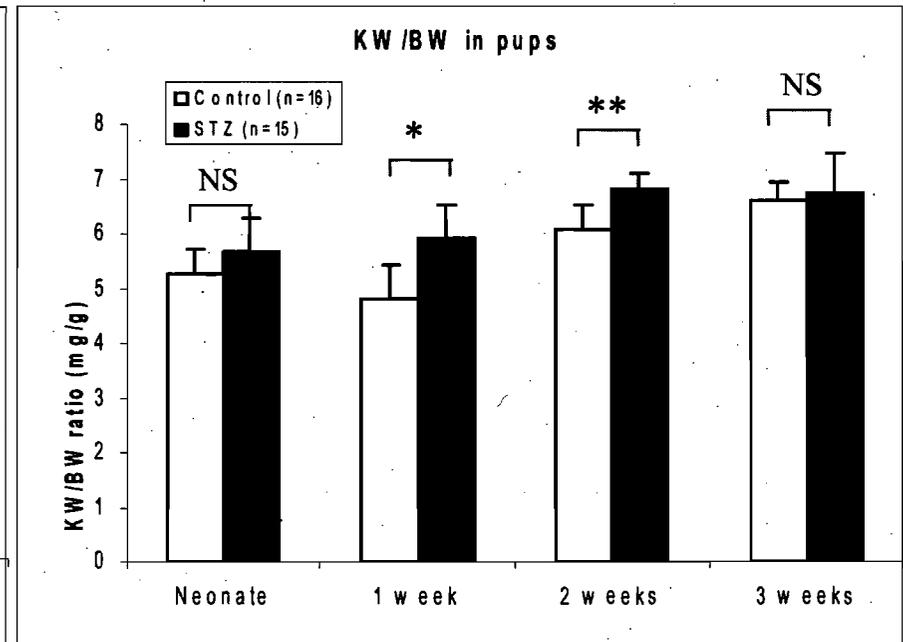
Figure 1

Biological Parameter

(A) Body Weight



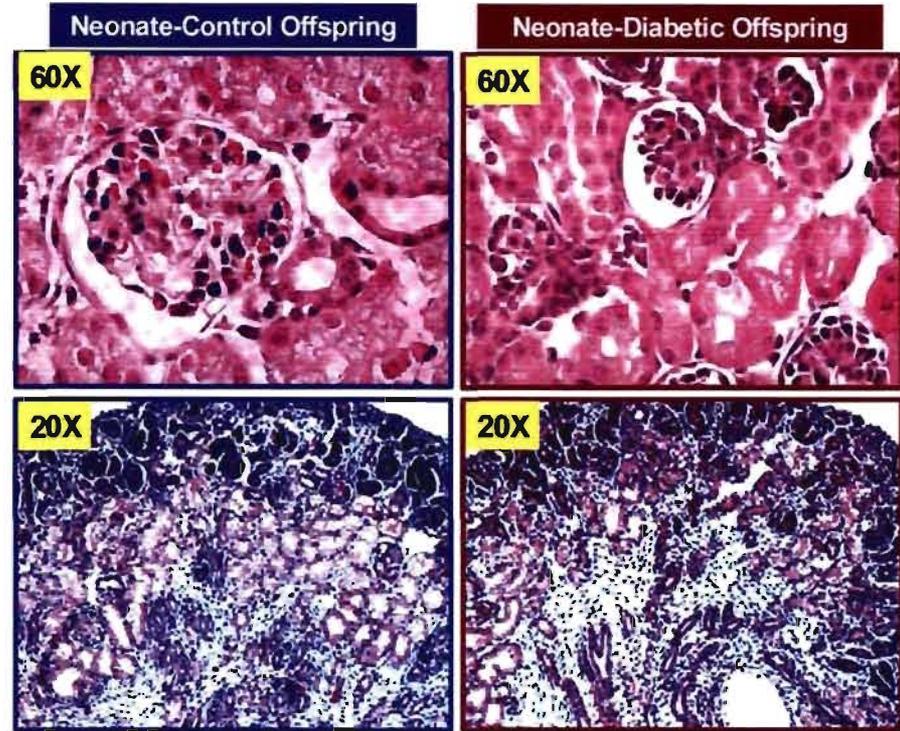
(B) KW/BW Ratio



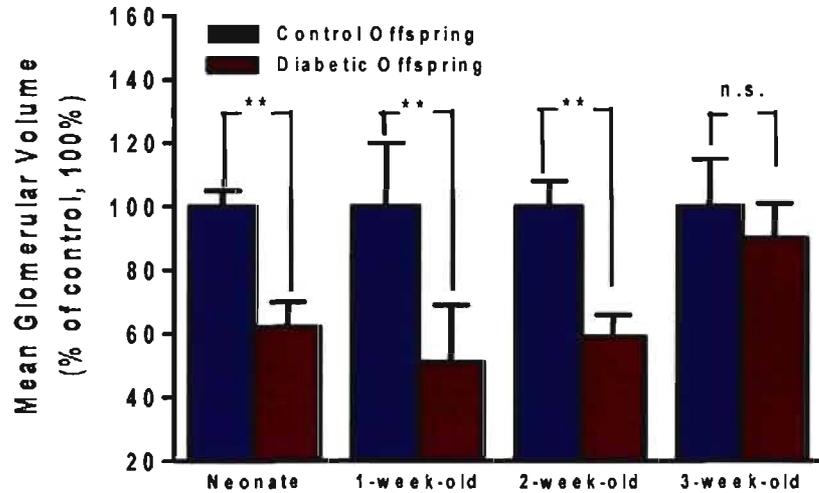
* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ Statistics analyzed by ANOVA or unpaired *t*-test

Figure 2

(A) Renal Morphology (HE)



(B) Mean Glomerular Volume (V_G)



(C) Quantification of Nephron Number

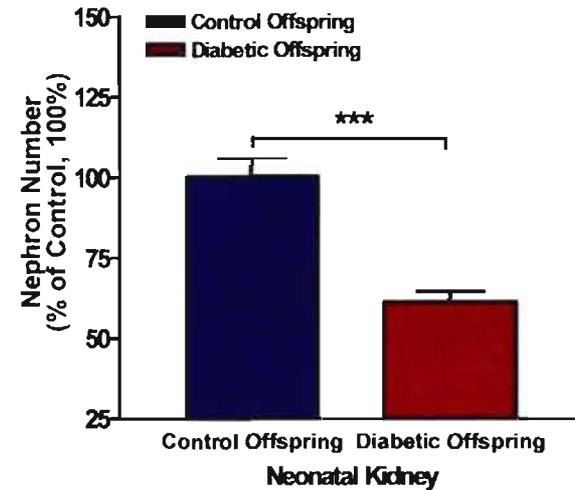


Figure 3

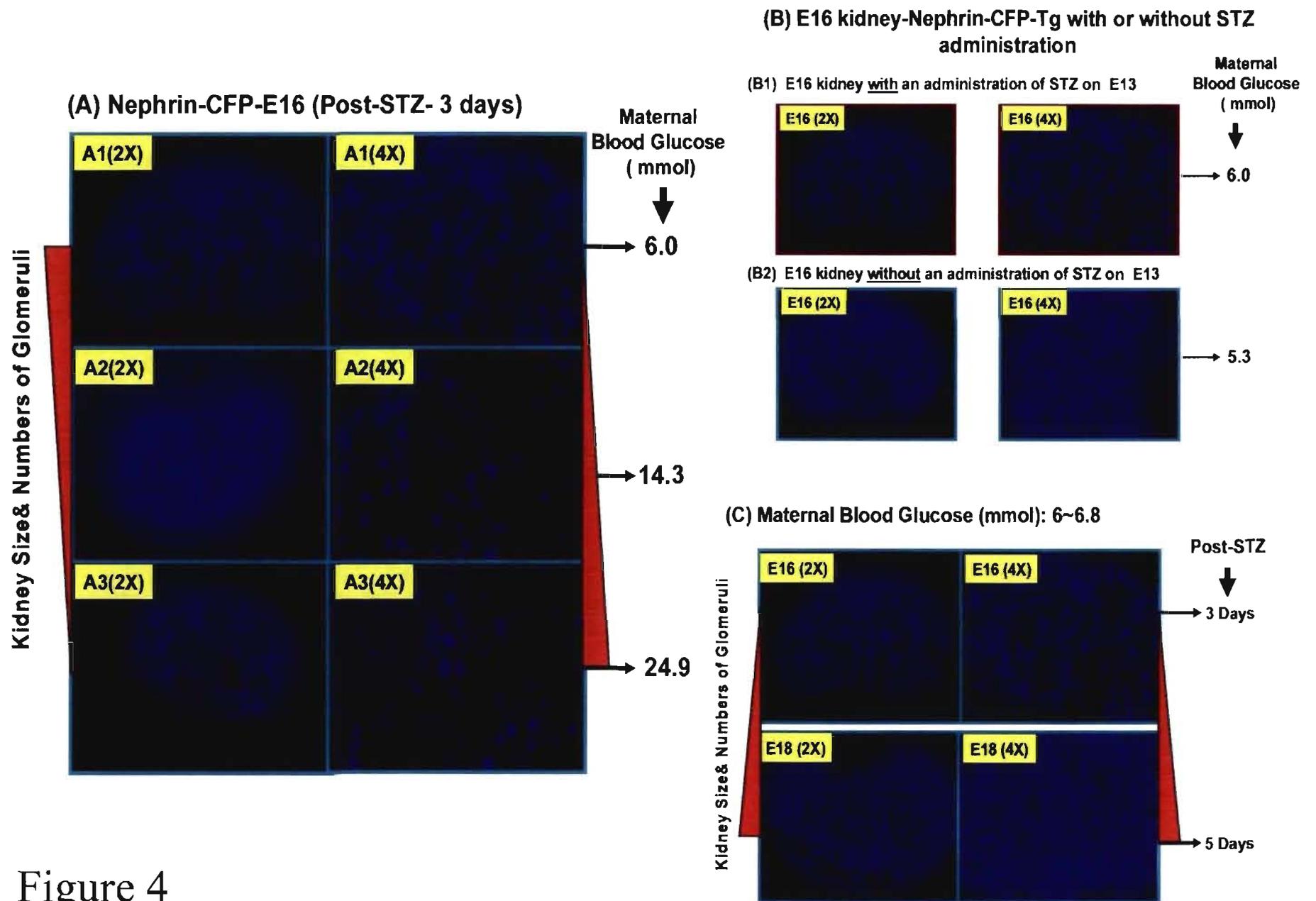
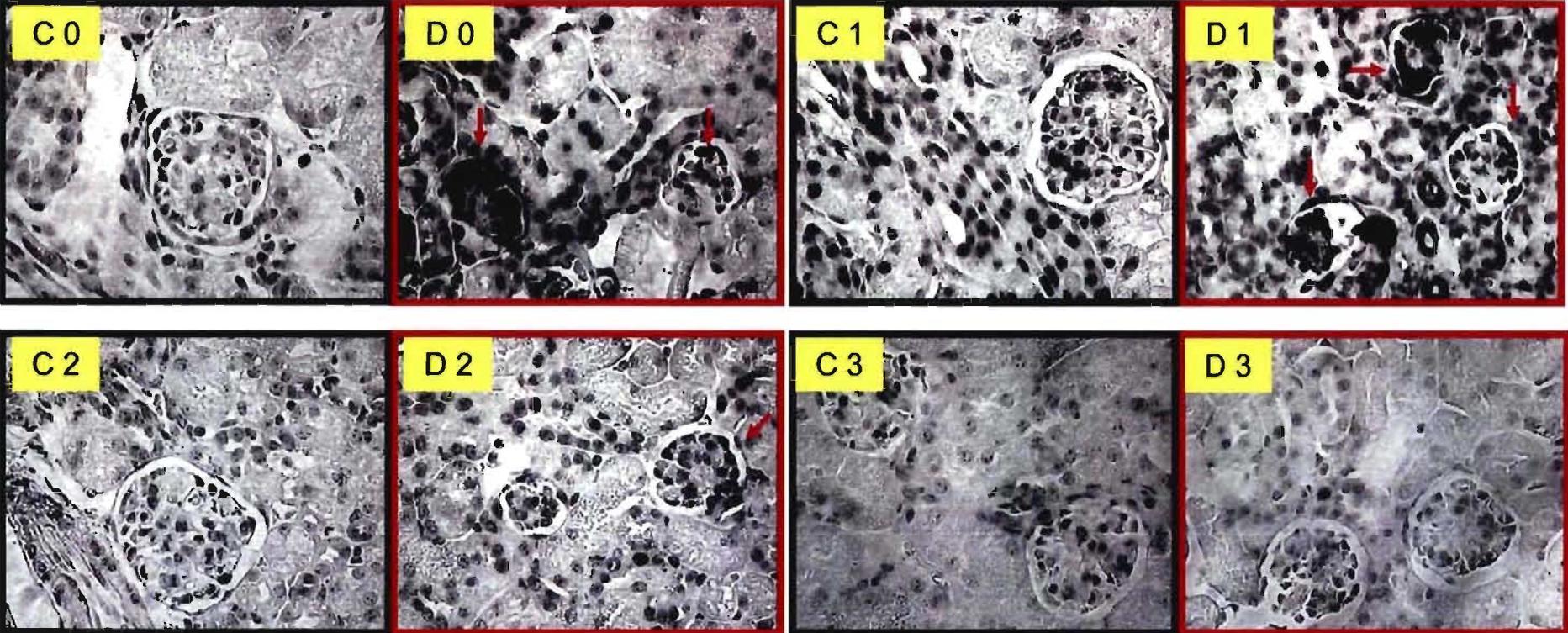


Figure 4

(A) TUNEL



(B) Immunostaining-Neonatal kidney (diabetic offspring)

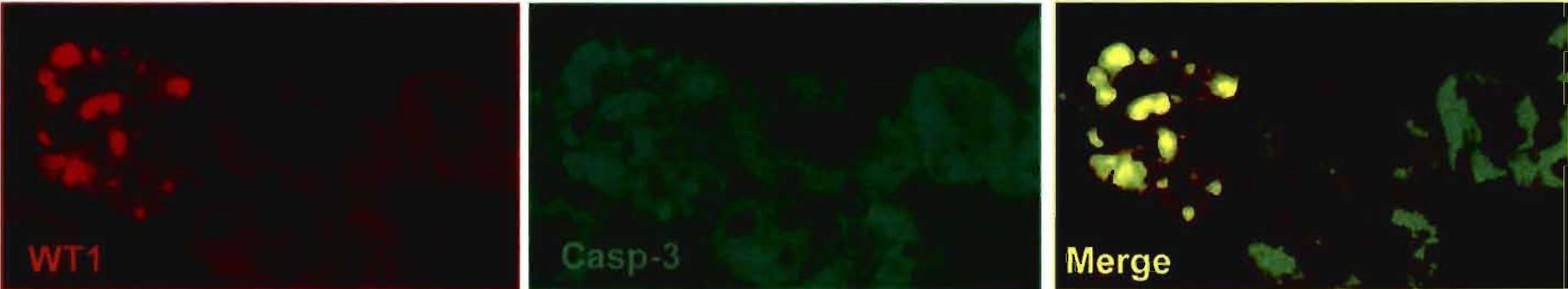


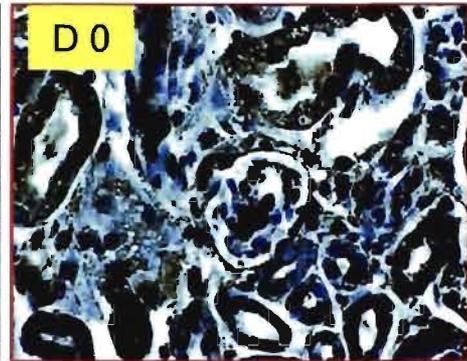
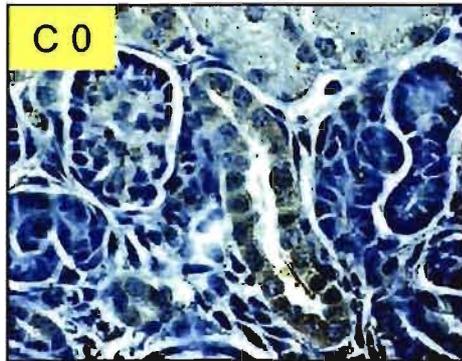
Figure 5

ActiveCaspase-3 staining-Offspring

Offspring-Neonate

Control

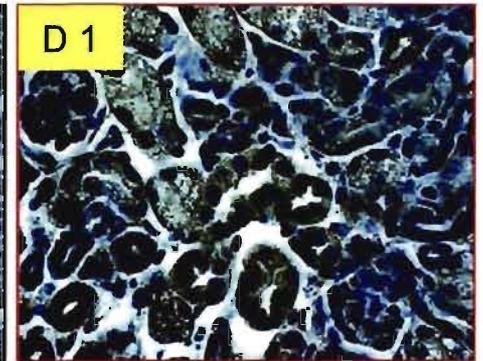
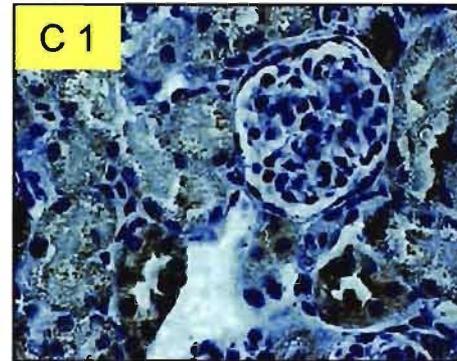
Diabetic



Offspring-1 week-old

Control

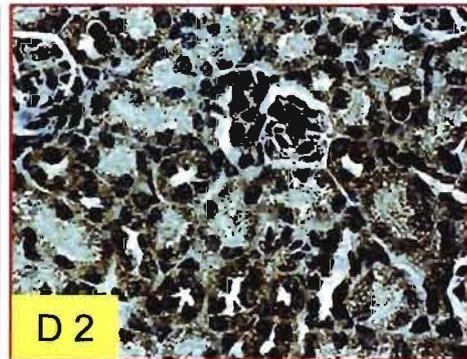
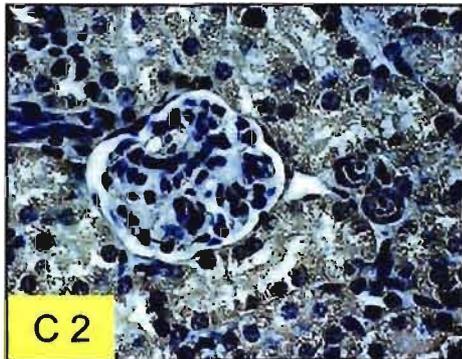
Diabetic



Offspring-2 week-old

Control

Diabetic



Offspring-3 week-old

Control

Diabetic

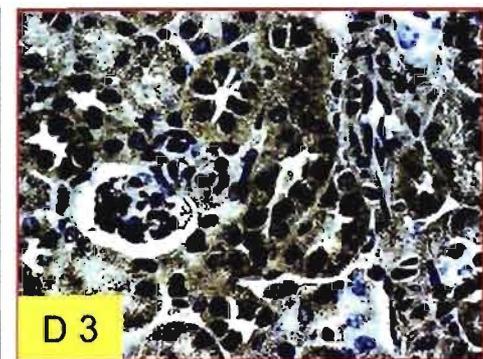
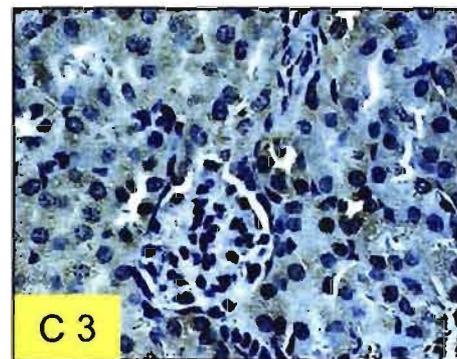


Figure 6

qRT-PCR

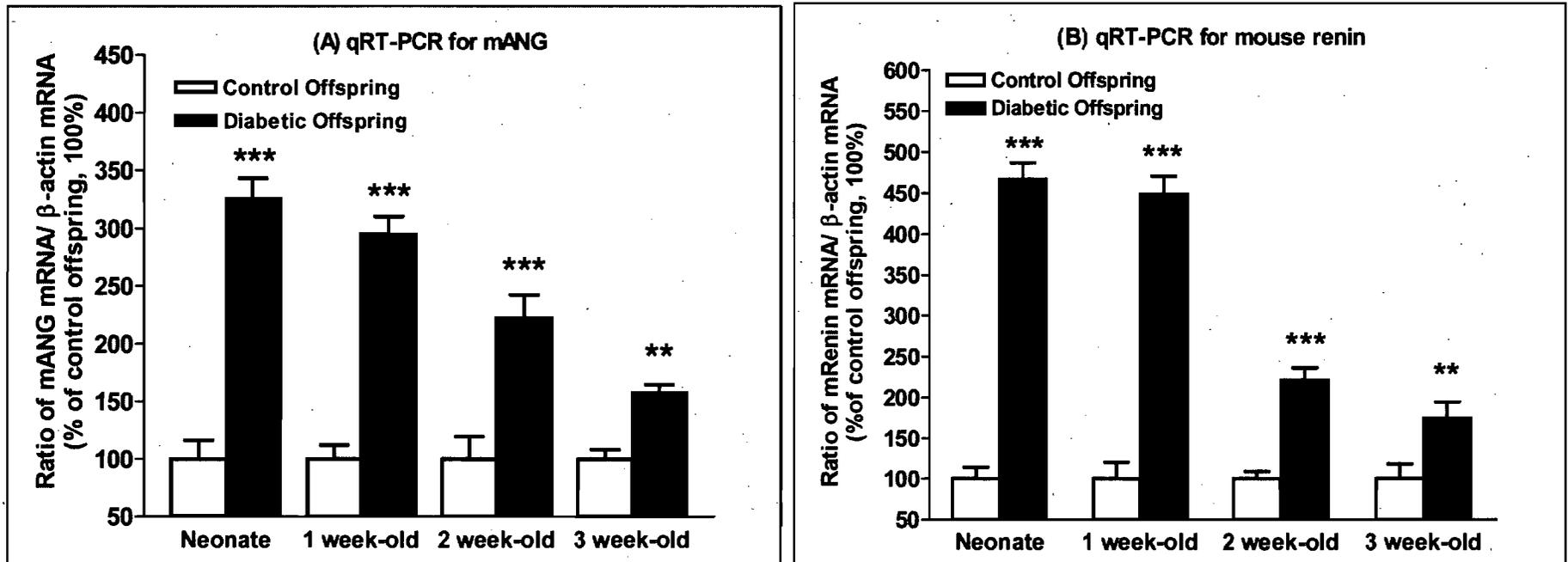


Figure 7

Offspring-ANG staining (60X)

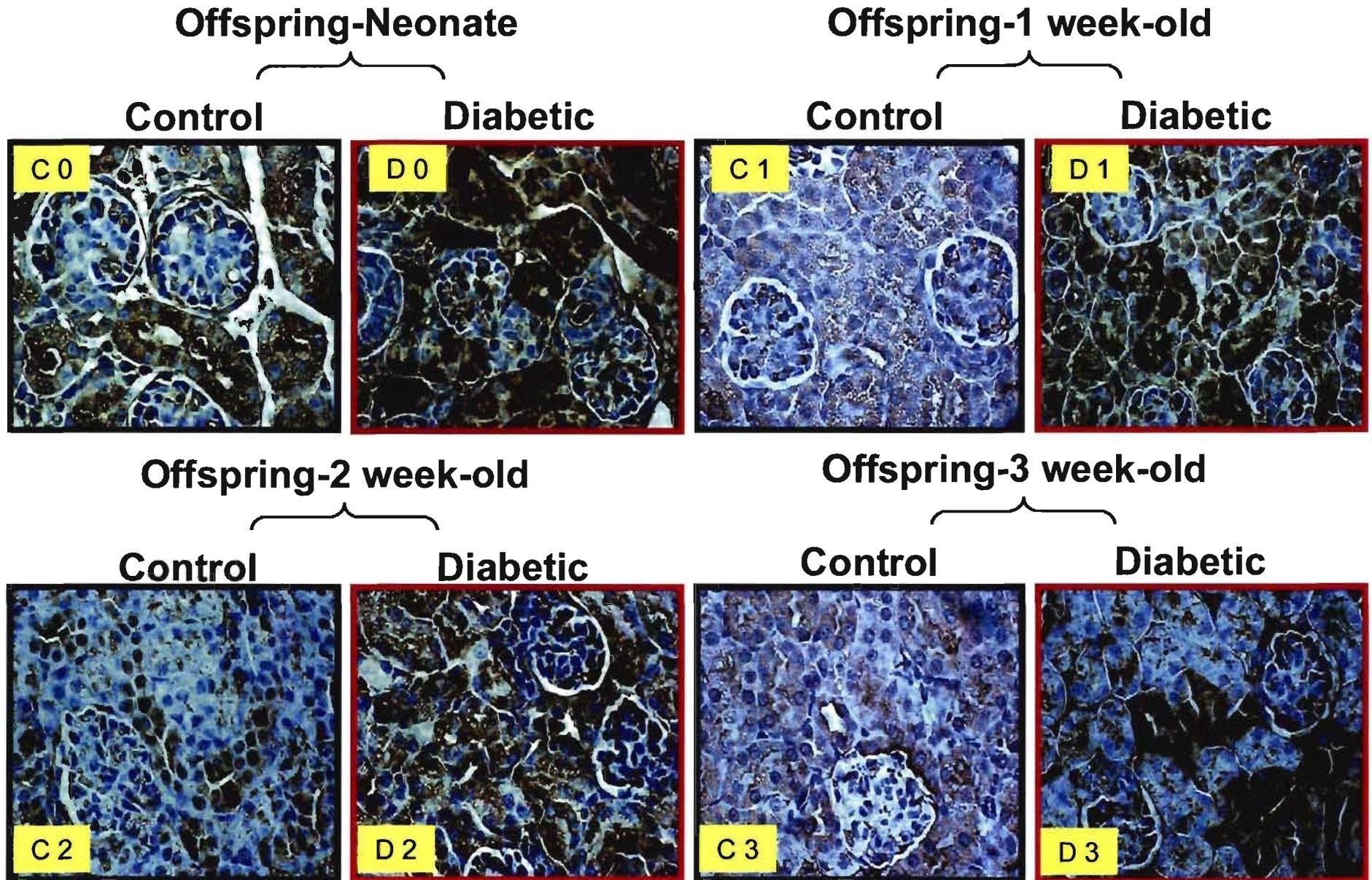


Figure 8

Offspring-Renin staining (60X)

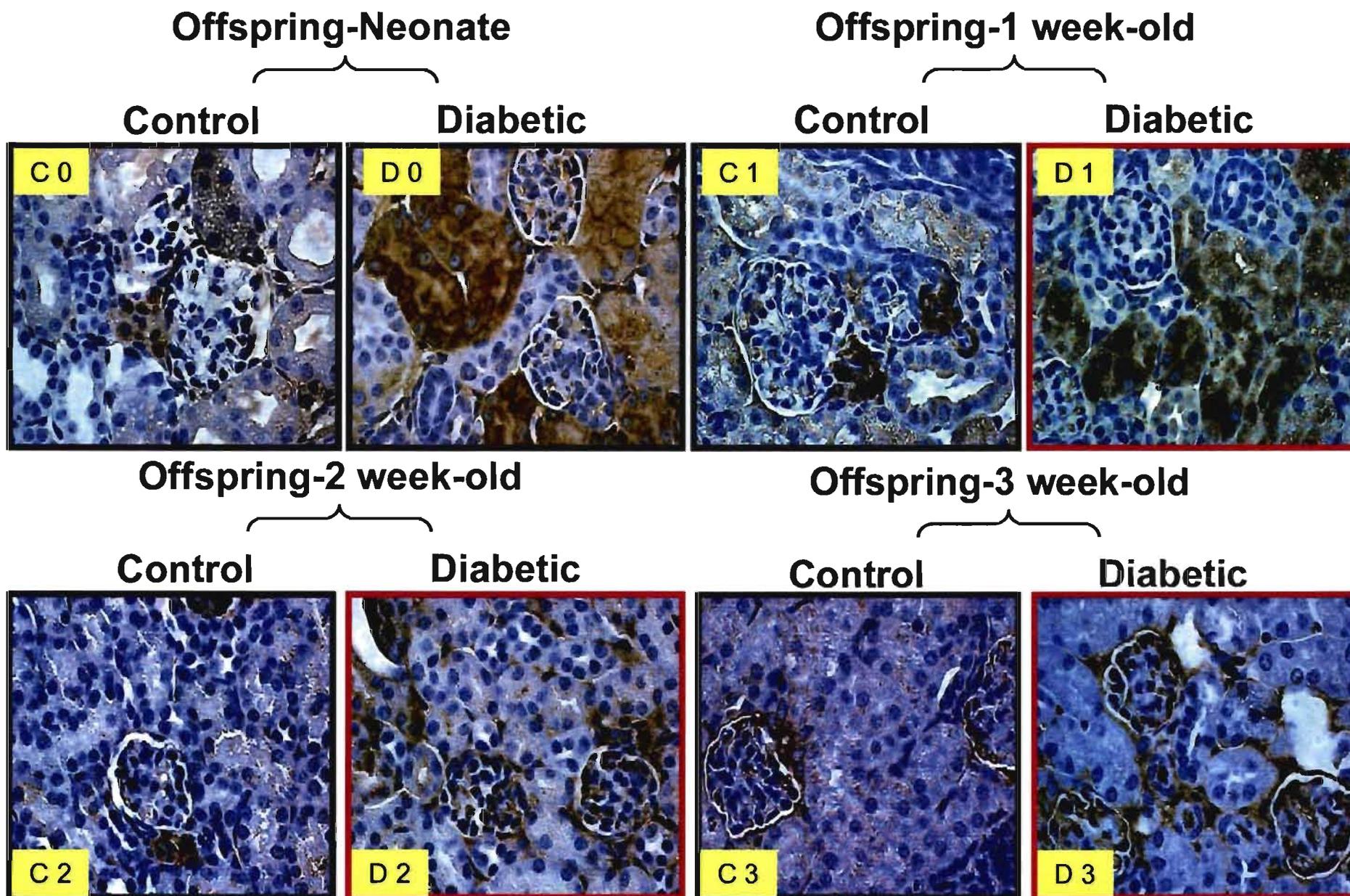
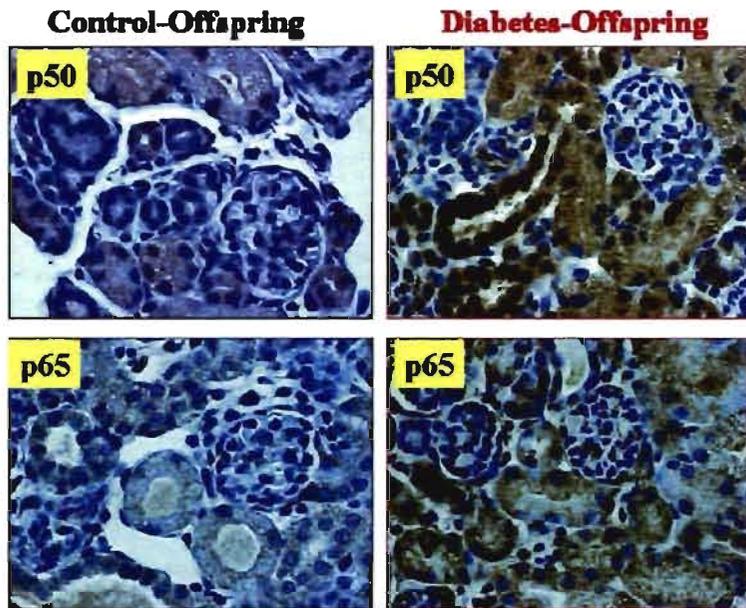


Figure 9

(A) Immunostaining



(B) EMSA

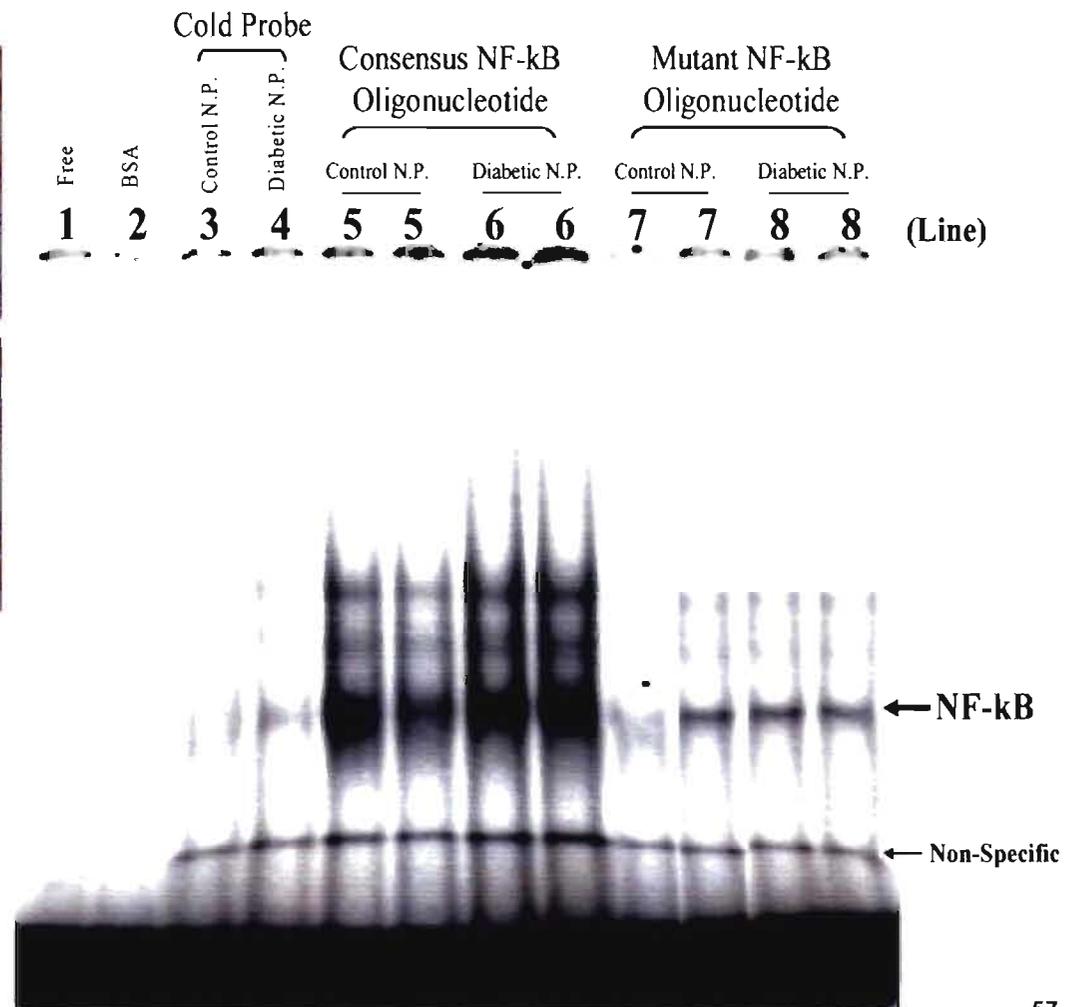


Figure 10

Discussion

Notre modèle expérimental de diabète maternel sévère offre un environnement *in utero* sub-optimal par son milieu surchargé de stress oxydant et par le débalancement des éléments nutritifs fournis au fœtus. Ces conditions sont néfastes au processus de l'embryogenèse ainsi qu'à la plasticité métabolique foetale. Par conséquent, la "mauvaise" programmation périnatale du fœtus persiste et prédispose celui-ci à des désordres associés à l'hypothèse de Barker (ex. : hypertension, intolérance au glucose, maladies rénales) car les mécanismes régulateurs et développementaux sont ajustés aux concentrations physiologiques anormales de l'environnement *in utero* [277]. Notre étude examine les reins de la progéniture née de mères diabétiques de la naissance (nouveau-né) jusqu'à l'âge de trois semaines. Nous nous intéressons ici à la dysmorphogenèse rénale de la progéniture de mères diabétiques (ODM). Ce projet de recherche s'inscrit dans une initiative de disséquer le rôle fondamental de la néphrogenèse altérée, résultant d'une hyperglycémie *in utero*, dans la programmation périnatale de la néphropathie et ses complications chez la progéniture à long terme.

La microsomie retrouvée chez la progéniture de mères diabétiques (Figure 1, page 48) peut être expliquée par la théorie de IUGR. Causée par l'hyperglycémie maternelle sévère, la diminution du flot utéro-placentaire cause une malnutrition foetale et entraîne un retard dans le développement rénal du fœtus ODM. De la naissance au sevrage (3 semaines), ces derniers présentent un poids corporel significativement réduit comparés à la progéniture contrôle (Figure 2, page 49).

Bien qu'illustrant une situation d'anomalie congénitale extrême, un lien de causalité entre le CRS et la tératogénicité associée à l'hyperglycémie a été rapporté par Kanwar et al. [173]. Comme démontré à la figure 10 en annexe, nous avons aussi remarqué une certaine tendance au CRS avec un développement déficient de la partie inférieure du corps chez une minorité de nos souriceaux nouveaux-nés ODM. Nous suggérons qu'une évaluation plus approfondie des structures affectées est nécessaire afin de bien

identifier le CRS. De plus, puisque le CRS sévère est un phénotype habituellement léthal, une analyse statistique qui examinerait aussi les embryons serait plus représentative de l'incidence d'un tel syndrome chez la progéniture de mères diabétiques dans notre modèle animal.

En comparant plusieurs paramètres biologiques, nous observons que la progéniture ODM présente les changements rénaux suivants : reins de plus petite taille avec un volume glomérulaire (V_g) moyen réduit lorsque comparés à la progéniture contrôle. Cette hypoplasie glomérulaire se maintient de la naissance jusqu'à l'âge de 2 semaines (Figure 3, page 50). Cela concorde avec notre étude précédente [278] qui a démontré, par l'utilisation de la microscopie de fluorescence chez la souris transgénique *Hoxb7-GFP*, ainsi que les marquages à la lectine *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) et à l'hématoxyline-oesine (HE), que la morphogenèse urétérique est retardée chez la progéniture ODM comparée au contrôle. Michaels et al. rapportent une nouvelle application pour l'histochimie *ex vivo* au DBA durant leur études d'explants rénaux [279]. Ils ont observé que le marquage DBA, mettant en évidence le UB, était très prononcé dans les structures du bourgeon urétérique à l'exception de l'extrémité des ramifications urétériques. L'absence de marquage DBA devient alors un indicateur de l'activité proliférative. Ils suggèrent aussi que les extrémités sont dans un état de différenciation différent mais réversible comparé à la branche urétérique; cela correspond aussi au motif d'expression du gène *Wnt-11* [280]. Nous suggérons d'utiliser cette nouvelle application du protocole au DBA sur les reins embryonnaires en culture (5 mM et 25 mM de D-Glucose) afin d'observer de façon *ex vivo* l'effet de l'environnement hyperglycémique sur l'activité morphogénique des cellules urétériques.

D'abord soulevée par Barker, l'association entre un BPN et le développement de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte a été mainte fois rapportée. [281] Sans avoir démontré avec certitude une corrélation directe entre ces facteurs, les évidences suggèrent une relation directe ou indirecte entre le poids à la naissance et le risque

ultérieur de développer de l'hypertension. Puisqu'une corrélation a déjà été rapportée entre le poids à la naissance et le nombre de néphrons dans le rein post-natal [282], nous avons jugé intéressant d'évaluer qualitativement et semi-quantitativement la dotation glomérulaire dans notre modèle expérimental. Toutefois, il ne faut pas oublier que plusieurs études ont observé une grande variabilité dans le nombre de néphrons chez la population humaine sans condition rénale (une variation de l'ordre de 2-10 fois) [283]. Le principe à la base de l'hypothèse de Brenner est qu'un nombre réduit de néphrons mène à l'hyperfiltration glomérulaire, car la charge de filtration est plus grande si elle est répartie sur un nombre moindre de glomérules rénaux [119]. Structuralement, des anomalies glomérulaires résultent en un taux de filtration glomérulaire suboptimale (plus grande pression de filtration et une GFR plus élevée par néphron). Par conséquent, cela représente possiblement des risques plus élevés de développer de l'hypertension à l'âge adulte. Lors de l'évaluation glomérulaire, nos résultats concernant les reins néonataux ODM révèlent qu'ils possèdent en moyenne 40% moins de néphrons et que ceux-ci ont un volume plus petit par rapport aux reins de la progéniture de mères contrôles (Figure 3, page 50). Nous postulons que cette hypoplasie des néphrons naissants est attribuable à l'apoptose fulgurante, résultant de l'hyperglycémie maternelle, observée dans les cellules glomérulaires. Ceci est démontrée dans nos résultats tant par la détection de la fragmentation de l'ADN que pour le marquage à l'enzyme caspase-3 (Casp-3) active (Figure 5 et 6, pages 52-53). Nous croyons que l'évaluation glomérulaire des néphrons chez les nouveaux-nés ne peut présenter l'hypertrophie habituellement rapportée chez les sujets humains [283;284] hypertendus car les reins n'ont pas encore eu le temps d'exprimer un mécanisme d'adaptation à la charge de filtration. Néanmoins, la tendance au rattrapage du volume glomérulaire à l'âge de trois semaines, tel que rapporté dans la figure 3b de la page 67, indique peut-être une adaptation au stress glomérulaire découlant de LNN. Il est à noter que nous avons observé une augmentation significative du marquage pour la Casp-3 active dans les tubules rénaux. En considérant la figure 11 en annexe, nous postulons que ce sont surtout les tubules dans le cortex qui présentent cette forte hausse

d'expression, donc possiblement les tubules proximaux. Toutefois, chez le nouveau-né, les tubules sont encore en différenciation, donc il est difficile de se prononcer avec certitude que ce sont aussi les tubules collecteurs et/ou les bourgeons urétériques qui sont aussi marqués par cette surexpression de Casp-3 active. L'identification des tubules rénaux touchés par cette augmentation de Casp-3 active demande des expériences supplémentaires, possiblement à l'aide de biomarqueurs spécifiques aux différents segments tubulaires. La progression de nos travaux vers les phénotypes adultes et l'examen de la morphologie rénale chez la progéniture ODM à long terme pourra nourrir notre hypothèse de programmation périnatale du rein.

Une augmentation de l'apoptose dans l'embryopathie diabétique a été rapportée à la fois *in vivo* [285] et *ex vivo* [286]. Proposé comme un des mécanismes majeurs affectant la morphologie rénale chez la progéniture ODM, nous postulons que l'apoptose est induite par la production de ROS dû à l'hyperglycémie [42]. En effet, notre laboratoire a déjà établi que les ROS jouent un rôle dans la néphrogénèse retardée ainsi que la dysmorphogénèse du bourgeon urétérique observées à la fois en situation hyperglycémique *in vivo* et *ex vivo*. [287]

Démonstré par un double marquage fluorescent, nous postulons aussi que la mort de cellules spécifiques durant la néphrogenèse, plus précisément les podocytes, est ciblée par l'apoptose glomérulaire (Figure 5b, page 52). Certaines études ont suggéré que la perte précoce des podocytes est à la base de la détérioration de la barrière de filtration dans la néphropathie diabétique [288], tandis que d'autres argumentent l'absence d'évidence pour appuyer cette théorie [289]. L'épaississement de la membrane basale ainsi qu'une expansion des cellules mésangiales sont les signes de changements pathologiques associés à l'hyperglycémie [290]. Par un modèle *in vitro* de cellules mésangiales de rats, Liu et al rapporte une augmentation de synthèse de collagène ainsi que de prolifération des cellules mésangiales en culture avec du milieu contenant 30 mM de glucose [291]. Les cellules épithéliales des tubules proximaux sont aussi sensibles au stress oxydatif induit par un milieu hyperglycémique via la voie de

signalisation Akt [292] et un traitement aux antioxydants N-acétylcystéine et taurine peut renverser l'hypertrophie caractéristique de la néphropathie diabétique des cellules du tubule proximal *in vitro* [293]. Jusqu'à maintenant, nous n'avons pas investigué l'effet de l'hyperglycémie maternelle sur les cellules mésangiales et autres cellules épithéliales dans les reins ODM de notre modèle expérimental, mais proposons de le faire afin de mieux identifier la ou les cible(s) de l'apoptose observée.

Nous avons aussi observé des signes supplémentaires de dégénération du néphron telle que l'activation des voies d'apoptose dans les cellules tubulaires, près du glomérule, dans les reins ODM. Une activité apoptotique augmentée (Figure 5 et 6, pages 52-53) et la surexpression de l'ARM messager de la rénine et de l'angiotensinogène (Figure 7, 8 et 9, pages 54, 55 et 56) sont observées surtout chez la progéniture ODM neonatale et âgée d'une semaine. Tamura et al. ont démontré l'importance de la surexpression des composantes du RAS dans un modèle murin avec deux copies du gène de la rénine où la néphropathie diabétique démontrait des changements histopathologiques plus sévères que chez la souris avec un seul gène rénine [294]. De plus, la figure 12 en annexe, présentant les résultats chez le nouveau-né, rapporte aussi une hausse dans l'expression génique des composantes du RAS suivantes : AT1-R, AT2-R, ACE1, ACE2. Tel que souligné à la section 1.4.4, plusieurs études démontrent qu'une expression altérée des différentes composantes du RAS influence la morphogénèse du rein en développement.

Contrairement au développement chez l'humain, dont le rein est mature à la naissance, la néphrogenèse se poursuit jusqu'à 2 semaines après la naissance chez les rongeurs. Ceci suggère que ces perturbations d'expression durant cette période finale critique de la néphrogenèse pourraient avoir des conséquences fondamentales sur la fonction rénale. Il est important de noter que durant la néphrogenèse normale, les événements apoptotiques sont nécessaires et essentiels à l'organogénèse et à la formation du rein mature. Par exemple, le mésenchyme non-différencié doit devenir soit des cellules interstitielles, soit subir une apoptose pour laisser place à la formation tubulaire.

D'autre part, le MM différencié prend un profil cellulaire épithélial à la suite des transformations mésenchyme-à-épithélium, pour enfin devenir la portion proximale du néphron. Par conséquent, une activité apoptotique basale et même augmentée durant les 10 premiers jours de la vie chez la souris est normale à la modulation finale du rein mature. Néanmoins, l'augmentation prononcée de l'apoptose dans les reins ODM comparée aux reins de progéniture contrôle suggère que les cellules affectées ne sont pas visées par cette modulation finale de la néphrogenèse. Dans une situation pathologique telle que le diabète maternel, le milieu hyperglycémique induit l'apoptose dans les cellules qui, normalement, ne devraient pas subir un tel processus cellulaire. Il en résulte une néphrogenèse altérée et allant même jusqu'à une dégénération totale du néphron. Accepter l'apoptose comme cible des ROS implique aussi que la mort cellulaire programmée est considérée comme un mécanisme de protection au même titre que les enzymes anti-oxydantes telles SOD et CAT qui font partie du système redox veillant à la réduction du dommage oxydant [295]. Par exemple, les ROS peuvent être impliqués dans une situation carcinogénique et la réparation de l'ADN de concert avec des effecteurs de l'apoptose permet de s'assurer que les mutations ne seront pas transmises aux cellules filles. De même, il a été démontré que la surexpression thérapeutique de l'enzyme MnSOD (manganese superoxide dismutase) peut renverser la croissance de lignées tumorales [296;297]. Bref, un dérèglement de l'apoptose causé par les ROS bouleverse l'intégrité des processus en place pour contrer les attaques au niveau du code génétique.

L'utilisation de souris gestantes pose une contrainte technique nous empêchant d'appliquer un protocole d'induction du diabète au STZ en faible dose avec injections répétées. La validité des résultats d'études expérimentales avec induction au STZ a été soulevée car la toxicité aiguë de ce produit sur le rein est connue [298], surtout lorsqu'utilisé en dose plus élevée (ex. 200mg/kg poids corporel). Nous avons utilisé la souris transgénique Nephtrin-Cyan Fluorescent Protein (CFP), qui permet la visualisation des glomérules au microscope à fluorescence, pour démontrer que notre

Figure

8

p73

Figure

9

p74

protocole, adapté de Kanwar à 150mg de STZ par kg de poids corporel, ne démontre pas d'effet adverse sur la néphrogenèse de la progéniture. Puisque le STZ n'induit pas l'hyperglycémie dans 100% des cas, nous avons examiné les reins de la progéniture des souris injectées au STZ mais non-hyperglycémiques et avons observé que les dommages rénaux semblent dépendant des niveaux d'hyperglycémie, sans corrélation à l'administration du STZ (Figure 4, page 51) Selon nos analyses morphologiques, nous croyons qu'il est peu probable que notre modèle d'hyperglycémie maternelle ait un effet toxique, via la pénétration du STZ *in utero*, sur les reins des embryons.

Le RAS intrarénal, dont le rôle a été mainte fois démontré dans l'apoptose chez les humains [299] et les animaux [300], constitue certainement l'un des éléments-clé dans la néphropathie diabétique. Dans nos résultats, nous observons l'activation significative de l'expression des gènes de l'angiotensinogène et de la rénine (Figures 8 et 9, pages 55-56), deux contributeurs majeurs à la production de l'Ang II, et suggérons une corrélation avec les événements apoptotiques dans les reins des ODM. Plus précisément, l'analyse immunohistochimique révèle que non seulement la rénine est-elle présente dans les cellules juxtaglomérulaires normalement sécrétrices de rénine, les reins des ODM présentent du marquage additionnel de la rénine dans les cellules tubulaires et glomérulaires. L'observation d'une stimulation intense de l'expression de la rénine est observée dans les reins de patients possédant des mutations de Ang II, ACE et AT1-R [301]. Nos résultats indiquent déjà une hausse de la régulation de l'expression de l'ARN messager de la rénine, de l'angiotensinogène et des récepteurs de l'Ang II (Figure 7, page 54), donc il serait intéressant d'examiner si notre modèle animal présente des mutations génétiques parmi les composantes du RAS.

Outre ce changement dans l'expression de la rénine, l'augmentation de l'expression de l'angiotensine pourrait être responsable de la stimulation locale de la production d'Ang II rénale qui pourrait à son tour contribuer à l'apoptose observée. L'Ang II peut, via la cytokine fibrogénique TGF-B et ses récepteurs, endommager le réseau vasculaire et causer la fibrose des reins [302]. Outre la fibrose des capillaires rénaux, l'Ang II peut

aussi induire le stress oxydant, via l'activation de la NADPH oxydase, et altérer l'oxygénation du rein par la réaction des ROS avec l'oxyde nitrique (nitric oxide, NO). En effet, Laycock et al. ont démontré une augmentation générale de la consommation d'oxygène par le rein lors de l'administration d'inhibiteur de NO synthétase [303]. Bref, ces deux exemples d'hypoxie peuvent induire l'apoptose des cellules rénales affectées [304]. De même, il a été démontré que les rats diabétiques induits au STZ démontrent un hypoxie transitoire de la zone médullaire du rein [305], tandis que les rats spontanément hypertensifs présentent une oxygénation déficiente du tissu rénal au niveau du cortex reliée à l'activation des AT1-R [306].

Des études ont rapporté une certaine immaturité de la capacité de défense antioxydante chez l'embryon de rat de mère diabétique [307]. Cela se traduit alors par une plus grande vulnérabilité du fœtus face aux ROS lors du développement embryonnaire. En 2006, notre laboratoire a déjà démontré une augmentation de la production de ROS dans les explants rénaux de notre modèle murin de diabète gestationnel sévère [308]. Cette augmentation de la production de ROS peut alors induire un nombre significativement plus élevé de podocytes apoptotiques dans le glomérule rénal en développement, plus spécifiquement observé par une augmentation du marqueur apoptotique caspase-3 active dans le tubule rénal (Figure 5b, page 52). Ces résultats concordent avec les observations de Yang et al. sur leur modèle murin d'embryopathie diabétique au jour embryonnaire E11 [139].

Durant l'embryogenèse, les cellules bêta du pancréas fœtal, responsables de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose provenant de la mère diabétique, sont très sensibles aux dommages infligés par le stress oxydant car elles contiennent peu d'enzymes antioxydantes. Un milieu hyperglycémique chronique, donc riche en ROS, est très néfaste pour les cellules bêta et peut causer leur dégranulation. Cardozo a démontré que l'activation de la voie NF-kB par le stress oxydant est un événement pro-apoptotique dans les cellules bêta [309]. Enfin, ces dommages cellulaires modulent la réponse au glucose et mènent aux complications à long terme du diabète. Durant

l'embryogenèse, les voies PKC et NF- κ B, ainsi que les proto-oncogènes tels N-myc et C-myc, ont aussi été identifiés comme cruciaux pour l'organogenèse, plus particulièrement dans des études sur la néphropathie diabétique [310-312]. Plus précisément, TGF- β est souvent pointé du doigt dans le développement de l'hypertrophie et la fibrose interstitielle dans la néphropathie [47;312].

Puisque la littérature rapporte que la voie NF- κ B est une cible intracellulaire majeure du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie [313;314], nous voulions investiguer l'implication de la voie NF- κ B dans la néphropathie observée chez la progéniture ODM. La surexpression des sous-unités p50 et p65 a été rapporté dans les cellules tubulaires épithéliales du rein protéinurique [315]. Par immunohistochimie sur les reins de nouveau-né, nous avons démontré que notre progéniture ODM présente aussi une régulation à la hausse des sous-unités p50 et p65 du facteur de transcription NF- κ B, avec une translocation nucléaire observée spécifiquement dans les tubules proximaux (Figure 10a, page 57). Nous croyons que plusieurs éléments pro et anti-apoptotiques de la voie de signalisation NF- κ B sont activés et participent à l'apoptose des cellules tubulaires proximales. La mort excessive des cellules tubulaires mène alors à la sclérose du néphron, donc au LNN observé dans notre modèle expérimental. Suggérant une activation de la voie de signalisation par l'environnement hyperglycémie, un *electrophoretic motility shift assay* (EMSA) met en évidence une plus grande quantité de complexes d'interaction entre les séquences d'oligonucléotides de NF- κ B avec l'extrait nucléaire provenant de reins néonataux ODM comparé aux reins de la progéniture contrôle (Figure 10b, page 57).

Une avenue intéressante à explorer concernant les dommages induits par l'hyperglycémie est l'activation des récepteurs des AGE (RAGE). En effet, à cause des taux de glucose élevé, le stress oxydatif qui en résulte et la protéinurie stimulent tous la production de AGE. L'accumulation des AGE est associée avec diverses pathologies rénales progressives telles que la glomérulosclérose, la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire. De plus, le rein peut être à la fois source et cible des AGE. Non seulement le

rein en perte de fonction va-t-il produire des AGE, mais la clairance de ceux-ci va aussi diminuer de concert avec la fonction rénale [316]. L'interaction des AGE avec les RAGE induit le stress oxydant et par conséquent active la voie NF-kB et la production de cytokines inflammatoires. L'inhibition de ACE dans des études in vivo a identifié une communication croisée entre le RAS et l'accumulation de AGE dans un modèle expérimental de néphropathie diabétique [317]. Il serait donc pertinent d'étudier la production de AGE chez la progéniture de notre modèle de diabète gestationnel sévère.

Plusieurs études suggèrent différentes voies antioxydantes intéressantes à explorer afin de contrer le stress oxydant induit par l'hyperglycémie. Dans une étude de l'embryopathie diabétique, Ornoy et al. rapportent la hausse des ROS chez les embryons de rat atteints de malformations congénitales [318]. L'addition de nitroxyde dans le milieu de culture protège alors les embryons de la teratogénicité induite par l'hyperglycémie d'une façon dose-dépendante. Il a aussi été démontré chez le rat que l'acide alpha-lipoïque, un puissant antioxydant, peut renverser les effets de l'hyperglycémie et du stress oxydant dans les cellules mésangiales du rein [319]. Plus récemment, Brezniceanu et al. ont rapporté une atténuation de l'apoptose ainsi que de la surexpression de l'Ang II chez les souris transgéniques diabétiques surexprimant la catalase [300]. Dans le futur, nous planifions d'étudier la pathogenèse de la néphropathie découlant du diabète maternel dans les souris Catalase-transgénique (Cat-Tg). Utilisant le promoteur KAP2 (Kidney Androgen-regulated Protein promoter 2) qui est spécifique aux tubules proximaux, ce modèle murin développé par l'équipe du Dr John S.D. Chan surexprime l'enzyme catalase dans les tubules proximaux du rein. Ce modèle transgénique avec surexpression d'enzyme antioxydante constitue une méthode d'explorer notre hypothèse du rôle des ROS dans notre modèle expérimental de diabète gestationnel. Ainsi, nous pourrions vérifier si une augmentation du système de défense antioxydant chez la mère protégerait la progéniture de l'augmentation de la production de ROS dans les reins ou de l'apoptose glomérulaire.

Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement au facteur *Paired Box gene 2* (Pax-2), un facteur de transcription actif durant la transition mésenchymale-épithéliale durant le développement rénal embryonnaire [320]. En sa qualité de gène maître spécifique du rein, Pax-2 est absolument essentiel pour la signalisation initiale du conduit Wolffien menant à la ramification optimale du bourgeon urétérique et à la transformation du mésenchyme en épithélium. Pax-2 est exprimé dans la descente caudale du conduit Wolffien et ensuite dans le MM, où il active le récepteur *gdnf* (RET) [321] et agit en tant que facteur anti-apoptotique dans les cellules épithéliales du UB. L'expression de Wnt-4, via la voie B-catenin gouvernant la prolifération cellulaire, est aussi stimulée par Pax-2 [322]. Par exemple, les souris déficientes pour Pax-2 ne développent aucun système uro-génital et ne sont pas viables [323], tandis que des souris transgéniques surexprimant Pax-2 développent une hyperprolifération dysplasique et des kystes rénaux [324]. Chez l'homme et la souris, des mutations hétérozygotes de Pax-2 causent des anomalies aux reins, yeux, système nerveux central, et autres éléments caractéristiques du syndrome rénal-coloboma.

En utilisant ce modèle de diabète maternel *in vivo*, nous avons déjà commencé à étudier les mécanismes menant à un développement rénal restreint, mettant l'accent sur l'expression du gène Pax-2. En 2006, notre laboratoire a démontré que l'effet stimulateur d'un environnement hyperglycémique sur Pax-2 est causé en partie par la génération de ROS et via l'activation de la voie de signalisation NF- κ B [325]. En 2007, nous avons démontré que la surexpression de Pax-2 protège de l'apoptose causée par un milieu élevé en glucose et que N-myc, en agissant en aval de Pax-2, crée une boucle rétroactive positive augmentant l'expression du gène Pax-2 dans les cellules épithéliales mésenchymales embryonnaires *in vitro* [310]. Enfin, nous avons aussi rapporté que l'environnement hyperglycémique induit, via Pax-2 qui est majoritairement exprimé dans le UB, une accélération de la croissance des branches du UB mais sans toutefois stimuler la formation de néphrons *in vivo*. Les ROS, l'activation de la voie Akt, ainsi que la surexpression de Pax-2 semblent être impliqués

dans ces événements de morphogenèse rénale [325]. Ces données renforcent le concept que l'expression perturbée de Pax-2 dans les reins de nos souris ODM joue un rôle important dans le développement altéré par l'hyperglycémie maternelle.

Synthèse

À l'aide d'un modèle murin de diabète gestationnel sévère, ce projet de recherche tente de disséquer le rôle fonctionnel de l'hyperglycémie maternelle sur la modulation du développement rénal chez la progéniture. Les résultats obtenus indiquent que l'hyperglycémie maternelle altère le développement rénal causant des reins de plus petite taille chez la progéniture ODM, présentant notamment un LLN et un V_g réduit. Nous postulons aussi que les taux de glucose élevés de l'environnement *in utero* induisent l'apoptose des néphrons en formation via l'activation du RAS et de la surexpression des sous-unités p50 et p65 de la voie de signalisation NF- κ B.

Perspectives

Des études de population ont rapporté de multiples conséquences à long terme de l'hyperglycémie maternelle, expliquées par le concept de programmation périnatale. Rasch et al. ont établi un lien entre le RAS et la programmation périnatale et les maladies cardiovasculaires adultes telles l'hypertension [326]. Ces enfants présentent plus de risques d'hypertension, obésité, intolérance au glucose et diabète de type 2 à l'âge adulte. Cependant, les mécanismes par lesquels la programmation s'opère restent mal définis.

L'évolution à long terme de ce projet visera à étudier les effets de la programmation périnatale de l'hyperglycémie sur la progéniture ODM adulte (âge de 16, 20 et 30 semaines). Dans l'étude de Brochu et al. sur la progéniture du rat née avec IUGR, le développement de l'hypertension et le rôle du RAS à l'âge adulte est dépendant du sexe de l'animal [327]. Il serait donc approprié de séparer les résultats de notre future étude à long terme selon le sexe.

Nos résultats ont démontré que le diabète maternel active le RAS intrarénal et induit l'apoptose des cellules glomérulaires, résultant en une morphogénèse irrégulière dans la progéniture de mères diabétiques. La présence d'albumine dans l'urine étant un facteur déterminant de l'insuffisance rénale progressive, nous suggérons d'examiner la microalbuminurie dans ce modèle animal afin d'avoir une mesure indirecte de la qualité de la fonction rénale. Ainsi, il serait possible de disséquer le rôle réel des changements ultrastructuraux dans la barrière de filtration glomérulaire, plutôt qu'une diminution de GFR. Nous n'avons pas mesuré la GFR, totale ou partielle, dans notre modèle mais planifions de le faire par estimation indirecte, par la mesure de la clairance de la créatinine. Nous suggérons aussi d'investiguer la détérioration rénale possiblement exacerbée par les actions synergiques de Ang II et des composantes de NF- κ B, deux éléments en surexpression dans notre modèle ODM. Chez l'humain, l'action inflammatoire de NF- κ B a été démontrée dans la fibrose tubulointerstitielle, un bon indicateur de la perte de fonction rénale progressive [328]. D'autre part, Ruiz-Ortega et al. ont aussi démontré l'activation de NF- κ B par Ang II via AT1-R et AT2-R [329]. Plus précisément, il serait intéressant d'examiner avec attention l'infiltration inflammatoire et les dommages tubulaires résultant de l'activation de NF- κ B. De même, nous analyserons avec attention les phénotypes adultes de la progéniture ODM ainsi que l'évolution ultérieure de cette morphogénèse rénale altérée. Nous postulons qu'une hypertrophie glomérulaire compensatrice s'imposera progressivement chez les animaux ODM prédisposés à l'hypertension.

Conclusion

L'environnement *in utero* néfaste créé par l'hyperglycémie maternelle altère le développement rénal chez la progéniture et augmente la vulnérabilité des reins lorsqu'ils sont exposés à différents processus pathologiques dans la vie adulte. Nos résultats ont démontré que les podocytes glomérulaires subissent de l'apoptose et que les composantes du système rénine-angiotensine (RAS) intrarénal sont surexprimées dans les reins de progénitures de mères diabétiques. Nous espérons que notre recherche démontrera qu'une dotation glomérulaire restreinte induite par le diabète maternel constitue un mécanisme majeur de la programmation périnatale de l'hypertension. En effet, la tension artérielle n'est plus une préoccupation réservée aux adultes seulement puisque même les jeunes Canadiens présentent une prévalence élevée d'hypertension, soulignant l'importance d'une meilleure compréhension de la pathogenèse initiale de l'hypertension et de ses voies de médiation. Une meilleure compréhension des rôles physiologiques du RAS dans le développement du rein et de la néphropathie de l'hypertension chez l'adulte pourra ultimement mener à une prévention et une amélioration dans les traitements de l'insuffisance rénale.

En 1989, la Déclaration de St-Vincent (SVD) marque le réveil d'une collaboration internationale, regroupée sous l'OMS et l'*International Diabetes Federation* (IDF), qui s'engage à combattre le fléau moderne mondial qu'est le diabète. Parmi les buts à atteindre dans cette lutte contre les complications amenées par le diabète est la prévention de la néphropathie diabétique. En 2004, une revue des efforts de cette initiative rapportent que, malgré le succès de la signature de SVD, certains objectifs n'ont pas été atteints dont l'implantation de programmes nationaux de prévention du diabète et de ses complications [330]. Nous espérons que notre recherche en science fondamentale sur la néphropathie chez la progéniture, induite par l'hyperglycémie maternelle, s'insère dans cet effort pour mieux comprendre le diabète gestationnel. Il sera ainsi possible d'améliorer la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires associées à la programmation périnatale.

Bibliographie

Reference List

1. WHO website: Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf. 2008.
Ref Type: Report
2. Canadian Diabetes Association: <http://www.diabetes.ca/Files/prevalence-and-costs.pdf>. 2008.
Ref Type: Internet Communication
3. World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> May 2008.
2008.
Ref Type: Internet Communication
4. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C: The Burden of Mortality Attributable to Diabetes. *Diabetes Care* 28:2130-2135, 2005
5. World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> May 2008.
2008.
Ref Type: Internet Communication
6. Canadian Diabetes Association, http://www.diabetes.ca/Section_About/gestational.asp May 2008. 2008.
Ref Type: Internet Communication
7. Rodrigues S, Robinson E, Gray-Donald K: Prevalence of gestational diabetes mellitus among James Bay Cree women in northern Quebec. *CMAJ* 160:1293-1297, 1999
8. Lobner K, Knopff A, Baumgarten A *et al.*: Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 55:792-797, 2006
9. The HAPO Study Cooperative Research Group: Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med* 358:1991-2002, 2008
10. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 78:69-77, 2002
11. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27:S88-S90, 2004
12. Canadian Diabetes Association, http://www.diabetes.ca/Section_About/gestational.asp May 2008. 2008.
Ref Type: Internet Communication
13. SOGC Clinical Practice Guidelines: Screening for gestational diabetes <http://www.diabetes.ca/cpg2003/downloads/cpgcomplete.pdf>. 2008.
Ref Type: Report
14. Rowan JA, Hague WM, Gao W *et al.*: Metformin versus Insulin for the Treatment of Gestational Diabetes. *N Engl J Med* 358:2003-2015, 2008
15. Canadian Diabetes Association, http://www.diabetes.ca/Section_About/gestational.asp May 2008. 2008.
Ref Type: Internet Communication
16. Boulet SL, Alexander GR, Salihu HM, Pass M: Macrosomic births in the united states: Determinants, outcomes, and proposed grades of risk. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188:1372-1378, 2003

17. Wen SW, Kramer MS, Platt R *et al.*: Secular trends of fetal growth in Canada, 1981 to 1997. *Paediatr Perinat Epidemiol* 17:347-354, 2003
18. Canadian Perinatal Surveillance System Steering Committee and Study Group Members (2003). Canadian Perinatal Health Report 2003. 2003.
Ref Type: Report
19. Silverman BL, Rizzo T, Green OC *et al.*: Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes* 40 Suppl 2:121-125, 1991
20. Fowden AL, Hill DJ: Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Br Med Bull* 60:123-142, 2001
21. Ktorza A, Gauguier D, Bihoreau MT *et al.*: [Possible contribution of hyperglycemia in utero to glucose homeostasis disorders in the adult]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 55-68, 1997
22. Weintrob N, Karp M, Hod M: Short- and long-range complications in offspring of diabetic mothers. *J Diabetes Complications* 10:294-301, 1996
23. Langer O, Yogeve Y, Most O, Xenakis EM: Gestational diabetes: the consequences of not treating. *Am J Obstet Gynecol* 192:989-997, 2005
24. Plagemann A, Harder T, Melchior K *et al.*: Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats. *Neuroreport* 10:3211-3216, 1999
25. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR: Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. *Pediatrics* 115:e290-e296, 2005
26. Negrato CA, Jovanovic L, Tambascia MA *et al.*: Mild gestational hyperglycaemia as a risk factor for metabolic syndrome in pregnancy and adverse perinatal outcomes. *Diabetes Metab Res Rev* 24:324-330, 2008
27. Vohr BR, Boney CM: Gestational diabetes: The forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome? *J Matern Fetal Neonatal Med* 21:149-157, 2008
28. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR: Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115:e290-e296, 2005
29. Elnour AA, El Mugammar IT, Jaber T *et al.*: Pharmaceutical care of patients with gestational diabetes mellitus. *Journal of Evaluation in Clinical Practice* 14:131-140, 2008
30. Holemans K, Aerts L, Assche FAV: Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol* 547:11-20, 2003
31. Fetita LS, Sobngwi E, Serradas P *et al.*: Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3718-3724, 2006
32. Canadian Institute for Health Information. Giving Birth in Canada: Regional Trends From 2001-2002 to 2005-2006. 25-7-2007.
Ref Type: Report
33. Van Assche FA, Holemans K, Aerts L: Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br Med Bull* 60:173-182, 2001
34. Chugh SS, Wallner EI, Kanwar YS: Renal development in high-glucose ambience and diabetic embryopathy. *Semin Nephrol* 23:583-592, 2003
35. Fraser RB, Waite SL, Wood KA, Martin KL: Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model. *Hum Reprod* 22:3059-3068, 2007

36. Chugh SS, Wallner EI, Kanwar YS: Renal development in high-glucose ambience and diabetic embryopathy. *Semin Nephrol* 23:583-592, 2003
37. Boulet SL, Salihi HM, Alexander GR: Mode of delivery and birth outcomes of macrosomic infants. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 24:622-629, 2004
38. Nielsen GL, Norgard B, Puho E *et al.*: Risk of specific congenital abnormalities in offspring of women with diabetes. *Diabetic Medicine* 22:693-696, 2005
39. Rocha SO, Gomes GN, Forti AL *et al.*: Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. *Pediatr Res* 58:1274-1279, 2005
40. Amri K, Freund N, Vilar J *et al.*: Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies. *Diabetes* 48:2240-2245, 1999
41. Magaton A, Gil F, Casarini D *et al.*: Maternal diabetes mellitus - early consequences for the offspring. *Pediatric Nephrology* 22:37-43, 2007
42. Saxen L. Organogenesis of the Kidney. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1987. 2008.
Ref Type: Report
43. Horster MF, Braun GS, Huber SM: Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev* 79:1157-1191, 1999
44. Karihaloo A, Nickel C, Cantley LG: Signals which build a tubule. *Nephron Exp Nephrol* 100:e40-e45, 2005
45. Bates CM: Kidney Development: Regulatory Molecules Crucial to Both Mice and Men. *Molecular Genetics and Metabolism* 71:391-396, 2000
46. Dressler GR: The cellular basis of kidney development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22:509-529, 2006
47. Wolf G: Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 9:48-51, 2002
48. Grobstein C: Inductive epitheliomesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse. *Science* 118:52-55, 1953
49. UERBACH R, Grobstein C: Inductive interaction of embryonic tissues after dissociation and reaggregation. *Exp Cell Res* 15:384-397, 1958
50. Kanwar YS, Akagi S, Sun L *et al.*: Cell Biology of Diabetic Kidney Disease. *Nephron Experimental Nephrology* 101:e100-e110, 2005
51. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB *et al.*: Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:2143-2160, 2007
52. Bates CM: Kidney Development: Regulatory Molecules Crucial to Both Mice and Men. *Molecular Genetics and Metabolism* 71:391-396, 2000
53. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372:679-683, 1994
54. Osafune K, Takasato M, Kispert A *et al.*: Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 133:151-161, 2006
55. Osafune K, Takasato M, Kispert A *et al.*: Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 133:151-161, 2006
56. Bridgewater D, Cox B, Cain J *et al.*: Canonical WNT/[beta]-catenin signaling is required for ureteric branching. *Developmental Biology* 317:83-94, 2008
57. Gong KQ, Yallowitz AR, Sun H *et al.*: A Hox-Eya-Pax complex regulates early kidney developmental gene expression. *Mol Cell Biol* 27:7661-7668, 2007

58. Cheng HT, Kopan R: The role of Notch signaling in specification of podocyte and proximal tubules within the developing mouse kidney. *Kidney Int* 68:1951-1952, 2005
59. Cheng HT, Kim M, Valerius MT *et al.*: Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* 134:801-811, 2007
60. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F: Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119:1005-1017, 1993
61. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L *et al.*: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367:380-383, 1994
62. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L *et al.*: RET-deficient mice: an animal model for Hirschsprung's disease and renal agenesis. *J Intern Med* 238:327-332, 1995
63. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L *et al.*: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367:380-383, 1994
64. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L *et al.*: RET-deficient mice: an animal model for Hirschsprung's disease and renal agenesis. *J Intern Med* 238:327-332, 1995
65. Skinner MA, Safford SD, Reeves JG *et al.*: Renal aplasia in humans is associated with RET mutations. *Am J Hum Genet* 82:344-351, 2008
66. Lore F, Di CG, Talidis F: Unilateral renal agenesis in a family with medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 342:1218-1219, 2000
67. Clowes VE, Shaw-Smith C, Simpson H *et al.*: MEN2 screening dilemmas in a family with a novel RET mutation in the MEN2 susceptibility region of the gene, a family history of Hirschsprung disease, and no family history of MEN2-related tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:666-667, 2008
68. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M *et al.*: Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381:785-789, 1996
69. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F: Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119:1005-1017, 1993
70. Sainio K, Suvanto P, Davies J *et al.*: Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development* 124:4077-4087, 1997
71. Skinner MA, Safford SD, Reeves JG *et al.*: Renal aplasia in humans is associated with RET mutations. *Am J Hum Genet* 82:344-351, 2008
72. Skinner MA, Safford SD, Reeves JG *et al.*: Renal aplasia in humans is associated with RET mutations. *Am J Hum Genet* 82:344-351, 2008
73. Lore F, Di CG, Talidis F: Unilateral renal agenesis in a family with medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 342:1218-1219, 2000
74. Clowes VE, Shaw-Smith C, Simpson H *et al.*: MEN2 screening dilemmas in a family with a novel RET mutation in the MEN2 susceptibility region of the gene, a family history of Hirschsprung disease, and no family history of MEN2-related tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:666-667, 2008
75. Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K *et al.*: Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 109:787-795, 1990
76. Dressler GR: Pax-2, kidney development, and oncogenesis. *Med Pediatr Oncol* 27:440-444, 1996
77. Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121:4057-4065, 1995

78. Winyard PJ, Risdon RA, Sams VR *et al.*: The PAX2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J Clin Invest* 98:451-459, 1996
79. Ostrom L, Tang MJ, Gruss P, Dressler GR: Reduced Pax2 gene dosage increases apoptosis and slows the progression of renal cystic disease. *Dev Biol* 219:250-258, 2000
80. Eccles MR, He S, Legge M *et al.*: PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* 46:535-544, 2002
81. Amiel J, Audollent S, Joly D *et al.*: PAX2 mutations in renal-coloboma syndrome: mutational hotspot and germline mosaicism. *Eur J Hum Genet* 8:820-826, 2000
82. Igarashi T, Ueda T, Suzuki H *et al.*: Aberrant expression of Pax-2 mRNA in renal cell carcinoma tissue and parenchyma of the affected kidney. *International Journal of Urology* 8:60-64, 2001
83. Armstrong JF, Kaufman MH, van H, V, Bard JB: Embryonic kidney rudiments grown in adult mice fail to mimic the Wilms' phenotype, but show strain-specific morphogenesis. *Exp Nephrol* 1:168-174, 1993
84. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM *et al.*: WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691, 1993
85. Pritchard-Jones K: The Wilms tumour gene, WT1, in normal and abnormal nephrogenesis. *Pediatr Nephrol* 13:620-625, 1999
86. Pritchard-Jones K: The Wilms tumour gene, WT1, in normal and abnormal nephrogenesis. *Pediatr Nephrol* 13:620-625, 1999
87. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R *et al.*: A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION AS A CAPTOPRIL-INSENSITIVE CARBOXYPEPTIDASE. *J Biol Chem* 275:33238-33243, 2000
88. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E *et al.*: A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res* 87:e1-e9, 2000
89. Varagic J, Trask A, Jessup J *et al.*: New angiotensins. *Journal of Molecular Medicine* 86:663-671, 2008
90. Weir MR: Providing end-organ protection with RAS inhibition: The evidence so far. *American Journal of Hypertension* 18:A265-A266, 2005
91. Bader M, Ganten D: Update on tissue renin-angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine* 86:615-621, 2008
92. Kim H, Krege JH, Kluckman KD *et al.*: Genetic Control of Blood Pressure and the Angiotensinogen Locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:2735-2739, 1995
93. Niimura F, Labosky PA, Kakuchi J *et al.*: Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *J Clin Invest* 96:2947-2954, 1995
94. Yanai K, Saito T, Kakinuma Y *et al.*: Renin-dependent Cardiovascular Functions and Renin-independent Blood-Brain Barrier Functions Revealed by Renin-deficient Mice. *J Biol Chem* 275:5-8, 2000
95. Oliverio MI, Kim HS, Ito M *et al.*: Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2a (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:15496-15501, 1998

96. Oliverio MI, Madsen K, Best CF *et al.*: Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F43-F50, 1998
97. OSHIMA KEIS, MIYAZAKI YOIC, BROCK III JW *et al.*: ANGIOTENSIN TYPE II RECEPTOR EXPRESSION AND URETERAL BUDDING. *The Journal of Urology* 166:1848-1852, 2001
98. Pryde PG, Sedman AB, Nugent CE, Barr M, Jr.: Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *J Am Soc Nephrol* 3:1575-1582, 1993
99. Zhang SL, Moini B, Ingelfinger JR: Angiotensin II increases Pax-2 expression in fetal kidney cells via the AT2 receptor. *J Am Soc Nephrol* 15:1452-1465, 2004
100. Kakinuma Y, Sugiyama F, Taniguchi K *et al.*: Developmental stage-specific involvement of angiotensin in murine nephrogenesis. *Pediatr Nephrol* 13:792-799, 1999
101. Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S *et al.*: Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int* 47:140-147, 1995
102. Ciuffo GM, Viswanathan M, Seltzer AM *et al.*: Glomerular angiotensin II receptor subtypes during development of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 265:F264-F271, 1993
103. Zemel S, Millan MA, Feuillan P, Aguilera G: Characterization and distribution of angiotensin-II receptors in the primate fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1003-1007, 1990
104. Chen YW, Tran S, Chenier I *et al.*: Deficiency of intrarenal angiotensin II type 2 receptor impairs paired homeo box-2 and N-myc expression during nephrogenesis. *Pediatr Nephrol*, 2008
105. Viltart O, Vanbesien-Mailliot CCA: Impact of Prenatal Stress on Neuroendocrine Programming. *TheScientificWorldJOURNAL* 7:1493-1537, 2007
106. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M: The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl* 77:S26-S30, 2000
107. Eiberger W, Volkmer B, Amouroux R *et al.*: Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells. *DNA Repair* In Press, Corrected Proof:
108. Freinkel N: Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29:1023-1035, 1980
109. Stoger R: The thrifty epigenotype: an acquired and heritable predisposition for obesity and diabetes? *Bioessays* 30:156-166, 2008
110. Leonard MB: Glucocorticoid-induced osteoporosis in children: impact of the underlying disease. *Pediatrics* 119 Suppl 2:S166-S174, 2007
111. Nemati B, Atmodjo W, Gagnon S *et al.*: Glucocorticoid receptor disruption delays structural maturation in the lungs of newborn mice. *Pediatr Pulmonol* 43:125-133, 2008
112. Barker DJ, Osmond C, Forsen TJ *et al.*: Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension* 50:565-571, 2007
113. Barker DJ: The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261:412-417, 2007
114. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ *et al.*: Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 182:198-206, 2000
115. Hallan S, Euser AM, Irgens LM *et al.*: Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trondelag Health (HUNT 2) Study. *Am J Kidney Dis* 51:10-20, 2008
116. Fetita LS, Sobngwi E, Serradas P *et al.*: Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3718-3724, 2006

117. Peleg D, Kennedy CM, Hunter SK: Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am Fam Physician* 58:453-457, 1998
118. WHO website: Development of Strategy Towards Promoting Optimal Fetal Growth http://www.who.int/nutrition/topics/lbw_strategy_background.pdf. 2008.
Ref Type: Report
119. Brenner BM, Anderson S: The interrelationships among filtration surface area, blood pressure, and chronic renal disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 19 Suppl 6:S1-S7, 1992
120. Manalich R, Reyes L, Herrera M *et al.*: Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney Int* 58:770-773, 2000
121. Li S, Chen SC, Shlipak M *et al.*: Low birth weight is associated with chronic kidney disease only in men. *Kidney Int* 73:637-642, 2007
122. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T *et al.*: Low Birth Weight Increases Risk for End-Stage Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 19:151-157, 2008
123. Hales CN, Ozanne SE: The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol* 547:5-10, 2003
124. Hales CN: Suicide of the nephron. *Lancet* 357:136-137, 2001
125. Hales CN, Ozanne SE: The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol* 547:5-10, 2003
126. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL *et al.*: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790, 2000
127. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
128. Benrahmoune M, Therond P, Abedinzadeh Z: The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 29:775-782, 2000
129. Godin DV, Wohsieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD: Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 84:223-231, 1988
130. Dennery PA: Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81:155-162, 2007
131. Hay ED: Recent studies of embryonic induction. *N Engl J Med* 268:1114-1122, 1963
132. Hay ED: Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation. *Cell Differ Dev* 32:367-375, 1990
133. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
134. Choi SW, Benzie IF, Ma SW *et al.*: Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? *Free Radic Biol Med* 44:1217-1231, 2008
135. Pavlova EL, Lilova MI, Savov VM: Oxidative stress in children with kidney disease. *Pediatr Nephrol* 20:1599-1604, 2005
136. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972
137. Zhou XJ, Kukes G: Pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease: role of apoptosis. *Diagn Mol Pathol* 7:65-68, 1998
138. Tao Y, Kim J, Stanley M *et al.*: Pathways of caspase-mediated apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Kidney Int* 67:909-919, 2005
139. Yang P, Zhao Z, Reece EA: Activation of oxidative stress signaling that is implicated in apoptosis with a mouse model of diabetic embryopathy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 198:130, 2008

140. Chertin B, Nakazawa N, Montedonico S *et al.*: Altered renin-angiotensin system gene expression causes renal hypoplasia in the rats with nitrofen-induced diaphragmatic hernia. *Pediatric Surgery International* 22:57-60, 2006
141. Lasaitiene D, Chen Y, Adams MA, Friberg P: Further insights into the role of angiotensin II in kidney development. *Clin Physiol Funct Imaging* 26:197-204, 2006
142. Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P: The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiol Scand* 181:529-535, 2004
143. Yosypiv IV, El-Dahr SS: Role of the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. *Pediatric Nephrology* 20:1219-1229, 2005
144. Liu F, Brezniceanu ML, Wei CC *et al.*: Overexpression of Angiotensinogen Increases Tubular Apoptosis in Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 19:269-280, 2008
145. Zhang SL, Guo J, Moini B, Ingelfinger JR: Angiotensin II stimulates Pax-2 in rat kidney proximal tubular cells: impact on proliferation and apoptosis. *Kidney Int* 66:2181-2192, 2004
146. Zhang SL, To C, Chen X *et al.*: Essential role(s) of the intrarenal renin-angiotensin system in transforming growth factor-beta1 gene expression and induction of hypertrophy of rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *J Am Soc Nephrol* 13:302-312, 2002
147. Allard J, Buleon M, Cellier E *et al.*: ACE inhibitor reduces growth factor receptor expression and signaling but also albuminuria through B2-kinin glomerular receptor activation in diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1083-F1092, 2007
148. Ito K, Zhu YZ, Zhu YC *et al.*: Contribution of bradykinin to the cardioprotective action of angiotensin converting enzyme inhibition in hypertension and after myocardial infarction. *Jpn J Pharmacol* 75:311-318, 1997
149. Falkner B, Canessa M, Anzalone D: Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor (lisinopril) on insulin sensitivity and sodium transport in mild hypertension. *Am J Hypertens* 8:454-460, 1995
150. Torlone E, Britta M, Rambotti AM *et al.*: Improved insulin action and glycemic control after long-term angiotensin-converting enzyme inhibition in subjects with arterial hypertension and type II diabetes. *Diabetes Care* 16:1347-1355, 1993
151. Damas J, Garbacki N, Lefebvre PJ: The kallikrein-kinin system, angiotensin converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity. *Diabetes Metab Res Rev* 20:288-297, 2004
152. Tan Y, Keum JS, Wang B *et al.*: Targeted deletion of B2-kinin receptors protects against the development of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1026-F1035, 2007
153. Schoelkens BA, Linz W: Bradykinin-mediated metabolic effects in isolated perfused rat hearts. *Agents Actions Suppl* 38 (Pt 2):36-42, 1992
154. Chiang WC, Chien CT, Lin WW *et al.*: Early activation of bradykinin B2 receptor aggravates reactive oxygen species generation and renal damage in ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine* 41:1304-1314, 2006
155. Hayden MS, Ghosh S: Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132:344-362, 2008
156. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
157. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB: The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase-beta. *Nature* 396:77-80, 1998

158. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D: Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* 9:2736-2746, 1995
159. Beg AA, Baltimore D: An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274:782-784, 1996
160. Schiekofer S, Galasso G, Andrassy M *et al.*: Glucose control with insulin results in reduction of NF-kappaB-binding activity in mononuclear blood cells of patients with recently manifested type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 8:473-482, 2006
161. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
162. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
163. TESCH GH, ALLEN TJ: Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research). *Nephrology* 12:261-266, 2007
164. Caluwaerts S, Holemans K, van BR *et al.*: Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus? *J Soc Gynecol Investig* 10:216-221, 2003
165. Menezes HS, Barra M, Bello AR *et al.*: Fetal myocardial hypertrophy in an experimental model of gestational diabetes. *Cardiol Young* 11:609-613, 2001
166. Ishizuka T, Klepcyk P, Liu S *et al.*: Effects of overexpression of human GLUT4 gene on maternal diabetes and fetal growth in spontaneous gestational diabetic C57BLKS/J Lepr(db/+) mice. *Diabetes* 48:1061-1069, 1999
167. Yamashita H, Shao J, Ishizuka T *et al.*: Leptin Administration Prevents Spontaneous Gestational Diabetes in Heterozygous Leprdb/+ Mice: Effects on Placental Leptin and Fetal Growth. *Endocrinology* 142:2888-2897, 2001
168. Verhaeghe J, Peeters TL, Vandeputte M *et al.*: Maternal and fetal endocrine pancreas in the spontaneously diabetic BB rat. *Biol Neonate* 55:298-308, 1989
169. Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA: Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190:858-865, 2004
170. Formby B, Schmid-Formby F, Jovanovic L, Peterson CM: The offspring of the female diabetic "nonobese diabetic" (NOD) mouse are large for gestational age and have elevated pancreatic insulin content: a new animal model of human diabetic pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 184:291-294, 1987
171. Anderson MS, Bluestone JA: The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447-485, 2005
172. Fine EL, Horal M, Chang TI *et al.*: Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* 48:2454-2462, 1999
173. Kanwar YS, Nayak B, Lin S *et al.*: Hyperglycemia: its imminent effects on mammalian nephrogenesis. *Pediatric Nephrology* 20:858-866, 2005
174. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Fetal growth and long-term consequences in animal models of growth retardation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 81:149-156, 1998
175. Holemans K, Gerber RT, Meurrens K *et al.*: Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42:81-89, 1999

176. Holemans K, Caluwaerts S, Van Assche FA: Unravelling the fetal origins hypothesis. *Lancet* 360:2073-2075, 2002
177. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig* 10:392-399, 2003
178. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol* 547:11-20, 2003
179. Kitzmiller JL, Gavin LA, Gin GD *et al.*: Preconception care of diabetes. Glycemic control prevents congenital anomalies. *JAMA* 265:731-736, 1991
180. Lynch SA, Wright C: Sirenomelia, limb reduction defects, cardiovascular malformation, renal agenesis in an infant born to a diabetic mother. *Clin Dysmorphol* 6:75-80, 1997
181. Soler NG, Walsh CH, Malins JM: Congenital malformations in infants of diabetic mothers. *Q J Med* 45:303-313, 1976
182. Woolf AS: Multiple causes of human kidney malformations. *Arch Dis Child* 77:471-473, 1997
183. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM: Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension* 47:502-508, 2006
184. Manning J, Vehaskari VM: Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* 16:417-422, 2001
185. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM: Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension* 47:502-508, 2006
186. Mercurio F, Manning AM: NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18:6163-6171, 1999
187. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S *et al.*: The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors* 10:157-167, 1999
188. Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF *et al.*: Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 53:166-172, 2004
189. Morcos M, Sayed AA, Bierhaus A *et al.*: Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Diabetes* 51:3532-3544, 2002
190. Starkey JM, Haidacher SJ, LeJeune WS *et al.*: Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor-kappaB pathways in renal cortex. *Diabetes* 55:1252-1259, 2006
191. Perkins ND, Gilmore TD: Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 13:759-772, 2006
192. Janssen I, Katzmarzyk PT, Boyce WF *et al.*: Overweight and obesity in Canadian adolescents and their associations with dietary habits and physical activity patterns. *J Adolesc Health* 35:360-367, 2004
193. Dutta J, Fan Y, Gupta N *et al.*: Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25:6800-6816, 2006
194. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S *et al.*: Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ* 13:730-737, 2006
195. Xue X, Piao JH, Nakajima A *et al.*: Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* 280:33917-33925, 2005
196. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M *et al.*: Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50:2792-2808, 2001

197. Lee FT, Cao Z, Long DM *et al.*: Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2139-2151, 2004
198. Morcos M, Sayed AA, Bierhaus A *et al.*: Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Diabetes* 51:3532-3544, 2002
199. Starkey JM, Haidacher SJ, LeJeune WS *et al.*: Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor-kappaB pathways in renal cortex. *Diabetes* 55:1252-1259, 2006
200. Chen X, Li W, Yoshida H *et al.*: Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 272:F299-F304, 1997
201. Okubo S, Niimura F, Matsusaka T *et al.*: Angiotensinogen gene null-mutant mice lack homeostatic regulation of glomerular filtration and tubular reabsorption. *Kidney Int* 53:617-625, 1998
202. Matsusaka T, Kon V, Takaya J *et al.*: Dual renin gene targeting by Cre-mediated interchromosomal recombination. *Genomics* 64:127-131, 2000
203. Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X *et al.*: Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101:755-760, 1998
204. Mercurio F, Manning AM: NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18:6163-6171, 1999
205. Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K *et al.*: Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell* 3:1-10, 1999
206. Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P: The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiol Scand* 181:529-535, 2004
207. Ingelfinger JR, Woods LL: Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am J Hypertens* 15:46S-49S, 2002
208. Iosipiv IV, Schroeder M: A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F199-F207, 2003
209. Moritz KM, Dodic M, Wintour EM: Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays* 25:212-220, 2003
210. Pan L, Gross KW: Transcriptional regulation of renin: an update. *Hypertension* 45:3-8, 2005
211. Solhaug MJ, Bolger PM, Jose PA: The developing kidney and environmental toxins. *Pediatrics* 113:1084-1091, 2004
212. Wolf G: Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 9:48-51, 2002
213. Zhang SL, Moini B, Ingelfinger JR: Angiotensin II increases Pax-2 expression in fetal kidney cells via the AT2 receptor. *J Am Soc Nephrol* 15:1452-1465, 2004
214. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG *et al.*: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 143:2975-2985, 2002
215. Hsieh TJ, Fustier P, Wei CC *et al.*: Reactive oxygen species blockade and action of insulin on expression of angiotensinogen gene in proximal tubular cells. *J Endocrinol* 183:535-550, 2004
216. Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL *et al.*: RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 69:1016-1023, 2006

217. Zhang SL, Chen X, Wei CC *et al.*: Insulin inhibits dexamethasone effect on angiotensinogen gene expression and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *Endocrinology* 143:4627-4635, 2002
218. Lee FT, Cao Z, Long DM *et al.*: Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2139-2151, 2004
219. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Fetal growth and long-term consequences in animal models of growth retardation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 81:149-156, 1998
220. Holemans K, Gerber RT, Meurrens K *et al.*: Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42:81-89, 1999
221. Holemans K, Caluwaerts S, Van Assche FA: Unravelling the fetal origins hypothesis. *Lancet* 360:2073-2075, 2002
222. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig* 10:392-399, 2003
223. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA: Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol* 547:11-20, 2003
224. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S: Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1:335-347, 1988
225. Brenner BM, Mackenzie HS: Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 63:S124-S127, 1997
226. Mackenzie HS, Brenner BM: Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis* 26:91-98, 1995
227. Mackenzie HS, Lawler EV, Brenner BM: Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney Int Suppl* 55:S30-S34, 1996
228. Chi MM, Pingsterhaus J, Carayannopoulos M, Moley KH: Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst 12. *J Biol Chem* 275:40252-40257, 2000
229. Keim AL, Chi MM, Moley KH: Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53 10. *Mol Reprod Dev* 60:214-224, 2001
230. Leunda-Casi A, Genicot G, Donnay I *et al.*: Increased cell death in mouse blastocysts exposed to high D-glucose in vitro: implications of an oxidative stress and alterations in glucose metabolism 4. *Diabetologia* 45:571-579, 2002
231. Moley KH, Chi MM, Knudson CM *et al.*: Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways 14. *Nat Med* 4:1421-1424, 1998
232. Pampfer S, Donnay I: Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat 19. *Cell Death Differ* 6:533-545, 1999
233. Pampfer S, Cordi S, Vanderheyden I *et al.*: Expression and role of Bcl-2 in rat blastocysts exposed to high D-glucose 11. *Diabetes* 50:143-149, 2001
234. Ekblom P, Miettinen A, Virtanen I *et al.*: In vitro segregation of the metanephric nephron 4. *Dev Biol* 84:88-95, 1981

235. Piscione TD, Rosenblum ND: The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights
3. *Differentiation* 70:227-246, 2002
236. Chen YW, Liu F, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
237. Mercurio F, Manning AM: NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18:6163-6171, 1999
238. Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF *et al.*: Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 53:166-172, 2004
239. Morcos M, Sayed AA, Bierhaus A *et al.*: Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Diabetes* 51:3532-3544, 2002
240. Starkey JM, Haidacher SJ, LeJeune WS *et al.*: Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor-kappaB pathways in renal cortex. *Diabetes* 55:1252-1259, 2006
241. Perkins ND, Gilmore TD: Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 13:759-772, 2006
242. Dutta J, Fan Y, Gupta N *et al.*: Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25:6800-6816, 2006
243. Kumar D, Robertson S, Burns KD: Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem* 259:67-70, 2004
244. Brezniceanu ML, Liu F, Wei CC *et al.*: Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. *Kidney Int*, 2007
245. Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B *et al.*: Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F345-F356, 2001
246. Carey RM, McGrath HE, Pentz ES *et al.*: Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100:1566-1574, 1997
247. Gomez RA, Tufro-McReddie A, Norwood VF *et al.*: Renin-angiotensin system: kidney growth and development. *Exp Nephrol* 2:130, 1994
248. Lee FT, Cao Z, Long DM *et al.*: Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2139-2151, 2004
249. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME *et al.*: Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* S64-S70, 2003
250. Srinivas S, Goldberg MR, Watanabe T *et al.*: Expression of green fluorescent protein in the ureteric bud of transgenic mice: a new tool for the analysis of ureteric bud morphogenesis. *Dev Genet* 24:241-251, 1999
251. Watanabe T, Costantini F: Real-time analysis of ureteric bud branching morphogenesis in vitro. *Dev Biol* 271:98-108, 2004
252. Chen YW, Liu F, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
253. Cui S, Li C, Ema M *et al.*: Rapid isolation of glomeruli coupled with gene expression profiling identifies downstream targets in Pod1 knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 16:3247-3255, 2005
254. Zhang SL, Chen YW, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18:2105-2115, 2007

255. Cuezva JM, Burkett ES, Kerr DS *et al.*: The newborn of diabetic rat. I. Hormonal and metabolic changes in the postnatal period. *Pediatr Res* 16:632-637, 1982
256. Kanwar YS, Akagi S, Nayak B *et al.*: Renal-specific oxidoreductase biphasic expression under high glucose ambience during fetal versus neonatal development. *Kidney Int* 68:1670-1683, 2005
257. Eriksson U, Andersson A, Efendic S *et al.*: Diabetes in pregnancy: effects on the foetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentration and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 94:354-364, 1980
258. Oh W, Gelardi NL, Cha CJ: Maternal hyperglycemia in pregnant rats: its effect on growth and carbohydrate metabolism in the offspring. *Metabolism* 37:1146-1151, 1988
259. Kervran A, Guillaume M, Jost A: The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 15:387-393, 1978
260. Aerts L, Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC *et al.*: The diabetic intrauterine milieu has a long-lasting effect on insulin secretion by B cells and on insulin uptake by target tissues. *Am J Obstet Gynecol* 159:1287-1292, 1988
261. Oh W, Gelardi NL, Cha CJ: The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. *Pediatr Res* 29:606-610, 1991
262. Chen YW, Liu F, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
263. Zhang SL, Chen YW, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18:2105-2115, 2007
264. Zhang SL, Chen YW, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18:2105-2115, 2007
265. Weibel ER: Numerical density: shape and size of particles. In: *Stereological Methods Vol 2 Theoretical Foundations* (ed. Weibel ER), chap. pp, London, Academic Press, 1980, pp 149-152
266. Bertram JF: Counting in the kidney. *Kidney Int* 59:792-796, 2001
267. Chen YW, Liu F, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
268. Zhang SL, Moini B, Ingelfinger JR: Angiotensin II increases Pax-2 expression in fetal kidney cells via the AT2 receptor. *J Am Soc Nephrol* 15:1452-1465, 2004
269. Chen YW, Liu F, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
270. Zhang SL, Moini B, Ingelfinger JR: Angiotensin II increases Pax-2 expression in fetal kidney cells via the AT2 receptor. *J Am Soc Nephrol* 15:1452-1465, 2004
271. Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL *et al.*: Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 69:1977-1985, 2006
272. Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL *et al.*: RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 69:1016-1023, 2006

273. Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL *et al.*: Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 69:1977-1985, 2006
274. Satchetelli S, Liu Q, Zhang SL *et al.*: RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 69:1016-1023, 2006
275. Chen X, Zhang SL, Pang L *et al.*: Characterization of a putative insulin-responsive element and its binding protein(s) in rat angiotensinogen gene promoter: regulation by glucose and insulin. *Endocrinology* 142:2577-2585, 2001
276. Wei CC, Guo DF, Zhang SL *et al.*: Heterogenous nuclear ribonucleoprotein F modulates angiotensinogen gene expression in rat kidney proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 16:616-628, 2005
277. Plagemann A: A matter of insulin: Developmental programming of body weight regulation. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 21:143-148, 2008
278. Zhang SL, Chen YW, Tran S *et al.*: Reactive Oxygen Species in the Presence of High Glucose Alter Ureteric Bud Morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18:2105-2115, 2007
279. Michael L, Sweeney DE, Davies JA: The lectin Dolichos biflorus agglutinin is a sensitive indicator of branching morphogenetic activity in the developing mouse metanephric collecting duct system. *J Anat* 210:89-97, 2007
280. Kispert A, Vainio S, Shen L *et al.*: Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development* 122:3627-3637, 1996
281. BARKER DJP: The Developmental Origins of Adult Disease. *J Am Coll Nutr* 23:588S-595, 2004
282. Hughson M, Farris AB, III, Douglas-Denton R *et al.*: Glomerular number and size in autopsy kidneys: The relationship to birth weight. *Kidney Int* 63:2113-2122, 2003
283. Hughson MD, Douglas-Denton R, Bertram JF, Hoy WE: Hypertension, glomerular number, and birth weight in African Americans and white subjects in the southeastern United States. *Kidney Int* 69:671-678, 2006
284. Hoy WE, Bertram JF, Denton RD *et al.*: Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:258-265, 2008
285. GZreskog M, Cederberg J, Eriksson UJ, Wentzel P: Maternal diabetes in vivo and high glucose concentration in vitro increases apoptosis in rat embryos. *Reproductive Toxicology* 23:63-74, 2007
286. Fraser RB, Waite SL, Wood KA, Martin KL: Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model. *Hum Reprod* 22:3059-3068, 2007
287. Zhang SL, Chen YW, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18:2105-2115, 2007
288. Satchell SC, Tooke JE: What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia* 51:714-725, 2008
289. White KE, Bilous RW, Marshall SM *et al.*: Podocyte Number in Normotensive Type 1 Diabetic Patients With Albuminuria. *Diabetes* 51:3083-3089, 2002
290. Raptis AE, Viberti G, *et al.*: Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* S424-S437, 2001

291. Liu W, Liu P, Tao S *et al.*: Berberine inhibits aldose reductase and oxidative stress in rat mesangial cells cultured under high glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 475:128-134, 2008
292. Simone S, Gorin Y, Velagapudi C *et al.*: Mechanism of Oxidative DNA damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme OGG1. *Diabetesdb07-1579*, 2008
293. Huang JS, Chuang LY, Guh JY *et al.*: Antioxidants attenuate high glucose-induced hypertrophic growth in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1072-F1082, 2007
294. Tamura J, Konno A, Hashimoto Y, Kon Y: Upregulation of renal renin-angiotensin system in mouse diabetic nephropathy. *Jpn J Vet Res* 53:13-26, 2005
295. Barr PJ, Tomei LD: Apoptosis and Its Role in Human Disease. *Nat Biotech* 12:487-493, 1994
296. Venkataraman S, Jiang X, Weydert C *et al.*: Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene* 24:77-89, 2004
297. Ough M, Lewis A, Zhang Y *et al.*: Inhibition of Cell Growth by Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) in Human Pancreatic Carcinoma. *Free Radical Research* 38:1223-1233, 2004
298. Tay YC, Wang Y, Kairaitis L *et al.*: Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure[quest]. *Kidney Int* 68:391-398, 2005
299. Kumar D, Robertson S, Burns K: Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Molecular and Cellular Biochemistry* 259:67-70, 2004
300. Brezniceanu ML, Liu F, Wei CC *et al.*: Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. *Kidney Int*, 2007
301. Corvol P, Michaud A, Gribouval O *et al.*: Can we live without a functional renin-angiotensin system? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:431-433, 2008
302. Wolf G: Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-[beta] pathway. *Kidney Int* 70:1914-1919, 2006
303. Laycock SK, Vogel T, Forfia PR *et al.*: Role of Nitric Oxide in the Control of Renal Oxygen Consumption and the Regulation of Chemical Work in the Kidney. *Circ Res* 82:1263-1271, 1998
304. Tanaka T, Miyata T, Inagi R *et al.*: Hypoxia-induced apoptosis in cultured glomerular endothelial cells: Involvement of mitochondrial pathways. *Kidney Int* 64:2020-2032, 2003
305. Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z *et al.*: Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int* 73:34-42, 2007
306. Welch WJ, Baumgartl H, Lubbers D, Wilcox CS: Renal oxygenation defects in the spontaneously hypertensive rat: Role of AT1 receptors. *Kidney Int* 63:202-208, 2003
307. Siman M: Congenital malformations in experimental diabetic pregnancy: aetiology and antioxidative treatment. Minireview based on a doctoral thesis. *Ups J Med Sci* 102:61-98, 1997
308. Chen YW, Liu F, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
309. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y *et al.*: A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886, 2001

310. Zhang SL, Chen YW, Tran S *et al.*: Pax-2 and N-myc regulate epithelial cell proliferation and apoptosis in a positive autocrine feedback loop. *Pediatr Nephrol*, 2007
311. Shankland SJ, Scholey JW: Expression of growth-related protooncogenes during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 47:782-788, 1995
312. Tamaki K, Okuda S, Ando T *et al.*: TGF- β 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 45:525-536, 1994
313. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S *et al.*: The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. *Biofactors* 10:157-167, 1999
314. Mercurio F, Manning AM: NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18:6163-6171, 1999
315. Mezzano S, Aros C, Droguett A *et al.*: NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 19:2505-2512, 2004
316. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G: Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F645-F659, 2005
317. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V *et al.*: Reduction of the Accumulation of Advanced Glycation End Products by ACE Inhibition in Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 51:3274-3282, 2002
318. Ryu S, Kohen R, Samuni A, Ornoy A: Nitroxide radicals protect cultured rat embryos and yolk sacs from diabetic-induced damage. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79:604-611, 2007
319. Singh LP, Crook ED: Hexosamine regulation of glucose-mediated laminin synthesis in mesangial cells involves protein kinases A and C. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F646-F654, 2000
320. Dressler GR, Douglass EC: Pax-2 is a DNA-Binding Protein Expressed in Embryonic Kidney and Wilms Tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:1179-1183, 1992
321. Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR: Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Development* 128:4747-4756, 2001
322. Torban E, Dziarmaga A, Iglesias D *et al.*: PAX2 Activates WNT4 Expression during Mammalian Kidney Development. *J Biol Chem* 281:12705-12712, 2006
323. Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121:4057-4065, 1995
324. Winyard PJ, Risdon RA, Sams VR *et al.*: The PAX2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J Clin Invest* 98:451-459, 1996
325. Chen YW, Liu F, Tran S *et al.*: Reactive oxygen species and nuclear factor- κ B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants. *Kidney Int* 70:1607-1615, 2006
326. Rasch R, Skriver E, Woods LL: The role of the RAS in programming of adult hypertension. *Acta Physiol Scand* 181:537-542, 2004
327. Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M: Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E124-E131, 2002
328. Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y *et al.*: Modular Activation of Nuclear Factor- κ B Transcriptional Programs in Human Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 55:2993-3003, 2006

329. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M *et al.*: Systemic Infusion of Angiotensin II into Normal Rats Activates Nuclear Factor- κ B and AP-1 in the Kidney : Role of AT1 and AT2 Receptors. *Am J Pathol* 158:1743-1756, 2001
330. Reviving the Saint-Vincent Declaration: IDF Website
http://www.diabetesvoice.org/issues/2004-09/Reviving_the_St_Vincent_Declaration.pdf. 2008.
Ref Type: Internet Communication

Stella Lê Minh Tran
curriculum vitae

FORMATION

M.Sc. Sciences biomédicales 2006 – 2008
 Université de Montréal, Canada
 Mémoire : Programmation périnatale de la néphrogenèse

Baccalauréat en Sciences (Sciences biomédicales) 2000-2004
 Université de Montréal, Canada

EXPERIENCE DE TRAVAIL

Étudiante à la maîtrise Sept 2006
 Laboratoire d'endocrinologie et néphrologie
 Directrice de recherche: Dre Shao-Ling Zhang
 Centre de recherché du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.(CR-CHUM)
 Hôpital Hôtel-Dieu, Montréal, Canada

Stagiaire de recherche Sept 05-Sept 06
 Laboratoire de néphrologie pédiatrique
 Superviseure: Dre Shao-Ling Zhang
 CR-CHUM, Hôpital Hôtel-Dieu, Montréal, Canada
 Régulation moléculaire de la néphropathie diabétique et développement rénal

PRIX ET BOURSES

Bourse d'excellence de maîtrise Décembre 2006
 Département de Sciences biomédicales, UdeM

Boursière d'été Été 2007
 Conseil Professionnel de Diabète Québec

Bourse de rédaction Avril 2008
 Département de sciences biomédicales

FRSQ Doctoral Training Award
 À partir de l'année académique 08-09 (3 ans)

PUBLICATIONS

1. **Tran S**, Chen YW, Chenier I, Liu F, Brezniceanu, ML., Quaggin S, Chan J.S.D, Hébert MJ, Ingelfinger JR., Zhang SL: Maternal Diabetes Modulates Renal Morphogenesis in Offspring. *J Am Soc Nephrol* 19: 943-952, 2008
2. Chen YW, **Tran S**, Zhang SL, Liu F, Chenier I, Hébert MJ, and Ingelfinger JR: Glomerular hypotrophy in angiotensin II type 2 receptor (AT₂R) knockout mice is mediated via downregulation of Pax-2 and N-myc gene expression. *Pediatr Nephrol*. 2008 July 8 [Epub ahead of print]
3. Zhang SL, Chen YW, **Tran S**, Chenier I, Hébert M-J, Ingelfinger JR.: Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 18(7):2105-2115. 2007
4. Zhang SL, Chen YW, **Tran S**, Liu F, Nestoridi E, Hébert MJ, Ingelfinger JR: Pax-2 and N-myc regulate epithelial cell proliferation and apoptosis in a positive autocrine feedback loop. *Pediatr Nephrol*. 22(6):813-824, 2007.
5. Chen YW, Liu F, **Tran S**, Zhu YH, Hébert, MJ, Ingelfinger J.R. Zhang SL.: Reactive Oxygen Species (ROS) and NF- κ B Pathway Mediate High Glucose- Induced Pax-2 Gene Expression in Mouse Embryonic Mesenchymal Epithelial Cells and Kidney Explants. *Kidney Int*, 70 (9):1607-1615, 2006
6. Brezniceanu M-L, Liu F, Wei C-C, **Tran S**, Sachetelli S, Zhang S-L, Guo D-F, Filep JA, Ingelfinger JR, Chan JSD: Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. *Kidney Int*, 71(9):912-23, 2007

ANNEXE I

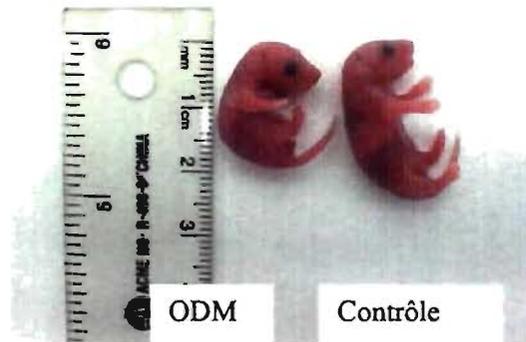


Figure 10 : Nouveau-nés de mère diabétique (ODM) et de mère contrôle. Figure non-publiée.

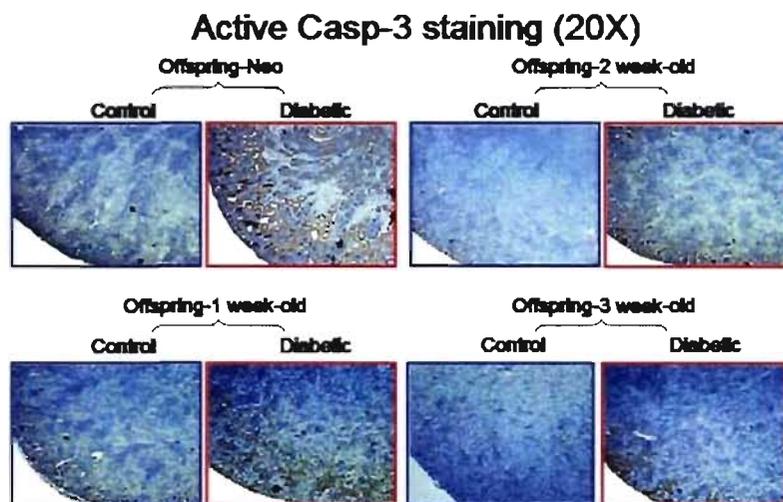


Figure 11 : Marquage pour l'enzyme Casp-3 active (20X). Figure non-publiée.

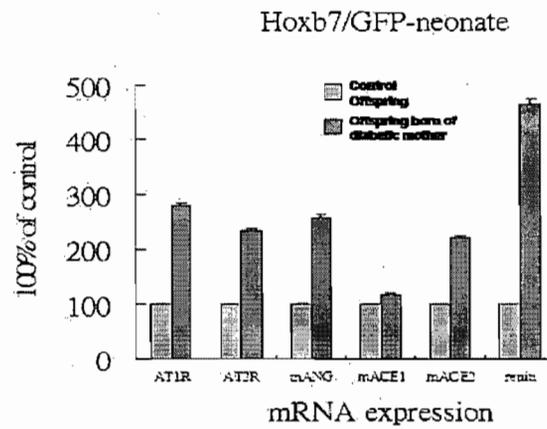


Figure 12 : ARM messenger pour composantes du système rénine-angiotensine chez le nouveau-né. Figure non-publiée.